

报道了该方法在一粒小麦、圆锥小麦、大麦、玉米、黑麦等植物染色体上进行高分辨显带的结果。AMD 法的流程主要包括:放线菌素 D 和秋水仙素共同预处理植物种子根尖, Ohnuki's 液低渗, 纤维素酶和果胶酶酶解, 3:1 的甲醇冰乙酸固定液固定, 涂片法制片和 Wright-Giemsa 染色。该方法在多数实验植物的染色体上均显示出丰富的高分辨带纹。在早中期, 多数染色体可显示出 10 条左右的清晰带纹。文章还分析了植物染色体较难显示高分辨带或 G 带的原因, 并讨论了放线菌素 D 在显带中的应用。

参 考 文 献

- [1] Greilhuber, J., 1977, *Theor. Appl. Genet.* 50:121-124.
- [2] Anderson, L. K. et al., 1982, *Exp. Cell Res.*, 138:433-436.
- [3] Drewry, A., 1982, *J. Heredity*, 73:305-306.
- [4] Murata, K. and T. J. Orton, 1984, *J. Heredity*, 75:225-228
- [5] 朱凤绥等, 1986, 作物学报, 12:213-214.
- [6] 陈瑞阳等, 1986, 武汉植物学研究, 4:111-117.
- [7] 陈瑞阳等, 1987, 植物学报, 29:341-346.
- [8] 张自立等, 1986, 植物学报, 28:595-598.
- [9] 宋运淳等, 1987, 遗传学报, 14(6):424-427.
- [10] 卫俊智等, 1987, 麦类植物染色体高分辨显带, 《中国的遗传学研究》, 湖南科技出版社, 132-133.
- [11] 詹铁生等, 1987, 植物学报, 29:465-468.
- [12] Coming, D. E., 1987, *Ann. Rev. Genet.*, 12:25-46.
- [13] 洪云汉等, 1985, 遗传学报, 12:67-71.
- [14] Arrighi, F. E. and T. C. Hsu, 1965, *Exp. Cell Res.*, 39:305-308.
- [15] Shafer, D. A., 1973, *Lancet*, 1:828-829.
- [16] Hsu, T. C. et al., 1973, *Exp. cell Res.* 79:484-487.
- [17] Yu, R. L. et al., 1981, *Cytogenet. Cell Genet.*, 31:111-114.
- [18] Yunis, J. J., 1976, *Science*, 191:1268-1270.
- [19] Yunis, J. J., 1981, *Hum. Genet.*, 56:293-298.
- [20] Rybak, J. et al., 1982, *Hum. Genet.*, 60:328-333.

介绍一种稳定的改良三铅染色液*

陈文列 钟秀容

(福州福建医学院电镜室)

用于电镜超薄切片的铅染液报道甚多, 如氢氧化铅^[1]、柠檬酸铅^[2]、酒石酸铅^[3]和三铅染液^[4]等。它们共同的缺点是较易形成碳酸铅沉淀, 以致染液难以长期保存, 且染色时又需采取特殊措施防止切片污染。最近, Hanaichi 推荐了一种能减缓产生碳酸铅沉淀的改良 Sato 氏铅染液^[5], 经我们使用效果颇佳, 现将我们配制与使用该染液的方法介绍于下。

染液配制与染色方法

一、煅烧柠檬酸铅 将柠檬酸铅[枸橼酸铅, $(C_6H_5O_7)_2Pb_3 \cdot 3H_2O$]置于坩埚, 在箱式电阻炉(马孚炉, S_x-4-10型, 4 kW)中, 于

250℃煅烧约 45—60 分钟, 至白色结晶转变为浅棕黄色粉末。

二、铅染液配制 取煅烧的柠檬酸铅 0.20 g、硝酸铅 0.15 g、醋酸铅 0.15 g、柠檬酸钠 1.00 g、去 CO₂ 蒸馏水 41 ml, 放入 50 ml 容量瓶中, 剧烈振摇 15—30 分钟, 置超声波发生器中 5—10 分钟, 使之反应充分, 呈淡黄色悬浊液, 再分 3—5 次加入新配的 1 mol/L NaOH (GR 或 AR) 溶液 9 ml (每加一次均应混匀, 并

* 本文承蒙梁平教授指导、审阅, 谨致谢意。

本文曾于 1988 年 10 月在桂林召开的“全国电镜超切制样技术交流会”上交流。

用超声波助溶),直至液体转变成澄清的淡黄色溶液, pH 约 12。配好后置冰箱备用。

三、染色方法 少量切片可在蜡盘上(不需放 NaOH 颗粒)染 2~5 分钟;大量切片装入染色盒^[6],直接放在小烧杯中,将染液通过做成漏斗状的滤纸滤入烧杯,染色 5—10 分钟,染毕注意充分洗去染液(时间不宜长),用电吹风(或吸球)吹干。

结果与讨论

本染液是由 Sato 氏三铅染液^[4]改进而来,主要是使用了煅烧的柠檬酸铅,且螯合剂柠檬酸钠与铅盐的比例较 Sato 氏原法为高,故性质较稳定,不易形成碳酸铅沉淀。据 Hanaichi 氏报道,该染液贮存在盖紧的棕色螺口瓶中,保存于室温下或冰箱中一年均未见沉淀物;将新染液与 Sato 氏染液同时暴露于空气,结果新染液 3 小时仍然澄清,而 Sato 氏染液 1 小时即变混浊。我们仿此法将所配染液暴露空气 5—6 小时才见白色结晶,而 Sato 氏染液近 3 小时、Reynolds 氏染液 2.5 小时、纯柠檬酸铅染液 1

小时就有结晶出现(以上均于 15℃ 环境)。虽然染液中碳酸铅沉淀形成比肉眼可见的结晶出现早,但使用新染液染色的数分钟内,可避免因接触空气中 CO₂ 而污染切片,故无需特殊防污染措施。贮存的染液也不需加一层液体石蜡隔绝空气,避免了染色时液体石蜡污染的可能性。因此,若铅盐煅制适宜、染液配制妥当、染色切片清洗充分,则切片染色干净污染比以往使用的染液明显减少;而该染液染色力强,约染 2 分钟可获得足够的反差,且结构清晰(图版)。

煅烧的柠檬酸铅是染液中最重要成分,原文仅介绍经 200~300℃ 煅烧数小时呈浅棕黄色而成,我们经多次试验摸索出适当的煅烧条件(见表)。从表中可看出掌握好煅烧条件很重要,只有适宜的“火候”与恰当的时间,才能煅制所需的铅盐。虽然煅烧的柠檬酸铅都有减缓产生碳酸铅沉淀的作用,但呈微黄色铅盐所配制的染液,置室温 1.5 个月就逐渐出现混浊现象;呈棕黑与灰黑色铅盐的染液,却有许多炭化沉淀物会污染切片;而只有煅烧呈浅棕黄色的铅盐最为适用。

煅烧条件比较

煅烧条件	干燥箱		电阻炉		
	200℃ 8 h	200℃ 2 h	250℃ 30'—45'	250℃ 45'—60'	300℃ 15'
铅盐颜色	微黄	浅黄	黄	浅棕黄	棕黑→灰黑

配制染液时,为减少染液中 CO₃²⁻ 的浓度,应使用去 CO₂ 蒸馏水,NaOH 最好使用 GR 级,至少 AR 级(GR、AR、CP 级 NaOH 试剂中 Na₂CO₃ 含量分别是 1.0%、1.5%、3.0%);NaOH 溶液须分数次加入混匀,并借助于超声波,以使铅盐最终能完全溶解。为减缓碳酸铅形成,应注意瓶口的密闭性,且将染液贮于冰箱。染液若分装于小瓶使用,可避免因多次吸取,而致使整大瓶染液污染。

摘 要

本文介绍以煅烧柠檬酸铅为主要成分的改

良三铅染液,其性质较稳定,暴露空气 3—4 小时未见碳酸铅结晶形成;切片染色干净,细胞结构清晰、反差较强。

参 考 文 献

- [1] Watson ML. 1958, *J Biophys Biochem Cytol* 4:727.
- [2] Reynolds ES. 1963, *J Cell Biol* 17:208.
- [3] Millonig G. 1961, *J Biophys Biochem Cytol* 11:736.
- [4] Sato T. 1968, *J Electron Microsc* 17: 158.
- [5] Hanaichi T. 1986, *J Electron Microsc* 35 :304.
- [6] 杨善民, 中华物理医学杂志 1985, 7:252.