

- [24] Kaczmarek L, et al., 1985, *Science*, 228: 1313—1315.
- [25] 陈汉源, 1986, 第一军医大学学报, 6: 88—94.
- [26] Nishimura S, et al., 1987, *Biochem J.*, 243: 313—327.
- [27] Land H, et al., 1983, *Nature* 304: 596—602.
- [28] Jenuwein T, et al., 1985, *Cell* 41: 629—637.
- [29] Casalbore P, et al., 1987, *Nature*, 326: 188—190.
- [30] Lebovity RM, 1986, *Lab Invest.*, 55: 249—251.

植物染色体 G 带研究概况*

卫俊智 朱凤绥

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

早在本世纪 20 年代后期, Heitz 就注意到植物染色体物质上的线性分化, 并区分为常染色质和异染色质。1940 年, Darlington 和 La cour 曾对重楼属(*Paris*)和延龄草属(*Trillium*)植物染色体的线性分化进行过详尽的描述^[1]。但是, 这些并未引起人们足够的重视。直到 1968 年之后, Caspersson 等人^[2]的工作才真正揭开染色体显带技术的序幕, 他们用一种叫芥子喹吖啶(*Quinacrine mustard*)的荧光染料处理蚕豆、延龄草属等植物和中国仓鼠的染色体, 得到亮暗相间的荧光带纹, 之后又在人类染色体上显带成功, 并称之为 Q 带^[3]。随后, 不同的研究者又先后发展了 C 带、G 带、R 带、N 带、高分辨带等多种显带技术。20 年来, 显带技术不断发展并得以广泛应用, 推动了细胞遗传学的研究进展, 对植物有关学科的研究也有一定的促进作用。然而令人不解的是, 植物染色体一直只能显示带纹较简单的 C 带、N 带和荧光带等, 在动物和人类染色体上能很好显带的 G 带和高分辨带技术, 应用于植物却多年进展缓慢, 并一度被认为植物染色体是不可能显示 G 带的, 一个时期研究几乎陷于停顿, 近几年来才又取得了新的发展。

一、对植物 G 带的认识

按照巴黎会议^[4]的命名, G 带是指预先经

过或不经碱处理的染色体标本, 在某种盐溶液中温育, 然后 Giemsa 染色而显示的带纹。后来发现用尿素、去污剂或蛋白酶等处理后, Giemsa 染色也可以显示 G 带^[5]。

G 带技术是动物染色剂显带中带纹最丰富、应用最普遍, 也是最有价值的一种显带技术, 它的建立为动物染色体的研究提供了很大方便。并且在中国仓鼠^[7]和人类^[8]的染色体中证明, G 带带纹同减数分裂粗线期染色体上的染色粒有密切的对应关系, 这就更加肯定了 G 带技术的利用价值。此后一个时期, 许多实验室试图把这一技术引入植物中, 然而无论使用何种 G 带程序, 植物染色体都不显示 G 带, 最多只能产生代表组成型异染色质的 C 带。

不少人曾断定, 植物染色体不可能显示 G 带, 并给予了不同的解释。Bhattacharya^[9]认为这是由于植物染色体标本制备原因所致; Greilhuber^[10]认为植物染色体不显 G 带, 可以用植物染色体中不同的组装方式或植物界中缺乏显 G 带的染色质来解释; Nagl^[11]根据分子生物学的观点, 认为是由于在植物中含有较高比例的中度重复 DNA 的缘故。这些解释都不能令人满意。1977 年, Greilhuber^[6]通过分析资料指出, 植物染色体具有比动物染色体高得多

* 农业部农 02-01-02 重点科研项目。

的收缩程度,在如此高度收缩的情况下,即使高等脊椎动物的染色体也会由于光学原因而不能显示 G 带,从而得出结论:仅由于染色体的高度收缩而在植物中期染色体上看不到 G 带。这种对植物染色体不显 G 带的解释为不少人所接受,并不加评论地予以引用,一些实验室也就中断了植物染色体 G 带的探索。

然而, Greilhuber 引用的染色体数据来源于不同文献中,而这些文献关于染色体的资料是不同作者用不同的方法所获得,它们之间并不具有可比性,这一点却为多数人所忽视。直到时隔 5 年之后,才被 Anderson 等(1982)^[12]所指出。Anderson 等经过严格实验表明,植物染色体和动物染色体间的 DNA 量与染色体体积之比以及 DNA 量与染色体长度之比均无明显差异,而不同的预处理和制片方法有可能造成这种比值的差异,这说明动植物染色体在收缩程度上并无明显差异。从而用实验的证据否定了 Greilhuber 的假说,又增强了人们探索植物染色体 G 带技术的信心,不少研究者又踏上了植物染色体 G 带技术的探索之路。

二、植物 G 带技术研究发展

Kurata 等^[13]在水稻染色体显带中进行了大胆的探索。水稻染色体较小,一般难以辨认,虽然 Giemsa 带和 N 带等可以帮助识别水稻染色体,但并不十分理想。Kurata 等用脱氧腺苷和尿苷处理发芽的水稻种子,然后用 8-羟基喹啉处理根尖,经过酶解、固定、火焰干燥法制片和 Giemsa 染色后,在水稻染色体上显示出较 C 带和 N 带稍多的带纹,称之为 G 带,并用此法鉴定了水稻的某些三体^[14]。但作者认为其带纹的稳定性和清晰度较差,有待进一步改良。另外该方法未被他人很好地重复,在其他植物中也未见报道。

Drewry^[15]以红松为材料,常规压片法制片,冰冻揭片并空气干燥后,室温下胰酶处理染色体标本 20—40 分钟, Giemsa 染色。结果在红松染色体上除了显示 C 带外,还显示了被

作者称之为 G 带的其他带纹。但文章并未能提供整个红松染色体组($2n = 24$)的带型,而只提供了 4 条染色体的带型,且其带纹不甚清晰。

Murata 等^[16]用秋水仙素处理芹菜根尖,然后固定,再用 0.8% 醋酸洋红染色 30—60 分钟,45% 乙酸中压片,也可见分化的带纹分布于整个染色体上,作者称之为类似于 G 带的染色体分化。

相比之下,国内学者在这方面的研究较为深入,并取得了较大进展。施立明和徐道觉(1983,未发表)借鉴 Rybak 等^[17]人类染色体显带方法,把放线菌素 D(简称 AMD)引入玉米染色体 G 带探索中,取得了一些令人鼓舞的结果。

朱凤绥等^[18]对大麦染色体高分辨显带进行了研究。用放线菌素 D 和秋水仙素分别处理种子根尖, Ohnuki's 溶液低渗,酶解与固定后醋酸地衣红中染色压片。该方法在大麦的晚前期和早中期染色体上显示出丰富的高分辨带纹,其 7 条染色体上可显示 100—150 条带,相当于 N 带的 5—6 倍。通过对预处理、制片、染色等步骤的不断摸索与改进,已得到程序简单而成功率较高的 AMD 法,并用 AMD 法和胰酶法在一粒小麦、圆锥小麦、普通小麦、黑麦、大麦、玉米等植物染色体上显示出丰富的高分辨带纹^[19]。

张自立等^[20-22]用胰酶法、尿素法、SDS 法、NaOH 法,在黑麦、大麦、蚕豆的前期和晚前期染色体上诱导出现了大量横纹,即 G 带。有些细胞中每条染色体可观察到 10—20 多条带,带纹的数目、位置与 C 带、N 带绝然不同。

陈瑞阳等^[23,24]先后报道了用胰酶法在川百合、华山松及七叶一枝花和尿素法在野生一粒小麦、玉米、蚕豆、吊兰、川百合等多种植物上诱导出 G 带的结果,带纹较多,分布在染色体的全长上,前期染色体显示颗粒状带纹,中期染色体显示带状带纹。

詹铁生等^[25]以玉米为原料,用放线菌素D预处理,结合改良的Seabright法、Utakoji法及醋酸地衣红技术处理染色体,诱导G带成功,带纹分布于整个染色体上。宋运淳等^[26]也用ASG法(即醋酸-SSC-Giemsa)在玉米染色体上显示了丰富的带纹。

何立珍^[27]参照朱凤绥等^[18]的方法对黄花菜染色体进行了G带探索。夏晓敏等^[28]用HCl-NaOH-(NH₄)Fe(SO₄)₂·12H₂O等处理杉木染色体而显示了G带带纹。

Wang和Kao^[29]最近报道,在巢菜属培养细胞的染色体上显示了G带。他们认为成功的关键有两个:第一是在染色体制备过程中,省去了酸解和酶解;第二是在Giemsa染色之前,用弱的NaHCO₃溶液(pH 9.0-9.5)处理标本。并且也指出,前期和早中期染色体比中期染色体容易显带。

可见,在对植物染色体G带或高分辨带的探索方面,我国学者做了大量的研究工作,并取得了很大进展,这将对植物染色体的研究和植物细胞遗传学的发展起到一定的推动和促进作用。

三、现状与问题

到目前为止,公开发表的文献中,已经对大麦、黑麦、玉米、水稻、一粒小麦、圆锥小麦、普通小麦、野生一粒小麦、红松、川百合、七叶一枝花、蚕豆、吊兰、黄花菜、芹菜、黄麻、杉树、巢菜、华山松等19种植物先后进行了G带技术的探索,并取得了初步成功。所采用的方法有:脱氧腺苷-尿苷法、AMD法、胰酶法、尿素法、SDS法、NaOH法、醋酸地衣红法、醋酸洋红法、NaHCO₃法、ASG法以及(NH₄)Fe(SO₄)₂法等等。这些充分肯定了植物染色体是可以显示G带的。这些带纹基本上是属于G带的而不是R带,因为在方法上它们多数是经盐、酶、变性剂等较低的温度下处理的,而且具有G带的两个特征:①异染色质以外的区域也显带,故带纹分布在整个染色

体长度上;②染色体上带纹的多少与染色体的收缩程度有关,染色体收缩程度越大,带纹数目越少^[6,18,24,26,29]。而R带(也叫反带,即其带纹正好与G带带纹相反)需要(至少在动物中如此)较高温度和较低pH的盐溶液处理^[29]。

虽然对显示G带的原因各有不同的解释,但都较为一致地认为:方法的改进与所取染色体时期的提前是显带的关键;染色体上所显示的带纹数目与染色体所处的时期有关。

植物染色体G带的研究已经取得了很大进展,也应该看到该技术距实际应用还有一段距离,还存在一些困难和急待解决的问题,概括起来有以下几点。

首先,不同研究者所采用的材料和方法各不相同,这些方法产生的带纹是否一致还不十分清楚,还没有得到能被多数研究者所重复,且能用于多种植物的标准化显带程序。

其次,显带程序中的一些条件要求较严格,不易掌握。如AMD法中AMD处理的时间及浓度;胰酶法中胰酶的pH值、处理浓度及时间;NaHCO₃法中NaHCO₃的pH值等等,这些条件都需要严格控制才能达到较好的显带效果。

第三,显带分裂相所占的比例不高。经过高分辨显带或G显带程序处理的材料,总分裂相有所下降,或总分裂相没变但显带分裂相比较很低,这样就不容易得到较为理想的显带分裂相。

第四,中期染色体不易显带。从目前发表的文章来看,一般中期染色体不显带或者显带质量较差。前期染色体多数可显示丰富的带纹,随着分裂相从前期→晚前期→早中期→中期的推移,染色体逐渐缩短,相邻带纹相互合并,在显微镜下无法分辨。在前期或晚前期,虽带纹较多,但染色体往往较长,不易分散,给带纹的分析带来一定的困难。

第五,由于不同时期的染色体所显示带纹的数目有差异,从而导致了带纹的重复性和稳定性较差,这样就很难制定出各种植物G带或

高分辨带的带纹模式图,也限制了该技术的尽快应用。

造成这些困难及问题的原因是多方面的,可概括为内在原因和外在原因两方面。

内在原因是指植物染色体本身的原因。目前的工作虽然已经证实,植物染色体同动物染色体一样可以显示G带或高分辨带,但也可以明显看出,植物染色体在显带上的确与动物(主要是高等脊椎动物)染色体之间存在不少差异。这种差异可能与染色体上的碱基分布规律不同有关,也可能在染色体细微结构上存在差别,但这方面还缺乏足够的实验证据。

外在原因主要是指技术上的原因。(1)植物分带中一般处理根尖,而根尖细胞分裂的高度同步化比较困难,这给得到较多的适宜时期的分裂相带来不便。(2)由于植物细胞有细胞壁,在对细胞壁用酶解、酸解来解离、软化的过程中,往往对染色体造成不利影响,使之不易显带。(3)用涂片法和滴片法得到的染色体较压片法得到的染色体易显带,但前两种方法不易掌握。

另外,对植物染色体G带机制了解得很少,而且是根据人类和动物中的资料推测来的。例如有可能是由于胰酶对不同的DNA区段上覆盖的蛋白质类型的消化程度不同而显带^[30],也有可能是AMD引起染色体不同节段的凝缩程度不同而显带^[31]。还有人认为,G带的产生是由于染色体成分在处理过程中丢失,使染色体结构松散,螺旋结构显露,G带可能就是显露出来的染色体螺旋的螺线^[22]。此外,已经知道Ohnuki's低渗液能引起染色体解螺旋或阻碍染色体收缩而利于显示G带^[18,25,32]。其他方面的机制则不甚了解。

四、前景展望

首先,进一步探索显带方法。摸索适宜的预处理方法,设法抑制染色体过度浓缩,使染色体具有适宜的长度,同时必须能使染色体发生纵向分化。对低渗、解离、制片、染色体标

本的处理、染色等过程进行探索,尽可能避免对染色体过多过强的理化作用,以获得几个重复性较好、较为实用的标准化流程。

其次,绘制标准带型。染色体上不仅能显示丰富的带纹,而且其带纹要具有较高的重复性和稳定性,这样才能进一步使带纹特征化、数量化,带型模式化,从而制定出不同植物的标准带型。

第三,G带技术进一步发展后将很快用于植物遗传育种的研究,它将对植物染色体变异、染色体起源进化、外源染色体导入等进行更为精确、更为可信的分析研究。

第四,计算机图象分析技术的发展,使得植物染色体图象自动分析处理成为可能^[33],尤其G带或高分辨带更需要借助计算机图象分析处理,才能消除人为误差,达到快速准确之效果。朱凤绥等^[19]对植物高分辨显带染色体计算机图象分析进行了初步探索,该方面的发展,将推动显带技术的发展与应用。

第五,染色体G带技术与染色体分离、原位分子杂交等染色体技术,甚至与分子生物学的方法和技术结合起来,还将与粗线期染色体技术结合起来,从而在染色体工程、染色体结构与功能的分析以及基因定位等方面起到重要作用。进一步,可将植物性状、带纹和基因位点在一定程度上统一起来,促进和指导植物遗传育种的研究工作。

摘 要

本文对植物染色体G带的历史、认识发展、技术探索、现状、问题及前景等进行了全面综述。显带技术建立后的多年,植物染色体一直不显G带,不少研究者提出了不同假说予以解释或进行实验验证。最近几年,该技术有了迅速发展,尤其是我国学者在这方面做了大量开创性工作,用多种方法在十种植物上进行了探索,并初获成功。虽然目前还存在一些有待解决的困难和问题,但植物染色体G带技术有着广阔的发展前景。

参 考 文 献

- [1] Vosa, C. G., 1985, In: Advances in chromosome and cell genetics, A. K. Sharma & A. Sharma eds. Oxford & IBH Publishing Co., 79-104.
- [2] Caspersson, T. et al., 1968, *Exp. Cell Res.*, 49:219-222.
- [3] Caspersson, T. et al., 1970, *Chromosoma*, 30: 215-217.
- [4] Paris Conference, 1971, *Cytogenetics*, 11: 307-362.
- [5] Bostock, C. J. and A. T. Sumner, 1978, The eukaryotic chromosome, North-Holland Publishing Company.
- [6] Greilhuber, J., 1977, *Theor. Appl. Genet.*, 50: 121-124.
- [7] Okada, T. A. and D. E. Comings, 1974, *Chromosoma*, 48: 65-71.
- [8] Luciani, J. M. et al., 1975, *Chromosoma*, 52: 275-282.
- [9] Bhattacharya, S., 1978, *Cytologia*, 43: 581-583.
- [10] Greilhuber, J., 1975, *Plant Syst. Evol.*, 124: 139-156.
- [11] Nagl, W., 1974, *Nature*, 249: 53.
- [12] Anderson, L. K. et al., 1982, *Exp. Cell Res.* 138: 433-436.
- [13] Kurata, N. et al., 1981, *Japan. J. Genet.*, 56: 41-50.
- [14] Kurata, N. and T. Omura, 1984, In: Biology of rice, S. Tsunoda and N. Takahashi, eds., Japan Sci. Sco. Press, 31-67.
- [15] Drewry, A., 1982, *J. Hered.*, 73: 305-306.
- [16] Murata, K. and T. J. Orton, 1984, *J. Hered.*, 75: 225-228.
- [17] Rybak, J. et al., 1982, *Hum. Genet.*, 60: 328-333.
- [18] 朱凤绥等, 1986, 作物学报, 12 (3): 213-214.
- [19] 朱凤绥等, 1988, 中国农业科学, 21 (5): 91-93.
- [20] 张自立等, 1986, 植物学报, 28(6): 595-598.
- [21] 张自立等, 1988, 遗传, 10 (2): 11-12.
- [22] 杨晓峰等, 1988, 植物学报, 30 (5): 468-472.
- [23] 陈瑞阳等, 1986, 武汉植物学研究, 4 (2): 111-117.
- [24] 陈瑞阳等, 1987, 植物学报, 29(4): 341-346.
- [25] 詹铁生等, 1987, 植物学报, 29(5): 465-468.
- [26] 宋运淳等, 1987, 遗传学报, 14(6): 424-427.
- [27] 何立珍, 1986, 湖南农学院学报, 3: 105-108.
- [28] 夏晓敏等, 1986, 林业科学, 22 (2): 169-171.
- [29] Wang, H. C. and Kao, K. N., 1988, *Genome*, 30: 48-51.
- [30] Chuprevich, J. W., 1973, *Lancet*, I: 484-486.
- [31] Hsu, T. C. et al., 1973, *Exp. Cell Res.*, 79: 484-487.
- [32] Ohnuki, Y., 1968, *chromosoma*, 25: 402-428.
- [33] Fukui, K., 1986, *Theor. Appl. Genet.*, 72: 27-32.

小鼠胚胎瘤及其分化细胞的细胞光度法分析

郝京生 陈汉源

(广州第一军医大学生物教研室)

小鼠胚胎瘤(EC)细胞具有多种分化潜能, 经过诱导剂的促进后, 其形态结构、生化特性、基因表达和致癌性等发生改变^[1-4]。本实验对诱导分化的EC细胞进行染色体数目、DNA合成和DNA含量的分析, 以期阐明三

者在癌细胞分化中的变化。

材 料 和 方 法

一、癌细胞的诱导分化

小鼠胚胎瘤B7-2 EC细胞株从中国科学院上海