

# 蚕豆染色体的结构异染色质与 Giemsa 显带技术的关系

李 懋 学

(北京大学生物系)

蚕豆具有数目比较少( $2n = 12$ )而体积比较大的染色体, 在植物细胞遗传学的研究中, 常作为观察染色体的形态结构变异的材料。

关于蚕豆染色体的异染色质, 已有一些作者曾用常规技术进行了某些研究<sup>[1,2]</sup>。七十年代以来, Döbel<sup>[3]</sup>、Schweizer<sup>[4]</sup>、Klaster-ska<sup>[5]</sup>、Tanaka<sup>[6]</sup>、张自立等<sup>[7,8]</sup>相继用 Giemsa 显带技术对蚕豆染色体进行过 C-带带型的研究。在这些研究中, 除 Döbel 应用尿素处理和 Schweizer 应用 ASG (Acetic/Saline/Giemsa) 技术, 获得了只有中间带和次缢痕带带型之外, 其他作者无论是用胰酶处理还是用 BSG (Barium hydroxide/Saline/Giemsa) 技术, 都获得相类似的带型, 即既有染色较深的中间带又有染色稍淡的着丝点带和次缢痕带。我们采用一种改进的 HCl-NaOH<sup>[9]</sup> 显带技术, 获得了只有着丝点带和次缢痕带的带型。为了进一步了解盐酸在植物染色体 C-带技术中的作用, 我们将其与 HSG (Hydrochloride/Saline/Giemsa) 技术进行了一些对比实验。这对认识蚕豆染色体的结构异染色质的某些性质, 以及与显带技术的关系, 有一定的参考价值。现将实验结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

1. 蚕豆根尖在对二氯苯饱和水溶液中于室温下处理 5 小时。
2. 水洗几次以后, 用无水酒精—冰乙酸 (3:1) 固定液于 4℃ 固定 12—24 小时。
3. 固定后的材料经 70% 和 50% 酒精转入蒸馏水中, 然后在 0.1N HCl 中于 60℃ 恒温下处理 10 分钟。
4. 用 45% 冰乙酸压片。
5. 冰冻脱盖片, 经 95% 酒精和无水酒精脱水, 历时约 1 小时。
6. 室温空气干燥 24 小时以上。
7. 气干的制片分为以下几种处理:
  - (1) 0.2N HCl, 于室温下处理 40—100 分钟, 水洗 30 分钟, 在 2SSC (0.3M 氯化钠加 0.03M 柠檬酸钠) 溶液中于 62℃ 恒温下处理 40 分钟。
  - (2) 0.2N HCl, 于 60℃ 恒温下处理 10—40 分钟, 水洗 30 分钟, 在 2SSC 溶液中处理同上。
  - (3) 1N HCl, 于 60℃ 恒温下处理 5—10 分钟, 水洗 30 分钟, 室温空气干燥 6 小时, 在 0.07N NaOH 溶液中于室温下处理 50 秒钟。此外, 部分制片以 2SSC 溶液于 62℃ 恒温下处理 40 分钟, 代替 NaOH 的处理程序。
  - (4) 1N HCl, 于室温下处理 5—10 分钟, 后续

(上接第 22 页)

- [11] Kvinnslund S., 1979. *Histochem. J.*, 11: 669.
- [12] Cutler L. S. and Christian C. P., 1980. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 62.
- [13] Hervonen H. and Recharadt L., 1976. *Histochemistry*, 48: 43.
- [14] Recharadt L. and Hervonen H., 1976. *Histochemistry*, 50: 57.
- [15] Åbro A. and Kvinnslund S., 1974. *Histochemistry*, 42: 333.
- [16] Clark R. B., 1978. *J. Cyclic Nuc. Res.* 4: 259.
- [17] Cheng H. and Farquhar M. G., 1976. *J. Cell Biol.* 70: 671.
- [18] Perkins J. P., 1973. In *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 3. p. 1. Eds by Greengard P. and Robison G. A., New York Raven Press.
- [19] 赵孟莲等: 1980. 解剖学报, 11: 289.

步骤同(3)。

8. 水洗 30 分钟, 稍加晾干。

9. 在 2% Giemsa (B.D.H) 染色液 (以 1/15M Sörenson 缓冲液稀释原液而成, pH7.0) 中染色 30 分钟至 2 小时。

10. 自来水洗几次, 置 40℃ 恒温箱中干燥约 1 小时。

11. 制片在二甲苯中透明约 1 小时, 用 DPX 中性胶封片。

### 观察结果

处理(1), 实验结果是 0.2N HCl 于室温下处理 60—80 分钟的范围内, 均可以获得比较清晰的中间带和着丝点带, 次缢痕带染色更深 (图版 I, 1), 带型与张自立等<sup>[7,8]</sup>用 BSG 技术和胰酶处理技术所显示的带型相类似。不过, 在我们的制片中, 每一染色体的两个姐妹染色单体之间往往也为 Giemsa 深染, 因此, 染色体中央显示出一条纵向的带纹, 这个现象的原因尚不清楚。

处理(2), 此处理的目的是为了探明在盐酸浓度相同的条件下, 改变处理温度对显带的影响。实验结果是, 在 0.2N HCl 中, 于 60℃ 恒温下处理 25—35 分钟, 获得了清晰的只具着丝点带和次缢痕带而无中间带的带型。处理 10—20 分钟, 染色体普遍深染, 不显示清晰的带纹。处理延长至 40 分钟, 部分细胞的染色体只见到透明的染色体轮廓而无带纹, 部分细胞染色体可见到染色浅淡而小形的带纹, 这是处理过度的现象。

处理(3), 这是参照 Noda<sup>[9]</sup>处理大麦染色体的 C-带程序, 但有所修改而用于处理蚕豆染色体的显带方法。实验结果, 1N HCl 于 60℃ 恒温下处理 6—8 分钟, 获得了很清晰的只具着丝点带和次缢痕带的带型 (图版 I, 2)。该程序的关键之一是处理温度应准确, 60℃ 上下不应超过 1℃, 其次是经盐酸处理后, 务使染色体空气干燥 6 小时以上, 否则将不能很好地显带。此外, 实验表明, 0.07N NaOH 和 2SSC 溶液的互换处理, 均可以显示相同的带型。

NaOH 处理甚为简便、快速, 而且一般细胞壁不染色, 这是其优点。缺点是显带往往不均匀, 即同一张制片中, 部分细胞的染色体显带非常清晰, 部分细胞的染色体则显带模糊或甚至不显带, 这可能是 NaOH 的处理时间太短促, 作用不均匀所致。2SSC 热溶液处理, 结果比较稳定而均匀。处理时间的可变幅度比较大, 但缺点是容易导致细胞壁也不同程度地着色, 产生干扰。

处理(4), 实验结果所产生的带型与处理(3)相同, 但显带不够清晰, 带形也小, 显带质量远不及处理(3)良好。

### 讨论

1. Schweizer<sup>[4]</sup>曾推测蚕豆染色体存在两种或更多种异染色质。他指出: 第一类是很容易为 Giemsa 或喹吖因显带的; 第二类是“隐蔽了的异染色质 (Masked heterochromatin)”, 它要求修改了的 Giemsa 显带技术才能显示; 第三类是 Giemsa 或喹吖因显带技术不能显示的。他的分类是以用冷冻处理或盐酸-醋酸处理蚕豆染色体后, 产生的“H”片段为基础的, 这种分类是否正确, 还有待进一步证实。根据其他作者和本实验的结果, 可以把已知能为 Giemsa 显带的蚕豆染色体的异染色质, 分为以下三种性质不同的类型: 第一类为位于染色体臂区的中间异染色质, 它可为尿素处理和 ASG 技术所单独显示<sup>[3,4]</sup>; 第二类为着丝点区异染色质, 它可为本实验中的处理(2)、(3)和(4)所单独显示。这两种异染色质既可单独显示, 说明两者有质的差别。但它们又能为 BSG 技术和本实验中的处理(1)所同时显示, 说明两者又有某些相同的性质; 第三类为核仁组织区异染色质 (次缢痕带), 它可为 N-带技术所单独显示<sup>[10,11]</sup>, 但又可为上述各种 C-带技术处理与其他异染色质同时显示。以上三种异染色质既有某些共性又有各自的特殊性。至于是否仍有尚未被识别的异染色质, 例如端粒异染色质等, 这是有待进一步深入研究的问题。

2. 根据前人和本实验的结果, 盐酸和处理温度对蚕豆染色体显带的作用, 归纳起来, 有以下一些特点。

(1) 对显示中间带来说, 无需盐酸处理便可以诱导显带, 如尿素处理和 ASG 技术处理的结果。相对的高浓度盐酸处理, 很容易破坏中间带, 而利于着丝点带的显示, 如处理(3)和(4)的结果。反之, 相对低的浓度的盐酸处理, 则可以同时诱导中间带和着丝点带显示, 如处理(1)的结果。

(2) 在一定的浓度范围内, 浓度相同而处理温度不同, 显带的类型往往不相同, 如处理(1)和处理(2)的结果。Yen 等人<sup>[12]</sup>在燕麦染色体的显带中也得到了相似的结果。但也可以是对显带类型不发生作用, 如处理(3)和处理(4)的结果。由此可见, 前者是温度起决定作用, 后者是盐酸浓度起决定作用。也可以认为, 0.2N HCl 是蚕豆染色体显示 C-带的可变浓度, 即其显带类型随温度的改变而不同。1N HCl 则是显示着丝点带的不变浓度, 温度变化并不能改变其显带的类型。

(3) 在同样的浓度和温度条件下, 处理时间的长短, 看来只对显带的有无及优劣有影响。而与显带的类型无关。上述四种处理都表现出这种情况, 即没有观察到随着处理时间的改变而出现不同类型带纹的现象。

一些作者往往片面强调盐酸对 C-带的可能的破坏作用, 因而在显带操作中尽量避免用盐酸处理染色体, 这就增加了染色体压片的困难, 必需用酶来处理方可制得良好的制片, 这不一定是必要的。其实, 盐酸也有增进显带的积极方面, 或者说用得适当至少不会破坏显带, 关键是根据不同植物选择合适的处理条件。我们很同意 Comings<sup>[13]</sup>在讨论 C-带显带机制时所指出的, 0.2N HCl 的处理, 对于获得良好的 C-带是很重要的。在植物染色体显带技术中, 0.2N—1N HCl 可能是多数植物显带的有效浓度, 而 0.1N HCl 则可能是个安全浓度, 对显带可能作用极缓慢或不破坏异染色质的结

构。在我们对玉竹<sup>[14]</sup>、中国水仙<sup>[15]</sup>、芍药<sup>[16]</sup>和洋葱、蒜等许多植物的显带技术中, 均用 0.1N HCl 于 60°C 处理 8—10 分钟, 无需用酶处理即可获得良好的解离效果, 其后无论用 BSG 技术或 HSG 技术都获得了良好的 C-带, 不仅未发现不良影响, 而且似乎有良好的促进作用。我们认为, 这可以作为大多数植物材料解离的安全条件, 在此条件下, 无需用酶处理便易于压片, 值得推荐。

4. 对同一种植物来说, 显带技术相同或相近时, 可以显示相似的带型, 这可以代表该植物的 C-带带型。但如果显带条件相差较大时, 则往往可以产生不同类型的带型, 这是技术条件不同引起的带型差异, 而不是植物本身的带型差异, 这在进行染色体 C-带带型比较时, 应该加以注意。

#### 参 考 文 献

- [1] 郝水等, 1978. 植物学报, 20(1): 66-70.
- [2] Takehisa, S., 1968. *Nature*, 217(5128): 567-568.
- [3] Döbel, P. et al., 1973. *Chromosoma (Berl.)*, 43: 409-422.
- [4] Schweizer, D., 1973. *Chromosoma (Berl.)*, 40: 307-320.
- [5] Klasterska, I. et al., 1973. *Hereditas*, 79(1): 154-156.
- [6] Tanaka, R. et al., 1975. *Japan, J. Genet.*, 50(2): 163-167.
- [7] 张自立等, 1978: 遗传学报, 5(4): 334-336.
- [8] 张自立等, 1980: 遗传, 2(1): 7-9.
- [9] Noda, K. et al., 1978. *Stain. Tech.*, 53(3): 155-162.
- [10] Funaki, K. et al., 1975. *Chromosoma (Berl.)*, 49: 357-370.
- [11] Matsui, S., 1974. *Japan, J. Genet.*, 49: 93-96.
- [12] Yen Sheng-tian, et al., 1977. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 19(4): 739-743.
- [13] Comings, D. 1978. *Ann. Rev. Genet.*, 12: 25-46.
- [14] 李懋学等, 1980. 植物分类学报, 18(2): 138-141.
- [15] 李懋学等, 1980. 园艺学报, 7(2): 29-37.
- [16] 李懋学等, 1980. 遗传学报, 7(3): 271-275.

观察到铅离子与底物 AMP-PNP 相互作用的证据。Revis<sup>[10]</sup>指出,短时间(5分钟)的温育可以阻止孵育液内 AMP-PNP 的非酶水解。Å bro<sup>[15]</sup>认为采用低浓度的底物和硝酸铅以及低的温育温度,可以避免底物的非酶性水解。Cheng<sup>[17]</sup>的实验表明,在 1 及 2mM 的铅浓度条件下,没有观察到由铅所引起的 AMP-PNP 非酶水解现象;对不含有组织的孵育液做生化测定,其结果仅检查出孵育液中有少量 cAMP 或没检出 cAMP。而 Lemay<sup>[5]</sup>认为 2mM 的铅浓度引起了 AMP-PNP 的非酶水解,产生了少量 cAMP 及相当量的 AMP;他还认为铅引起的非酶水解作用不受 NaF 影响,但是能被 Alloxan 所抑制。Kempen<sup>[6]</sup>的实验证明,孵育液中所产生的 cAMP 是由于非酶机制所致,极少是由酶性形成的。最近 Cutler<sup>[12]</sup>明确提出,铅并不会引起底物的非酶水解;他认为,未提纯底物中的杂质,能和铅起作用,从而导致了一些作者的错误判断。

关于铅对酶活性的抑制问题:铅能抑制酶活性的事实已被肯定。Lemay<sup>[5]</sup>的实验表明,铅是腺苷环化酶的强抑制剂;在 1mM 浓度下,完全抑制了脂肪细胞膜上酶的活性;当降低到 0.2mM 时,能抑制酶活性的 50%;再低的铅浓度则不能产生可看到的沉淀物。Kempen<sup>[6]</sup>指出硝酸铅可完全抑制腺苷环化酶对 AMP-PNP 的分解作用。Cheng<sup>[17]</sup>表明:铅在 1mM 的情况下能保存着 80% 的酶活性,而在 2mM 时仅保留 25% 的酶活性。Cutler<sup>[12]</sup>认为毫克分子浓度的铅并不能完全抑制腺苷环化酶的活性。上述实验结果的差异,究竟是由于组织类别的不同,还是由于铅对不同组织中的已固定和未固定细胞的腺苷环化酶的作用有所不同,或是由于底物的不同纯度及不同保存方法等因素所致,还需要进一步研究来加以解决。

除了上述争论问题之外,大多数作者在不加底物的实验中,均未见到反应产物,但 Kempen<sup>[6]</sup>在缺少底物的实验中观察到了非特异性染色,而在加入底物之后也未见到沉淀物增多

现象。我们在大鼠颌下腺、肾及肝的腺苷环化酶的细胞化学实验中发现,不论在含有和不含底物的孵育液内温育过的组织,均显示出反应产物沉淀<sup>[18]</sup>。

综上所述,通过多数作者的不断地实验和讨论,目前对显示腺苷环化酶的方法(铅法)所存在的缺点,已有相当的改进,例如,为了减少对酶活性的抑制,采用很低浓度的铅(0.75 mM)也看到了酶活性的反应产物<sup>[9]</sup>。但还需进行更多方面的实验加以证实。同时 Kempen 等<sup>[6,18]</sup>在不加底物 AMP-PNP 的实验中观察到组织内有反应物的沉淀,这是一个很值得注意的问题。按理说,在不加 AMP-PNP 底物情况下,组织内不应出现反应沉淀,如果有沉淀颗粒的话,应与腺苷环化酶无关,但由于组织内或组织周围所存在的内源性底物或其他原因,也有可能引起铅沉淀物的出现。在大鼠胰脏<sup>[6]</sup>以及颌下腺、肾、肝组织中<sup>[18]</sup>所观察到的现象,是否也存在于其他组织中,也需要进行工作。此外,排除由于底物(商品出售)不纯所产生的干扰,也是腺苷环化酶的细胞化学技术中值得注意的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Reik L. 1970. *Science*, 168: 382.
- [2] Howell S. L. and Whitfield M. 1972. *J. Histochem. Cytochem*, 20: 873.
- [3] Wagner R. C. et al. 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, 69: 3175.
- [4] Cohen K. L. and Bitensky M. W. 1969. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 169: 80.
- [5] Lemay A. and Jarett L. 1975. *J. cell Biol*, 65: 39.
- [6] Kempen H. J. M. et al. 1978. *J. Histochem. Cytochem*, 26: 298.
- [7] Peterson R. N. et al. 1980. *J. cell Sci*, 43: 93.
- [8] Slezak J. and Geller S. A., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 774.
- [9] Greene R. M. and Pratt R. M., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 924.
- [10] Revis N. W., 1979. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 1322.

(下转第 32 页)