

1. 自然界中的荞麦有二倍体种、四倍体种, 还有二倍体和四倍体的嵌合体种。比前人所记述的, 甜荞、苦荞的染色体数目均为 $2n=16$, 远为丰富。

2. 甜荞的染色体组是具有二倍体和四倍体的细胞混倍群体, 这在本实验中不是偶然出现的, 我们在不同地区的其他甜荞品种上曾多次观察到, 因此, 可以认为甜荞属于嵌合体的生物体。其特征是大粒、矮株、早熟、可以杂交, 并没有发现比一般二倍体荞麦在表现型上发育健壮而晚熟的植株。这与近年在苏联、中国、加拿大、美国所获得的染色体加倍的新荞麦类型, 以及 A. C. Кротов^[4]的实验所记述: “人工加倍类型比普通类型荞麦发育健壮、晚熟且不能杂交”是不一致的。

3. 荞麦的不同种间, 其染色体倍性不同,

随体染色体也有一对和两对之别, Giemsa C 带的带纹也有端粒带的差别, 这些都是细胞学遗传基础的差异, 研究清楚这些问题, 对荞麦的种质资源的遗传、分类和利用均有很大的意义。

参 考 文 献

- [1] 卜慕华, 1981. 我国栽培作物来源的探讨. 中国农业科学, (4):86—96.
- [2] 朱凤绥等, 1982. 植物染色体 F—BSG 分带方法与带型. 遗传, 4(3):25—28.
- [3] 松尾孝嶺監修, 1974. 育種ハンドブック, 959 頁. 養賢堂.
- [4] A. C. Кротов 1963. Гречиха С. 4 I Сельхозиздат.
- [5] Kurata, N. et al., 1978. *Japan. J. Genet.*, 53(4):251—255.
- [6] Kurabayashi, M. et al., 1962. *Am. J. Bot.*, 49, 1003—1026.



使用冷冻复型技术的几点体会*

王 新 明

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

冷冻复型法, 国内已被广泛应用, 但是在制样过程中, 由于不慎和缺乏经验, 以及条件欠佳, 每一步都可使样品出现缺陷和假象, 甚至完全失败。作者从 1981 年到 1982 年, 使用日立公司生产的 Hus-5 GB 镀膜仪、HFZ-1 断裂装置、FE-1 冰冻蚀刻仪等组合装置。共制作冷冻复型样品 50 余次。每一次样品都出现不同程度的缺陷和假象, 完全成功次数较少。1983 年开始, 适当地改变了操作过程和工作条件, 制样成功率逐步得到提高。但是由于仪器的局限性, 在 30 余次制样过程中, 成功率达 50% 左右, 还不够稳定, 需要进一步摸索和提高。在工作实践中, 经多次的成功与失败, 认为应该注意而且比较重要的问题有以下几方面:

一、制作复型膜

喷镀铂碳, 是制作复型膜比较重要的一环,

这一步掌握不好, 就会造成前功尽弃。Hus-5 GB 真空镀膜仪的电极装置采用 3 毫米直径的碳棒, 我们根据碳棒直径粗细所需要的电流大小, 将铂碳电极的碳棒尖端的直径作了相应改变, 以利于减小碳棒尖端电阻值, 增加蒸发能量。

将喷铂珠的滑动碳棒前端制成直径 1.4—1.6 毫米、长度 4 毫米的细条状, 另一根固定在电极上, 其端面磨成 10—15° 斜面。在制作铂珠时, 可取直径 0.1 毫米, 长度 8~10 厘米的铂丝, 绕成 2 毫米长圆圈, 套在滑动碳棒前端面上, 在低真空中烧制铂珠球时, 最好与滑动碳棒端面尽量靠近, 易掌握喷镀铂碳的比例。铂珠和碳蒸发点的位置要与样品各呈 45° 和 90° 角,

* 本工作在实验中得到曾弥白教授具体指导, 作者在此谨表致谢。

二点到样品的距离均为 11 厘米。碳棒斜面必须对准断裂装置孔道,以保证定向复型。在制作铂碳复型膜时应注意加热电流的变化。可先用 10 安培电流,将铂珠电极进行预热,然后加大电流直至铂珠气化。为了避免样品热损伤,可采用间断投影的方法,即将铂碳蒸发 1—2 秒后,迅速降下加热电流,停止蒸发后 2—3 秒,再作蒸发。如此反复 2—3 次,直至铂珠蒸发完毕。在投影时铂碳比例要合适,若铂与碳含量之比过低,将造成图象反差弱。铂碳复型膜形成后还需用碳膜进行加固。在喷镀加固层的电极柱上的滑动碳棒前端制成直径 1 毫米、长度 7—10 毫米的细条状,另一根固定在电极柱上也制成 10—15 斜面。为了提高复型膜的质量,仍采用间断蒸发,每次蒸发 1—2 秒,共蒸发 3—4 次^[1]。

二、注意外界环境条件,提高仪器真空度,保证复型膜的质量

由于样品和样品台冷却都是在室内大气条件下进行的,因而室内温度、湿度对防止样品中产生冰晶和保证复型膜的质量有密切关系。温度最好在 20℃ 以下,湿度在 60% 以下。样品不需要进行预冷处理,可直接和样品台同时在液氮中冷冻,待沸腾终止后,速将样品台放到真空仪中抽真空。样品台从液氮中取出后若在空气中停滞时间过长,则会产生冰霜,影响真空度。为了尽量缩短在空气中的暴露时间,可以采取在液氮沸腾终止时,预先关闭钟罩放气通道和前节泵的阀门,当样品台从液氮中迅速取出放到真空仪上盖好钟罩,立即将支路阀门(By pass)打开,缩短操作时间,这样做比较有效地防止了样品台的冰霜产生,有利于提高仪器真空度^[2]。

三、断裂和蚀刻

样品断裂是在真空冷冻条件下进行的,而样品断裂主要是撕裂作用,所以“切断”冷冻样品的刀刃不需要锋利,但决不能有缺口,刀刃要保持清洁,防止污染样品切面。正确的冷冻断裂,应该是刀口不碰到断裂面,而是让其自

然劈裂开。如果不是劈裂,而是“切开”样品的微细结构将受影响,而且可看到刀痕残迹。

断裂面的好坏和刀座距离与样品杯位置有较大关系。刀座距离又要视样品高度和大小来决定,一般以 1 毫米较合适。但当样品高度、直径小于 1 毫米时,刀座距离最好在 0.3—0.6 毫米,如果样品高度不够,可适当在样品杯中垫一些小滤纸片。我们发现在断裂时枕块未能下落,而不能进行“切断”的话,可以从真空中取出样品,使样品恢复到室温,重新按原来操作步骤进行断裂,经多次观察,效果基本和一次断裂相同。

蚀刻就是将样品断裂面上的冰部分升华。其结果是加强样品的立体感,并有可能揭示生物膜的部份自然表面。冰的升华速度和样品温度、仪器的真空度有着密切关系。每台真空仪的真空度相对是限定的。因此,我们常用真空度是 1×10^{-5} 托到 1×10^{-6} 托。当样品温度为 -110°C ,真空度是 1×10^{-5} 托时,冰的升华速度为每秒 3 \AA ;在 -120°C 冰的升华速度为每秒 0.2 \AA ;而 -80°C 时,冰的升华速度可达每秒 500 \AA 左右,由此可见样品温度在 -120°C 蚀刻面太浅, -80°C 时蚀刻面又太深,变化太大,较合适蚀刻度为 -100°C 左右,但在实际操作时,由于样品温度、仪器真空度控制不当,易出现蚀刻过度现象,如膜结构倒坍破坏细胞的微细结构。根据实践经验,真空度为 1×10^{-5} 托,样品加热时间,就是从 -180°C 上升到 -110°C 控制在 5 分钟内,蚀刻时间为 3—5 分钟左右,立即进行投影和喷镀,这样效果较好。因此在断裂蚀刻时必须掌握温度和真空度的变化^[3,4]。

四、复型膜的腐蚀、清洗和捞取

腐蚀和剥离复型膜,是一项较为细致的操作。样品杯从镀膜仪内取出后,放到重蒸馏水中,更换 2—3 次,弃去样品杯边缘上漂出的铂碳膜。再用细针轻轻将样品从样品杯中拨出来。若样品是动物软组织,则用吸管移到 10% 次氯

酸钠漂白剂内进行腐蚀5—10分钟后,用肉眼可以观察到复型膜已漂浮下来,再继续腐蚀几分钟,使残余组织全部腐蚀干净。然后用重蒸馏水清洗复型膜3—5次,用发环将复型膜捞在400目铜网作镜检。有些复型膜较大,容易卷曲或折叠,可滴入数滴30%丙酮,使膜伸展开来,再捞至铜网上镜检。

复型膜制成后,可以存放一星期左右再进行腐蚀、剥离,效果相同^[5]。

参 考 文 献

- [1] 李文镇等,1982。电子显微学报,16—19。
- [2] 张铁峰等,1980。细胞生物学杂志,2(1):43—45。
- [3] 洪涛等,1980。生物医学超微结构与电子显微技术。p.248—254。
- [4] Stolinski, C. and A. S. Breathnach, 1975, Theory and Principles of the Technique. In: Freeze-Fracture Replication of Biological Tissues: 15—31, Academic Press.
- [5] 龚忠萍,1983。用发环捞取冰冻蚀刻复型膜。细胞生物学杂志,5(3):38。

细胞生物学实验课“酸性磷酸酶显示”的方法改进*

余 其 兴

(武汉大学生物系)

酸性磷酸酶的测定是细胞生物学实验课中一个比较重要的项目,它对于学生掌握酶的细胞化学实验要领,以及了解溶酶体功能方面都具有积极的作用。目前国内资料所介绍的实验方法^[1-3],均是采用动物组织石蜡切片的硫化铅法(Gomori氏,1950)。此种实验技术的原理是可靠的,但其要求石蜡切片的制备条件较高,实验过程时间也较长,这都给此实验项目的开设带来一定的困难。为此,我们对本实验做了如下的改进:(1)实验材料改为采用小鼠腹腔巨噬细胞,省去了烦琐的实验材料准备工作。(2)以中性福尔马林固定,缩短了固定时间。(3)以姬姆萨染液对染,对比清晰,效果良好。根据我们的实践体会,此改进方法具有反应稳定、实验时间短(全过程在2—2.5小时内完成)以及与理论课讲授内容联系紧密等优点,特别是对于目前实验条件较差的教学单位,是一种简便易行的实验方法。

材 料 和 方 法

溶液配制

- (1) 10%中性福尔马林(pH 6.8—7.1) 甲醛 10

毫升,蒸馏水 90 毫升,醋酸钠 2 克。

- (2) 酸性磷酸酶作用液 蒸馏水 74 毫升, 0.2 M 醋酸缓冲液(pH 4.6) 12 毫升, 5%硝酸铅 2 毫升, 3.2% β-甘油磷酸钠 4 毫升。

先将蒸馏水和醋酸缓冲液混合,然后分成大致相等的两份,分别加入硝酸铅和甘油磷酸钠溶液,随后再将两液缓缓混合,边混边搅,搅匀后保存于冰箱中备用。用前加少量醋酸钠调整 pH 为 5.0。

- (3) 2%硫化铵溶液 硫化铵 2 毫升,蒸馏水 98 毫升。

- (4) 姬姆萨染液(1:30) 姬姆萨原液 3 滴,磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 5 毫升。

- (5) 6%淀粉肉汤 牛肉膏 0.3 克,蛋白胨 1 克,氯化钠 0.5 克,蒸馏水 100 毫升,可溶性淀粉 6 克。

高压灭菌 15 磅, 20 分钟,再加入可溶性淀粉,水温浴促使其溶解(无条件时,用煮沸灭菌也行),置冰箱保存待用。

实验步骤

- (1) 取小白鼠一只,每日腹腔注射 6% 淀粉肉汤 1 毫升,连续注射三天;

- (2) 在第三天注射后 3—4 小时,再向腹腔注射生理盐水 1 毫升。过 3 分钟后,抽取腹腔液 0.1—0.3

* 本工作是在周峻副教授指导下进行的。