

长活性, 三次连续传代试验是对高细胞密度, 细胞数增加试验是对低细胞密度, 而微量滴定试验既评价 FCS 对高细胞密度也评价对低细胞密度的促进生长活性。

用细胞数增加试验评价 FCS 对 PMK 细胞的促进生长活性时, 由于 PMK 细胞悬液中含有许多细胞团块, 难以进行精确的计数, 因此需在接种细胞后的 24 小时, 把附着的细胞消化下来计数, 并把它作为接种细胞数。然而微量滴定试验可直接用 PMK 细胞悬液进行。

微量滴定试验的优点是: 1. 技术操作简单。2. 不需使用电细胞计数器。3. 可用肉眼直接判断滴定终点。4. 特别适用于评价 FCS 对 PMK 细胞的促进生长活性。目前作者实验

室已应用微量滴定法常规地测定新生牛血清对恒河猴肾原代细胞和人胚肺二倍体细胞 KMB 17 株的促进生长活性。

参 考 文 献

- [1] Pye, D. 1975, *J. Biol. Stand.* 3: 83—87.
- [2] Puck, T. T. et al. 1956, *J. Exp. Med.* 103: 272—238.
- [3] Goodheart, C. R. et al. 1973, *Appl. Microb.* 26: 525—528.
- [4] Pye, D. 1977, *J. Biol. Stand.* 5: 307—314.
- [5] Babkova, H. & Starek, M. 1979, *J. Biol. Stand.* 7: 275—284.
- [6] Dvorakova, M. & Starek, M. 1980, *J. Biol. Stand.* 8: 107—113.

植物姊妹染色单体区分染色的简易方法

余 其 兴

(武汉大学生物系)

姊妹染色单体区分染色(SCD)是七十年代中期发展起来的染色体处理技术, 因为它涉及了细胞动力学、细胞周期、染色体半保留复制、染色体“单线说”以及染色体畸变等一系列的细胞生物学理论问题, 此外还能用于分析姊妹染色单体互换(SCE)频率, 来检测诱变因素和致癌物质, 所以有关 SCD 的实验技术可作为细胞生物学实验课的更新内容。本文介绍植物 SCD 的一种简易方法, 即以蚕豆根尖细胞为实验材料的 BrdU-Feulgen 法^[1]。据我们实践体会, 采用此法开设实验课具有如下优点: (1) 实验程序少, 时间短, 整个实验可在 2.5—3 小时内完成。(2) BrdU 的掺入是在幼苗悬浮生长过程中进行的, 故不需要进行细胞离体培养等烦琐的实验准备工作。(3) 实验条件简易, 凡已开设过“植物根尖孚尔根压片”实验课的教学单位, 均能更新开设此项实验。

一、溶 液 配 制

(1) 500 μ M BrdU 溶液:

称取 BrdU 粉剂 15.4 毫克, 溶于 100 毫升双蒸水, 装入棕色试剂瓶, 包黑纸避光, 置冰箱(4℃)保存,

(2) 0.05%秋水仙素溶液:

称取秋水仙素粉剂 5 毫克, 溶于 10 毫升双蒸水。

(3) 3.5 NHCl 溶液:

取浓盐酸(比重 1.18)288.8 毫升, 用蒸馏水稀释至 1000 毫升。

(4) 席夫(Schiff's)试剂:

配制方法与常规相同, 但配比有所改变, 即: 碱性品红/水/1NHCl/偏重亚硫酸钠 = 0.5 克/100 毫升/30 毫升/3 克。

二、实 验 步 骤

(1) 将蚕豆种子埋入潮湿的锯木屑中萌发。待初生根长 3—5 厘米时, 剪去根尖生长点和胚芽顶端,

移入盛有清水的青霉素瓶中悬浮水培。置 25℃温箱内，每日换一次清水(10℃以下)；

(2) 当大多数侧根长 0.5—1.5 厘米时，将蚕豆幼苗转入盛有 500 μM BrdU 溶液的青霉素瓶中，继续 25℃黑暗悬浮培养 34—36 小时；

(3) 剪取侧根根端(约 0.5—1 厘米)，浸入 0.05% 的秋水仙素溶液中预处理 3.5—4 小时；

(4) 再转入新鲜的卡诺固定液(冰醋酸—甲醇 1:3)固定 2 小时以上；

(5) 放在 40℃(恒温水浴)的 3.5 NHCl 中水解 40—55 分钟；

(6) 分批取出，以席夫试剂染色，直至根尖呈现深紫红色，约 45 分钟左右；

(7) 将染色后的根端，放在干净的载玻片上，除去未着色部分，用镊子和解剖针将根尖捣碎拨散，加一小滴 45% 醋酸，盖上盖玻片，按常规压片技术制片；

(8) 镜检观察分染效果和统计染色单体互换(SCE)频率。

三、结果观察

选择染色体分散的离散细胞进行观察，在高倍镜下即能看清姊妹染色单体间呈现明显的浓淡差别。浓染的是 BB-染色单体(即 DNA 双链均有 BrdU 掺入)，淡染的是 BT-染色单体(见图 1)。部分染色体上出现自发的姊妹染色单体互换，凡染色单体端部出现的互换计为一个 SCE，在中部出现的互换计为两个 SCE。



图 1

四、注意事项

(1) BrdU 的掺入是显示 SCE 的重要基础。由于植物种子萌发过程中自身合成的胸苷与外来的 BrdU

发生竞争性矛盾，所以若处理不当往往会造成掺入不进，导致实验失败。因此一要注意选择饱满、发芽势强的蚕豆种子；二要注意抓住掺入的有利时机，一定要掌握在大多数侧根长 0.5—1.5 厘米时开始掺入(从蚕豆吸水萌动算起，一般是第 7—9 天)，因为此时幼苗的侧根和次生芽正达生长最旺盛阶段，幼苗内胸苷供需矛盾加剧，所以 BrdU 容易掺入取代。

(2) 温稀酸的延长水解是本实验的关键步骤。因为 BB-染色单体的耐水解能力比 BT-染色单体稍强，只有在合适的水解条件下它们才能显示染色差别，因此对于水解的温度和时间应严格控制。温差不能超过 ±0.5℃，水解 40 分钟后，以 5 分钟间隔分四批取出染色。通常较明显的区分染色效果出现在水解 45—50 分钟处理中。

(3) 本实验所采用的席夫试剂配方，比常规加大了偏重亚硫酸钠以及盐酸的用量，这样有助于加强区分染色的对比反差。如果镜检感觉染色仍较淡，还可用醋酸—乳酸—地衣红复染，增强染色效果，其方法是：将地衣红染液滴在盖玻片一侧，待其渗进复染 15 分钟，再以吸水纸覆上轻压。

(4) 学生实验进行临时封片镜检时，可在 45% 醋酸中加入 5% 的甘油，能减缓片中的水分干燥。对于分染效果好的玻片标本，可用冷冻法脱盖片，再以中性树脂封固制成永久片。

(5) 采取适宜的处理时间，抓住细胞分裂的高峰，对实验结果的影响也至关重要。我们通常是采用以下两组处理时间，可供参考：(a) 19:30—21:00 开始掺入，第三日 7:30 秋水仙素处理，11:30 固定，14:00 后进行孚尔根反应。(b) 7:30 掺入，次日 18:00 秋水仙素处理，22:00 固定过夜，第三日进行孚尔根反应。

(6) 关于实验溶液的重复使用问题：固定液、水解液和 BrdU 溶液都只能使用一次，而席夫试剂和秋水仙素溶液均可重复多次使用。

参考文献

- [1] 余其兴. 1984. 武学报(自然科学版), 3: 109—112.
- [2] 张自立. 1982. 遗传学报, 9(5): 357—362.
- [3] Vosa C. G., 1981. Caryologia, 34 (3) 357—361.