

行较好；如果是花粉，那么在戊二醛固定后经慢速离心(500—800 g)5分钟，弃固定液，在花粉中可加入适量半凝状态的3%琼脂，琼脂凝固后取花粉密度较高的部分，把它切成一定的大小和形状，然后再进行下一步的处理；如果是愈伤组织，修块可在戊二醛固定前后进行。总之，由于植物材料种类多，变化大，而同株植物中各组织之间其含水量及软硬度相差也很大，其处理方法也必须作相应的修改。要做好冷冻超薄切片需要实践和体会，主要还是要靠自己的摸索。

参 考 文 献

[1] Hodson, S. and Williams, L., 1976, *J.*

Cell Sci., 20, 687.

[2] Bernhard, W. and Viron, A., 1971, *J. Cell Biol.*, 53, 798—808.

[3] Hall, J. L., 1978, *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam-Oxford-New York, 26—34.

[4] 徐伟, 门绍杰, 1980, *生物化学与生物物理进展*, 4, 18—22.

[5] Tokuyasu, K. T., 1973, *J. Cell Biol.*, 71, 894—906.

[6] Sjöstrand, F. S. and Elfvin, L. G. 1964, *J. Ultrastruct. Res.*, 10, 263—292.

[7] Roomans, G. M. and Seveus, L. A. 1976, *J. Cell Sci.*, 21, 119—127.

[8] Christensen, A. K., 1971, *J. Cell Biol.*, 51, 772—804.

[9] Tokuyasu, K. T. and Singer, S. J., 1976, *J. Cell Biol.*, 71, 894—906.

信息核糖核酸直接在琼脂糖凝胶上的原位杂交检测

何 全 品

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

核酸印迹法是已被广泛用于检测各种核酸分子及其片段的重要工具。直接在琼脂糖凝胶上做DNA分子杂交取得了很好的结果^[1,2,3]，但应用于RNA的原位杂交测定的报道还很少。

我们用此方法检测了大鼠肝癌BERH-2甲胎蛋白信使核糖核酸，结果良好。现将方法介绍如下：

(1) 将BERH-2细胞质总RNA(5—40微克，递

增5微克)在1.2%琼脂糖凝胶(含溴乙啶0.5微克/毫升, 8×10×0.3厘米)上用磷酸缓冲液(0.01M, pH 7.0)在30伏电压下电泳3—4小时；当指示染料进入凝胶后，从阴极到阳极方向循环电极液。

(2) 电泳结束并作紫外荧光照相后，立即把凝胶浸泡在95%乙醇中30分钟，接着把凝胶铺在透析膜或玻璃纸上并在其上覆盖滤纸，用吸水纸轻压吸干，或者在凝胶干燥器上干燥。

(3) 把完全干燥的凝胶(薄如滤膜，具韧性)装入塑料袋，并注入预杂交液(5×SSC/5×Denhardt's/10 mM EDTA/0.1% SDS/100微克酵母转移RNA/毫升)在42℃水浴中预杂交2小时，接着添加放射性同位素标记的探针cDNA_{AFP1}，杂交16小时。

(4) 洗涤，在2×SSC/0.1% SDS溶液中，42℃洗涤2次，每次30分钟；又在0.1×SSC/0.1% SDS溶液中室温洗涤2次，每次15分钟，然后干燥。

(5) 把干燥凝胶贴在X-光片上并加增感屏，放在-70℃冰箱曝光5天，洗片子。

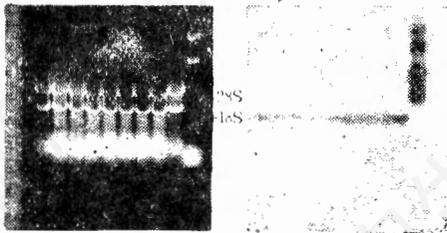


图1 BERH-2细胞质总RNA的凝胶电泳紫外荧光照相(A)和它与cDNA_{AFP1}的凝胶原位杂交放射自显影图谱(B)。右侧一行样品为pBR₃₂₂-AFP1克隆DNA

(接126页)

之间存在一个动态的变化过程。在胞质分裂过程中,成膜体微管活跃的变化与细胞板的形成和壁物质的运输显然也是密切相关的。早前期核被膜荧光区的性质和意义也尚不清楚。所有这些问题都值得进一步研究。

图版说明

大蒜根尖细胞的间接免疫荧光照片,使用兔抗猪脑微管蛋白血清,羊抗兔IgG-FITC二级抗体。Olympus BH-RFL-W 荧光显微镜观察,激发波长490 nm,阻挡滤光片0530。

图 1×600,图 2—12×1200

- 图 1 一个伸长细胞,示周缘微管。
 图 2 一个有丝分裂前期细胞,示发育早期的早前期带。
 图 3—4 前期细胞,示早前期带和核被膜荧光。
 图 5 一个前期细胞,示核表面聚合形式的微管。
 图 6 一个前期细胞,示纺锤体极在核表面形成。
 图 7 一个中期细胞,示对角分裂细胞的纺锤体。
 图 8—9 后期细胞,示有丝分裂后期纺锤体,可见纺锤体极丝(图 8)。
 图 10 一个末期细胞,示发育早期的成膜体微管。
 图 11 一个末期细胞,示扁桶状成膜体微管,中间有一不发光的环。
 图 12 一个末期细胞,示胞质分裂后期的成膜

体微管。

参 考 文 献

- [1] Gunning, B. E. M. & A. R. Hardham, 1982, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 651-698.
 [2] Lloyd, C. W., 1982, *Cytoskeleton in plant growth and development*. London: Academic.
 [3] Weber, K. et al., 1975, *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 459-463.
 [4] Osborn, M. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77: R 27-R 34.
 [5] Franke, W. W. et al., 1977, *Cytobiologie*, 15: 24-48.
 [6] Wick, S. M. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 89: 685-690.
 [7] Wick, S.M. & J. Duniec, 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 235-243.
 [8] Wick, S. M. & J. Duniec, 1984, *Protoplasma*, 122: 45-55.
 [9] 简令成、孙龙华、孙德兰, 1984, 小麦叶片细胞周质微管的研究, *实验生物学报*, 17: 149-159
 [10] Shelanski, M. L. et al., 1973, *proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 765-768.
 [11] Laemmli, U. K., 1970, *Nature*, 227: 680-685.
 [12] Valk, P. Van der. et al., 1980, *protoplasma*, 105: 27-43.

(接封三)

pBR 322-AFP₁ 由 Tilghman 构建, 周光宇教授赠送。用 Hind III 切出其中的 cDNA_{AFP₁} 并按 Rigby 等^[4]方法作缺口移位标记。

对 RNA, 特别是对 mRNA 的保存和检测, 此法具有以下优点: (1) 电泳前 RNA 不需用醛等试剂变性, 而试剂变性有时重复性较差; (2) 电泳后不需转移, 而转移前的处理(微碱溶液)往往容易引起 RNA 的降解, 并在转移过程中大分子 RNA 在胶上很难转移完全, 小分子 RNA 又会穿过薄膜而丢失。原位杂交图谱表明, RNA 的杂交带紧密清晰, 没有扩散现象。

此外, 在实际操作过程中, 我们还有以下几点体会: (1) 用乙醇浸泡凝胶既可防止核酸的降解而利于核酸的保存, 又可加快凝胶的干燥进程。(2) 如果在凝胶尚未完全干燥前动用, 容易使它变成皱缩不平, 即使发生了这种情况, 还可将它重新浸泡而得到纠正。

(3) 用预杂交液简短地平衡凝胶, 可使本底更清楚, 也可维持杂交液的体积。(4) 凝胶在干燥过程中会稍微膨胀, 但这不会影响杂交结果, 在作放射自显影之前把凝胶充分干燥可以保持杂交信号的强度和降低本底。(5) 凝胶的干燥用真空干燥法比吸水干燥法更有利于核酸样品的保留。(6) RNA 不经醛化及碱处理仍可检测。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
 [2] Alwine, J. C., et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350-5354.
 [3] 张志新等, 1985, *细胞生物学杂志* 7, 171-174.
 [4] Rigby, P. W. J., et al., 1977, *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.