

# 用显微荧光术定量蚕豆染色体 DNA

孙天恩 赵宇

(武汉大学分析测试中心)

无论对基础理论研究还是对生物工程应用研究,动植物各分类单位,各个物种二倍体细胞核的 DNA 含量肯定是一个十分重要的参数。已积累的大量实验数据使我们了解到,不仅各级分类类群生物体的二倍体细胞核遗传物质的多少有很大差别,就是同一个体不同部位的胞核 DNA 的含量也不尽相同,这种现象在被子植物细胞核内表现尤为突出。为了给植物细胞学和生物化学家提供一些基本数据,1976年 Bennett 等收集了 750 种被子植物细胞核 DNA 含量的数据,1982 年又通过各种方法收集到 281 种不同倍性水平的被子植物染色体组型及 DNA 含量的资料。为了便于比较和运用这些资料,他将 DNA 含量的数据全部都转换成绝对单位(pg)。并注明了所使用的标准细胞(即:校正标准)和校正方法<sup>[1]</sup>。

然而,时至今日还没有见到有哪位作者收集到如此众多物种的单个染色体 DNA 含量的资料。主要原因恐怕在于方法上的困难。一是由于制备植物染色体足够分散的标本在技术上还有一定的困难,二是在测定方法上的困难,即在分散度有限的情况下分别测定染色体 DNA 的含量确实不容易。1971 年 Chooi 在评价蚕豆属 45 个种染色体 DNA 含量变化时,使用的是胞核 DNA 总量除以该物种染色体条数所得的平均数<sup>[2]</sup>。1976 年 Bennett 在论述 DNA 含量、地理纬度与农作物分布的关系时,所使用的也是平均数<sup>[3]</sup>。如此处理虽然能说明一些问题,但也有明显不合理的地方。

1983 年 Rain 和 Rees 用 Vicker M 86 显微光密度计测定了用 Feulgen 染色的,12 个蚕豆品种中期相染色体。求得它们胞核内 DNA 在

各对染色体上的分布状况<sup>[4]</sup>。这个工作使植物细胞定量研究达到了一个新的水平。如上所述,吸收法测量多有不便之处,本文采用荧光光度测量方法,来定量蚕豆染色体 DNA 的含量,较吸收法简便、准确、快速。

## 材料和方法

材料:武汉市农业科学研究所选育的蚕豆品种优系五号(*Vicia faba*,  $2n = 12$ )。

1. 首先测定细胞核 DNA 含量 按 Feulgen 法染蚕豆根尖细胞,以成年公鸡红血细胞做标准细胞(其 DNA 含量为  $2.8 \times 10^{-12}$  克)。待测细胞与标准细胞涂在同一张载片上,以保证测量的准确。重复三次。用细胞光度计 UNIVAR 扫描法,每个样品扫描细胞核不少于 50 个。所得数据经计算求得该蚕豆品种 DNA 含量为  $31.65 \times 10^{-12}$  克。

然后进行染色体的制片与测量。

2. 制片 按常规法培养蚕豆种子,待侧根长至 2—3 厘米,剪取侧根。室温下(20℃左右)用 0.05% 秋水仙碱水溶液处理 3 小时。用蒸馏水洗尽秋水仙碱。然后用 Carnoy 固定液(无水酒精:冰醋酸 = 3:1)固定 2—12 小时。立即压片或放入 70% 酒精中,置冰箱(4℃)保存备用。

3. 染色 用 0.25 毫升的注射器给每张压片加 DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindole, 2HCL, SERVA)。水溶液(0.5 微克/毫升 pH 7.0)数滴。并用注射器针头将染液展开,使其均匀浸润样品区。染色 2—5 分钟。然后用蒸馏水轻轻冲洗五次,以除尽多余 DAPI 液。将片子甩干或于无水酒精中脱水。最后用 pH 7.0 的 Mellvain 磷酸缓冲液-甘油(1:1)封片。置于暗室或冰箱(4℃)中待测。

注:本文承蒙杨弘远教授审阅并提出宝贵意见,彭鹏同志提供试验材料,特此致谢。

表1 优系五号(*Vicia faba*)六对染色体DNA含量(微微克)

DNA 含量 细胞数	染色体 编号	1	2	3	4	5	6
		1	8.42	5.54	5.13	4.34	4.15
2	9.46	5.03	4.65	4.49	4.27	3.73	
3	8.55	4.81	4.78	4.62	4.46	4.43	
4	9.12	5.19	5.16	4.94	4.27	3.04	
5	8.51	5.03	4.75	4.65	4.49	4.21	
6	8.86	4.81	4.72	4.53	4.49	4.24	
7	9.12	4.78	4.56	4.53	4.43	4.27	
8	8.74	5.19	4.68	4.53	4.43	4.08	
9	9.40	5.60	4.91	4.27	3.96	3.51	
10	9.78	4.75	4.59	4.40	4.51	3.96	
11	10.35	4.53	4.27	4.24	4.18	4.08	
12	10.35	4.53	4.37	4.21	4.15	4.02	
13	8.99	4.87	4.75	4.62	4.49	3.92	
14	9.27	5.06	4.65	4.46	4.18	4.02	
15	9.12	5.25	4.68	4.43	4.15	3.99	
16	9.72	5.25	4.65	4.30	4.02	3.67	
17	9.50	4.78	4.62	4.46	4.34	4.02	
18	9.31	4.94	4.75	4.49	4.30	3.86	
19	9.37	5.10	4.68	4.46	4.24	3.77	
20	9.46	4.94	4.62	4.56	4.46	3.64	
21	9.62	4.87	4.59	4.46	4.15	3.99	
22	8.61	5.54	4.97	4.56	4.37	3.61	
23	8.70	5.44	5.06	4.56	4.08	3.80	
24	10.25	4.78	4.37	4.27	4.05	3.92	
$\bar{x} \pm \sigma$		9.27 ± 0.56	5.03 ± 0.30	4.71 ± 0.22	4.47 ± 0.16	4.26 ± 0.16	3.91 ± 0.29

4. 染色体DNA荧光定量测量 用UNIVAR (Reichert-Jung, Austria)显微荧光光度计测量待测样品各个染色体的荧光强度。落射照明用汞灯(CS 200-4, Philips)。激发滤片355 nm, 第一阻挡滤片

418 nm, 第二阻挡滤片500 nm, 物镜40×, 目镜10×。荧光强度测量操作程序和数据的收集处理均由Commodore计算机荧光定量软件控制。共测量了24个蚕豆中期相细胞的288条染色体。

5. 将每个蚕豆中期相的染色体测得数值按核型分为六对。因为该细胞二倍体核 DNA 含量已知, 故可将每个细胞内 6 对染色体荧光强度测量数值换成 DNA 绝对值。然后对 24 个中期相细胞染色体进行统计学处理。

### 结果和讨论

结果见表 1 所示, 蚕豆(*Vicia faba*)品种优系五号第一对染色体 DNA 含量为  $9.27 \pm 0.56$  皮克(微微克), 大约为其它五对染色体 DNA 含量的 2 倍, 根据 Raina 和 Rees 的分析, 这种现象是由于罗伯逊融合(Robertsonian fusion)造成的。即该品种染色体组本应是  $2n = 14$ , 即  $n = 7$ 。由于两个具顶端着丝粒的 2 条染色体融合, 导致  $n = 6$ 。该染色体在形态大小和 DNA 含量上皆约为其它各对染色体的两倍。第二对至第六对染色体 DNA 含量相差无几。这五对染色体的大小差异亦甚微。这个结果与 Rees 测定的 *V. faba sep minor* ( $2n = 12$ ) 的结果 Raina 十分接近, 该品种最大的一对染色体 DNA 含量为 7.99 皮克(微微克)(其余五对分别为 4.03, 3.97, 3.94, 3.75, 3.39 皮克(微微克)), 亦为其它五对染色体的二倍。

我们知道, 蚕豆属内诸种( $n = 5, 6, 7, 12, 14$ )的二倍体核 DNA 数量变化很大, 少的像 *V. cordata* 只有 3.95 皮克(微微克), 多的如 *V. faba* 达 54.8 皮克(微微克)。相差近 14 倍<sup>[3]</sup>。值得注意的是该属内各个种的二倍体细胞核 DNA 总量增加。均由于染色体组 DNA 增加的结果。但比较染色体组内各个染色体 DNA 量的分布状况时发现, 每条染色体增加的 DNA 数量是相当的。即小染色体与大染色体增加的 DNA 是一样多。DNA 这种等量分配的结果必然使染色体组内的染色体变化更加“匀称”(symmetrical), 这种现象在高等植物的其它属如毒麦属(*Lolium*)、羊茅属(*Festuca*)<sup>[6]</sup>和香豌豆属(*Lathyrus*)<sup>[6]</sup>中亦有报道。

做为一种研究染色体的材料, 蚕豆具有许多优点。它的细胞核较大, DNA 含量高, 染

色体数目少而体积又较大。材料来源丰富, 培养也较简便。用 Feulgen 细胞分光光度法扫描染色体的 DNA 含量虽然可行, 但对染色体制片要求较高, 即每个中期相的各个染色体必须分散得较开, 否则难以准确测量。我们开始就是用此法测定, 总遇到相邻染色体的干扰, 结果误差较大。后改用荧光法做定量测定。从以上结果的统计分析看, 比较好地解决了这个问题。主要原因是荧光法采用的是对标本的荧光强度进行定位(将测量光栏套在单个染色体上)定时间扫描, 即在空间与时间上都固定不变的情况下, 收集标本荧光强度的变化(类似一个时间分辨)。从而求得染色体的 DNA 含量。而吸收扫描法在测量过程中, 测量光栏是按预置参数在一个较大的范围内, 不断移动完成其数据收集过程。

### 摘 要

本文的目的在于探索一个简便而准确地测定单个染色体 DNA 含量的方法。作者选用蚕豆(*Vicia faba*,  $2n = 12$ )根尖细胞做材料。第一步用 Feulgen 染色及显微吸收光度术测得该品种二倍体胞核 DNA 含量为 36.15 皮克(微微克); 第二步用 DNA 特异性荧光染料——DAPI 标记该细胞的染色体, 然后在 UNIVAR 显微荧光计上测量各条染色体的荧光强度。经简单换算和统计学处理求得六对染色体 DNA 分布: 9.27、5.03、4.71、4.47、4.26、3.91 皮克(微微克)。

### 参 考 文 献

- [1] Bennet, M. D. 1982, *Proc. R. Soc. Lond. B.* 216: 179—199.
- [2] Chooi, W. Y. 1971, *Genetics* 68 (2): 195—211.
- [3] Bennett, M. D. 1976, *Environmental and Experimental Botany*. 16: 93—108.
- [4] Raina, S. N. and Rees, H. 1983 *Heredity*, 51(1) 335—346.
- [5] Seal, A. and Rees, H. 1982, *Heredity*, 47: 179—190.
- [6] Narayan, R. K. J. 1982, *Evolution*, 36: 877—891.