

一种高效稳定的甘蓝染色体制片新方法

卢 军, 李乐玉, 朱利泉, 王小佳

(西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716)

摘 要: 介绍一种高效稳定的甘蓝根尖染色体制片新方法, 该方法结合传统的压片法和去壁低渗法优点, 制片取得了良好的结果: 染色体中期分裂相多, 染色体分散良好, 形态特征清晰, 背景干净。制片可应用于染色体核型分析、分带、荧光原位杂交, 以及显微切割等细胞遗传学操作。

关键词: 甘蓝; 染色体; 制片

中图分类号: S 635; Q 94-331 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2008)09-0148-03

甘蓝 (*Brassica oleracea*) 是芸薹属植物的 3 个基本种之一, 包括各种生态型及许许多多人工杂交品种, 是一种在世界范围内得到广泛种植的重要蔬菜, 它在人类生活中发挥着日益重要的作用。无论是从进化角度还是从育种角度考虑, 均需要对其进行各种细胞遗传学研究^[1]。甘蓝的染色体很小并且在细胞分裂期的收缩程度较其它很多植物的染色体更高和更均一, 细胞膜外被有由纤维素、果胶等组成的细胞壁, 增加了染色体制片的难度, 因此对它的细胞遗传学研究比较困难。研究出稳定、清晰度更高的染色体制片技术迫在眉睫。

目前, 常用的染色体制片技术有两种, 即压片法^[2]和去壁低渗法^[3,4], 前者存在操作繁琐等问题, 在涂片前要有解离、媒染等过程, 使根尖软化、上色, 然后压片, 容易造成细胞质残留过多, 在处理某些细胞壁较硬和难以软化的材料时, 不易获得良好的压片; 后者虽可以解决细胞质残留和染色体分散问题, 但染色体伸展不充分, 也常常因制片操作上不够熟练, 造成制片结果非常不稳定。

该研究以甘蓝根尖为材料, 结合两种制片技术优点, 经过反复试验操作, 优化操作程序, 探索出一种适合于甘蓝根尖染色体制片的最佳新方法, 取得了良好的制片结果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料: K-172, 典型自交不亲和甘蓝, 由西南大学农学与生物科技学院殷家明副教授提供。

1.2 主要仪器

GXZ 型智能光照培养箱、水浴锅、Nikon Type 120

第一作者简介: 卢军(1982-), 男, 四川德昌人, 硕士, 现从事生物学与分子生物学研究工作。E-mail: junlu821215@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671429)。

收稿日期: 2008-03-18

生物显微镜、Nikon Digital Sight 成像系统。

1.3 主要试剂

0.002 mol/L 8-羟基喹啉、卡诺固定液(乙醇: 乙酸=3:1, V/V)、0.0075 mol/L KCl 溶液、0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH=4.6)、卡宝品红染色液。混合酶解液(2.5%纤维素酶+2.5%果胶酶), 2.5%(W/V)纤维素酶和 2.5%(W/V)果胶酶用 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH=4.6)配制, 现配现用。纤维素酶(Cellulase)和果胶酶(Pectinase)均购自上海生物工程公司。

1.4 根尖中期染色体制片新方法

A) 根尖材料的制备: 培养皿(直径 9 cm)预先铺了一层润湿的滤纸, 润湿度以刚好润湿不滴水为准, 将种子置于培养皿中, 每个培养皿以 30 粒种子为宜, 放入 GXZ 型智能光照培养箱中避光暗培养, 培养温度为变温处理, 白天 25℃, 夜间 23℃。待根尖长度在 0.3~0.5 cm 左右时(培养 45 h)取材。B) 预处理: 将切取的新鲜培养根尖, 放置于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉中 20℃下预处理 1.5 h。C) 前固定: 将预处理后的根尖用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 然后用卡诺固定液(乙醇: 乙酸=3:1)5℃固定 4 h。D) 前低渗: 固定后的根尖用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 以除掉卡诺固定液, 25℃下放置于 0.0075 mol/L KCl 溶液前低渗 30 min。E) 酶解离: 前低渗后的根尖用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 以除掉 KCl 溶液, 然后加入混合酶解液(2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶以体积比 1:1 混合), 37℃处理 70 min, 酶解过程中轻轻摇动 2~3 次, 充分解离。F) 后低渗: 酶解离后的根尖用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 以除掉混合酶解液, 于 0.0075 mol/L KCl 溶液后低渗 30 min。G) 后固定: 将后低渗后的根尖用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 然后用卡诺固定液(乙醇: 乙酸=3:1)5℃固定 4 h。H) 染色及压片: 吸去 KCl 溶液, 用双重蒸馏水清洗根尖 3~4 次并浸泡 0.5 h, 以除掉 KCl 溶液, 用镊子夹

取一条根尖组织放置在洁净的载玻片上, 滴加 5 ~ 10 μ L 卡宝品红染色液, 盖上盖玻片, 镊子尖敲片, 然后在酒精灯下烘烤片刻, 用手均匀用力压片。D) 镜检观察、拍照: 在 100 倍生物显微镜(Nikon Type 120)观察染色体的制备效果, 并用 Nikon Digital Sight 成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 传统方法的制片效果

体细胞染色体的制片, 历来采用压片法和去壁低渗法。压片法^[5]人工外机械压力使染色体分散压平, 细胞

重合现象严重, 在处理细胞壁较硬和难以软化的甘蓝材料时, 细胞质残留较多, 且染色体易重叠, 不易分散开, 制片结果不理想(图 1)。去壁低渗法^[4]制片效果较好, 细胞质残留少, 染色体分散良好, 但是染色体伸展不充分(图 2), 制片要严格控制实验条件, 较为繁琐, 常常因制片操作上不够熟练, 造成制片结果非常不稳定, 费用也较昂贵。因此, 需要探索出一种适合甘蓝的高效、稳定、经济的新制片方法。

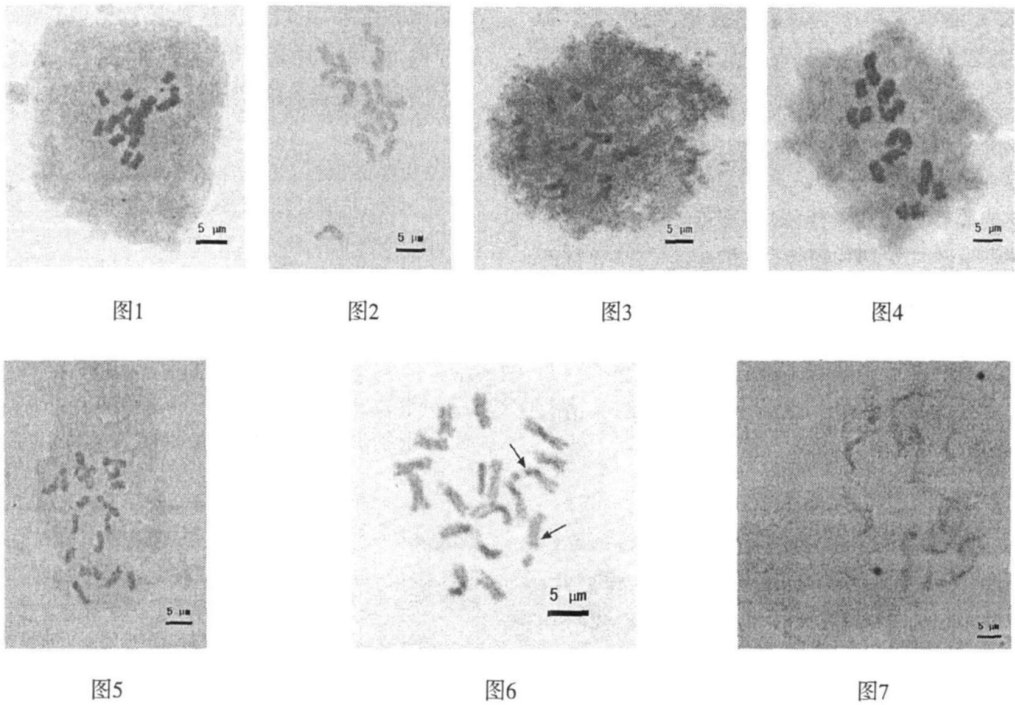


图 1 常规压片法处理的染色体图像

图 2 去壁低渗法处理的染色体图像

图 3 1% 纤维素酶和 1% 果胶酶于 37℃ 下酶解处理的染色体图像

图 4 1.5% 纤维素酶和 1.5% 果胶酶于 37℃ 下酶解处理的染色体图像

图 5 2% 纤维素酶和 2% 果胶酶于 37℃ 下酶解处理的染色体图像

图 6 2.5% 纤维素酶和 2.5% 果胶酶于 37℃ 下酶解处理的染色体图像

图 7 3% 纤维素酶和 3% 果胶酶于 37℃ 下酶解处理的染色体图像

2.2 新方法的探索

2.2.1 根尖取材的探索 取材是染色体制片的先决条件, 因此要选择处于细胞分裂旺盛期的根尖作为制片材料。研究的甘蓝根尖在智能培养箱中避光培养, 采用变温处理更适宜于根的正常生长。染色体制片过程中, 取材时选用生长到 0.3 ~ 0.5 cm 长时的根尖作为制片材料, 效果最佳, 此时为细胞分裂的旺盛期, 显微镜观察发现, 染色体分裂指数很高, 在同一张制片上观察到大量具有中期分裂相的细胞, 而根尖过长则因处于分裂期的细胞减少而影响制片效果。

2.2.2 预处理的探索 预处理的目的是抑制细胞分裂时纺锤体的形成, 但不妨碍分裂前期的正常进行, 这样便可获得较多的中期分裂相。试验通过常规的染色体

制备方法即常规的冰冻预处理方法与 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉处理方法比较发现, 常规的冰冻预处理方法对甘蓝染色体的伸展较差, 边缘较模糊, 这种方法适于处理小麦^[6]这类染色体大的植物。而染色体较小的甘蓝适于用 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉 20℃ 处理 1.5 h, 这样得到的染色体伸展良好, 可以得到较好的效果。

2.2.3 酶解的探索 酶解的目的是利用果胶酶和纤维素酶来处理植物根尖分生组织细胞, 消化由果胶质及纤维素构成的细胞壁, 降解细胞内的蛋白质等杂质成分, 使染色体呈游离态, 更易于分散、压平, 从而提高染色体的清晰度和识别率。因此, 酶解是制片技术的关键。该研究在酶解最重要的影响因素酶浓度上设置了 5 个水平: 1% (W/V) 纤维素酶和 1% (W/V) 果胶酶、1.5% 纤维

素酶和 1.5%果胶酶、2%纤维素酶和 2%果胶酶、2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶、3%纤维素酶和 3%果胶酶。当使用 1%纤维素酶和 1%果胶酶酶解时,染色体分散良好,但是细胞质残留太多(图 3);使用 1.5%纤维素酶和 1.5%果胶酶酶解时,细胞质残留也较多(图 4);使用 2%纤维素酶和 2%果胶酶酶解时,大部分细胞质被降解(图 5);使用 2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶酶解时,细胞质基本被完全降解,染色体伸展良好,酶解效果理想(图 6);使用 3%纤维素酶和 3%果胶酶酶解时,细胞质被降解的同时染色体也被降解(图 7)。可见,随着酶浓度的增加,细胞质及细胞壁碎片的降解越完全,当纤维素酶和果胶酶浓度都达到 2.5%(W/V)时,细胞质及细胞壁碎片降解完全,酶解效果最佳,如果酶浓度继续增加,染色体也要被降解。

2.3 新方法的制片结果

该研究按照新方法的操作程序,获得了优良的前中期染色体制片图像。其制片图像(图 6)中染色体数量齐备(甘蓝根尖 $2n=18$),分散性好,形态清晰可辨,伸展良好并显示一对染色体带随体(黑色箭头所示),着丝点位置清晰,背景干净,细胞质和细胞壁碎片残留极少。制片可应用于染色体核型分析、分带、荧光原位杂交,以及显微切割等实验。

3 讨论

植物的染色体制片方法已做了许多研究^[7-9],用这些方法都无法在甘蓝植物中获得优良的染色体制片。原因在于对于不同的植物材料,其细胞类型和组成存在很大差异,所以制片技术中的操作没有相同的标准,通常要根据各自的具体情况,通过试验以确定制片的最佳条件。该试验采用的新方法具有以下几个优点:①材料采用避光变温培养,待根长到 0.3~0.5 cm 长度时取材,此时有大量正在分裂的细胞;②双固定处理。固定的目的是尽快杀死细胞,并使染色体结构尽可能保持不变,

酶解前增加一次固定还可以防止酶解过程中因细胞膜失去半渗透性部分染色体分散到细胞质中去,因此增加了前固定的细胞分裂相常常较多。后固定保持染色体结构的完整性;③ 37℃下,2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶酶解 70 min 可基本除去细胞质和细胞壁碎片等杂质,制片背景干净,染色体保持良好形态;④材料在酶解离后,由于根冠和根尖其他部分细胞性质不同,两者容易分离,这样可以轻易地将根冠剥除;⑤用镊子尖敲片,染色体容易分散开,防止染色体的重叠。此外,此方法具有结果高效稳定、重复性强、成本低的特点。根据该研究的试验结果,可以认为这种甘蓝染色体制片的技术比较成熟,可用于甘蓝植物细胞遗传学的研究进行推广,该方法也可在芸薹属其他植物上进行尝试。

参考文献

- [1] 王太露,吴春红,黄进勇,等.甘蓝 rDNA 及 Cot-1DNA 荧光原位杂交及其核型分析[J].武汉大学学报(理学版),2006,52(2): 230-234.
- [2] Nishihayashi S. methods of chromosome observation in cultured cells and regenerated plants[J]. Plant Tissue Culture Letters, 1990, 7(2): 127-129.
- [3] Yuji Ito, Mitsuo Omura, Hirohisa Nesumi, et al. Improvement of preparation and observation methods for citrus chromosomes[J]. Bull Fruit Tree Res Stn, 1992, 23: 57-66.
- [4] 李懋学,张赞平.作物染色体及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996: 1-40.
- [5] 曲敏,张延明,李集临,等.观察长穗偃麦草(*Thinopyron elongatum*)体细胞染色体制片的好方法[J].分子植物育种,2007,5(3): 448-450.
- [6] 戴秀梅,傅大雄,徐如宏,等.硬粒小麦-偏凸山羊草六倍体的核型分析[J].麦类作物学报,2000,20(2): 8-12.
- [7] 姚启伦.玉米染色体常规制片技术中关键因子处理效应及优化[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2007,33(4): 419-426.
- [8] 陶勇生,张祖新,程友林,等.水稻 BAC 在玉米有丝分裂染色体上 FISH 杂交体系的构建[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(1): 80-84.
- [9] 陈全战,王官锋,陈华锋,等.普通小麦 2 簇毛麦易位系 T4VS·4VL-4AL 的选育与鉴定[J].作物学报,2007,33(6): 871-877.

An Efficient and Stable Method For Chromosome Flaking in *Brassica oleracea*

LU Jun, LI Le-yu, ZHU Li-quan, WANG Xiao-jia

(College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: An efficient and stable method for chromosome flaking of *Brassica oleracea* root-tip has been developed. This method integrated the disadvantage of squashing method and wall digestion hypotonic method, the primary results showed that the modified process could easily get more metaphase cells satisfying background, well decentration and clear morphological chromosome. these chromosomal specimens were fitted to be used in such cytogenetics manipulations as karyotyping, banding, fluorescence in situ hybridization and microdissection.

Key words: *Brassica oleracea*; Chromosome; Flaking