

研究简报

大麦高分辨染色体显带的初步研究

朱凤绥 傅骏华 李连城

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

A PRELIMINARY STUDY OF RESOLUTION BANDED CHROMOSOMES IN BARLEY

Zhu Fengsui Fu Junhua Li Liancheng

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing)

植物染色体分带研究虽已有十年以上的历史,由于方法学仍主要停留在带型比较简单的C带、N带,应用方面有其一定的局限性;人类染色体的G带成功,特别是近年来高分辨显带的方法学建立,在有丝分裂不同时期的染色体上,已能识别450~850~1700条带,并已进入染色体遗传疾病、癌变机理和基因定位研究的实用阶段。本实验在人类高分辨染色体显带各种流程的启示下,进行了大麦染色体的高分辨染色体显带,获得丰富带纹。

高分辨染色体标本的制作

1. 取材 以大麦 Betzes 品种为材料,种子浸泡12小时,再置于27℃温床24小时,发芽生根。
2. 低温处理 根长1厘米左右,在4℃低温条件下冷处理一昼夜。
3. 放线菌素D (Actinomycin D, 简称AMD) 渗入 截取根尖分生组织部分,在50微克/毫升的AMD溶液内,室温避光培养1.5小时,蒸馏水洗净。
4. 秋水仙素抑制 0.05%秋水仙素室温避光培养1.5小时,收获同步细胞,蒸馏水洗净。
5. 低渗 Ohnuki's hypotonic solution (0.055M KCl, NaNO₃, NaC₂H₃O₂, 以10:5:2之比值配制) 室温避光低渗1—1.5小时,蒸馏水洗净。
6. 酶解 2.5%纤维素酶 (Cellulase) 和2.5%果胶酶 (Pectinase), 用重蒸水配制成混合酶液,用1N的NaOH或HCl调整pH值5~5.5,在25℃温箱酶解1.5小时,蒸馏水置换浸洗30分钟。



大麦染色体N带

大麦染色体高分辨带

7. 固定 新配制的甲醇和冰醋酸(3:1)固定液中,固定30分钟以上,随时取用。

8. 分带染色 2%醋酸地衣红(aceto-orcein)35℃染色2小时,45%醋酸压片,收集有丝分裂前中期的细胞,可显示高分辨的丰富带纹。

9. 显微照相 选择染色体缠绕较少,分散平展的典型细胞,在Olympus显微镜5×100油镜下,使用7Din电影声底片进行显微照像。

本实验以相同的大麦品种材料的染色体N带为对照,其主要流程为截取根尖分生组织在0.075M KCl溶液内低渗,2.5%纤维素酶和2.5%果胶酶混合酶解,加固定液在载玻片上捣碎组织并火焰烤片,标本在1M NaH₂PO₄溶液中94℃±1℃温浴2分钟,蒸馏水冲洗30分钟,空气干燥后Giemsa染色,染色体显示N带。

结果与讨论

高分辨技术处理的标本,可以收获大量积累于有丝分裂晚前期和前中期的细胞,这些细胞的染色体延伸,可显示出丰富的带纹,大麦N带处理的所有7条染色体共显示24条带,而高分辨技术处理的标本,在延伸的7条染色体上可显示100~150条带,相当N带的5~6倍,染色体的形态学和解剖学特征,得以更好的表达,有助于进一步研究染色体的结构与功能。

植物染色体G带及高分辨带,至今尚未见有发表的文献报道,在此研究领域,植物已远落后于人类和脊椎动物的进展,因之,应探索与比较植物与脊椎动物细胞学上的不同,染色体行为与结构的差别,从染色体的分带机制上加以解决。脊椎动物和植物的减数分裂粗线期染色体,都在一定位置上分布染色粒,动物的染色粒与有丝分裂中期的染色体G带有很好的-一致性,Greilhuber认为,动物染色体在粗线期和有丝分裂中期其长度的比值为2.3,而植物则缩短10倍,在很短的染色体上就难以辨别更多的带纹了;另一原因是植物染色体比脊椎动物含有多得多的DNA,如果动物染色体也含有这样多的DNA,同样是难以显示G带的。据分析,人类有丝分裂时期1C核的DNA含量为2.53微微克,而大麦根尖细胞2C核的DNA含量为13.2微微克,两者相差悬殊。

因之,大麦高分辨染色体显带,必须解决染色体延伸、染色体解螺旋以及DNA复制的抑制等问题。

本实验采用的AMD渗入细胞,其机制主要是AMD的色素环部份与大麦细胞的鸟嘌呤结合,色素环插入DNA的双螺旋中,而和DNA形成一复合物,抑制从属于DNA的RNA聚合酶,从而阻断了mRNA的合成;AMD在细胞有丝分裂的S早期渗入也可以对大麦细胞DNA在S后期的复制起到某种程度的抑制作用,这方面的机制,在海拉细胞(Hela cells)的实验中曾得到证实。

Ohnuki's hypotonic solution代替其他低渗溶液,配合AMD使用,可以起到染色体的解螺旋作用。本实验是在AMD和秋水仙素处理之后,对大麦根尖分生组织进行Ohnuki's低渗溶液处理的,染色体解螺旋也有利于带纹的显示。