

小孢子减数分裂时期染色体压片观察

Chromosome Observation at Microspore Meiosis Stage Using Squash Technique in Rice

李兴旺, 龚蓉, 吴昌银*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: cywu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 李兴旺, 龚蓉, 吴昌银. (2018). 小孢子减数分裂时期染色体压片观察. *Bio-101*: e1010141.
Doi: 10.21769/BioProtoc.1010141.

How to cite: Li, X. W., Gong, R. and Wu, C. Y. (2018). Chromosome Observation at microspore meiosis stage using squash technique in rice. *Bio-101*: e1010141. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010141. (in Chinese)

实验原理: 固定过的水稻减数分裂时期的花粉母细胞的细胞核易于从细胞中分离出来, 用 DNA 荧光染料 DAPI 染色后, 可以观察到不同减数分裂时期染色体的行为变化。

实验目的: 观察水稻花粉母细胞各减数分裂时期的染色体形态。

关键词: 水稻, 减数分裂, 小孢子母细胞, 染色体

材料与试剂

1. 载玻片
2. 盖玻片
3. 液氮
4. 乙醇
5. 乙酸
6. 洋红染料
7. Acetic acid
8. FeCl₃
9. 含 DAPI 的封片剂, Vectashield (Vector Labs, catalog number: H-1200)
10. 卡诺固定液 (见溶液配方)

11. 醋酸洋红溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖针
2. 手术刀
3. 染缸 (体积约 40 ml)
4. 荧光显微镜 (Leica DM4000B with CCD camera Leica DFC480)

实验步骤

1. 田间采集时期适当的幼穗，用卡诺固定液固定 3 小时。
2. 在处理过的载玻片上(注)滴一滴固定液，取 10 朵处于减数分裂时期的小花，用解剖针在载玻片上捣碎后去掉大的组织碎片，加一滴醋酸洋红染色。
3. 将载玻片在酒精灯上烘烤瞬间(玻片不可烘干)，再加一滴醋酸洋红后，盖上盖玻片。
4. 压片，去除多余液体，注意不要使载玻片和盖玻片水平移动。
5. 液氮浸泡载玻片 5 min，用手术刀揭去盖玻片。
6. 依次经 70%、90%、100%酒精梯度脱水，每次 5 min。
7. 取出载玻片，晾干，在载玻片上加 20 μ l 含 DAPI 的封片剂，盖上盖玻片。
8. 荧光显微镜下观察 (340 nm 激发，480 nm 发射，如图 1)。

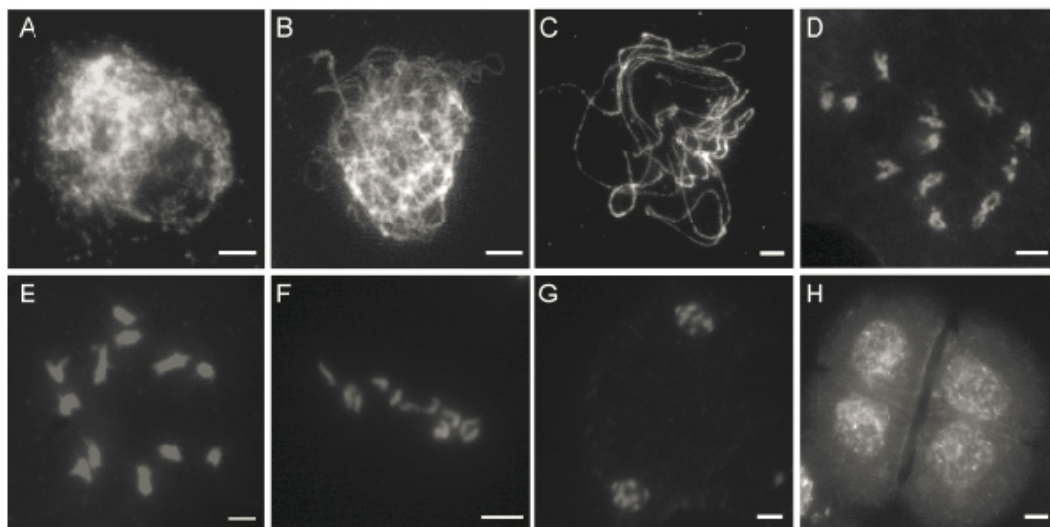


图 1. 野生型水稻小孢子母细胞减数分裂不同时期染色体形态。A. Leptotene; B.

Zygotene; C. Pachytene; D. Early Diakinesis; E. Late Diakinesis; F. Metaphase I; G. Anaphase I; H. Telophase II. Scale bars = 5 μ m.

注意事项

1. 将盖玻片和载玻片在肥皂水中沸浴 5-10 min。清水冲洗后，让水滴流干。
2. 在 2% 的盐酸酒精 (95% 酒精 100 份加入浓盐酸 2 份) 中浸泡 3-5 小时，再用流水冲洗，让水滴流干，浸入 95% 酒精中，捞片擦干。

溶液配方

1. 卡诺固定液
乙醇:乙酸=3:1，体积比
2. 醋酸洋红溶液
0.5 g 洋红染料溶解到 100 ml 煮沸的 45% acetic acid 中，再加几滴 FeCl_3 至深红色