

流式细胞技术检测细胞核倍性

刘菊红, 李一博, 熊立仲*

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: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 刘菊红, 李一博, 熊立仲. (2018). 流式细胞技术检测细胞核倍性. *Bio-101* e1010143. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010143.

实验原理: 在特定的解离液中切碎材料后使细胞破碎, 分散细胞器, 进而解离出细胞核, 同时解离液还可防止细胞核间相互粘连。PI染细胞核后, 在一定压力下逐个通过喷嘴, 进入流式照射室, 细胞核所带的荧光素被激发, 发射出荧光, 根据荧光的发射波长, 选择相应的荧光通道进行检测。最后, 光信号再转化成电信号, 经数据处理输入电脑, 呈现出点图和峰图两种流式图谱, 峰图纵坐标为粒子数, 横坐标为荧光强度。由于细胞核G1期的DNA含量反映这个细胞的倍性, 因此, 运用流式细胞仪测定的植物核DNA含量可以间接获取细胞的倍性。生物体的单倍体基因组所含DNA总量称为C值。

实验目的: 通过流式细胞仪检测特定组织中细胞核的倍性

关键词: DNA 含量, 荧光素, 细胞核倍性, C 值

材料与试剂

1. 枪头
2. 刀片 (蓝吉列)
3. 400 目滤膜 (国产)
4. 锡箔纸
5. 2 ml 离心管
6. 柠檬酸
7. Tween 20
8. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
9. Tris
10. Na_2EDTA

11. 四盐酸精胺
12. KCl
13. NaCl
14. Triton X-100
15. β -巯基乙醇
16. RNase
17. 细胞核分离缓冲液 (见溶液配方)
18. PI 染液 (见溶液配方)
19. DAPI 染液 (见溶液配方)

注: 本实验所用试剂均为进口试剂。

仪器设备

1. 移液枪
2. 离心机
3. 流式细胞仪 (Backman)

实验步骤

1. 准备实验材料: 根据需要选用发芽 10 d 左右的幼苗, 或状态良好的愈伤。
2. 配所需试剂 (所有试剂均用进口):
 - 2.1 细胞核分离缓冲液 (溶液配方 1)
 - 2.2 PI 染液 (见溶液配方 2)
 - 2.3 DAPI 染液 (见溶液配方 3)
3. 将叶鞘或愈伤浸没在 600 μ l 解离液 Otto I buffer 中, 在冰上用刀片尽可能细地切碎, 室温孵育 5-10 min, 用 400 目的细胞筛过滤到 2 ml 离心管中, 置冰上; 可以再 2,000 rpm 离心 3 min, 弃上清, 再加 400 μ l Otto I buffer 重悬细胞 10 min, 再加入 1,000 μ l Otto II buffer。
4. 切根时将根浸没在 600 μ l 解离液 B 中, 在冰上用刀片小心地切靠近根尖的区段, 室温孵育 5-10 min, 用 400 目的细胞筛过滤到 2 ml 离心管中, 置冰上。
5. 加入 PI 或者 DAPI 染液 20 μ l, 避光染 10 min。

6. 移至上样管，立即上机检测。收集 20,000 个颗粒。
7. 结果分析：通常在野生型材料中可以看到碎片峰(不对称)，2C 的峰(对称)，以及少量 4C 的峰，而在一些突变体材料中可能看到显著的 4C、8C 或者更高倍数的峰。

注意事项

解离液和材料的用量可根据材料中核的多少而适量增减，例如愈伤中核多可适量少用些材料，而根中核较少所以可适量少加些解离液，尽量保证解离液中较高的核浓度。选择合适的解离液，不合适的解离液可能导致很高的碎片峰。取材要新鲜。

溶液配方

注：所有试剂均用进口。

1. 细胞核分离缓冲液

1) 适用于从叶鞘或愈伤中分离

Otto I buffer: 0.1 M 柠檬酸, 0.5% (v/v) Tween 20, pH 2.3, 4 °C 保存

Otto II buffer: 0.4 M Na₂HPO₄·12H₂O, pH 8.9, 常温保存

2) 适用于从根中分离

15 mM Tris, 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM 四盐酸精胺, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 15 mM β-巯基乙醇, pH 7.0-8.0, -20 °C 保存

2. PI 染液

母液浓度为 1 mg/ml (20x), 使用浓度为 50 μg/ml, 用锡箔纸包裹 4 °C 保存。使用前加入 RNase, 50 μg/ml

3. DAPI 染液

工作浓度 6 μg/ml, 使用前加入 RNase, 50 μg/ml