

柑橘染色体涂片制片法

王蓉, 郭文武*

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: guoww@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 王蓉, 郭文武. (2018). 柑橘染色体涂片制片法. *Bio-101* e1010191. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010191.

实验原理及目的: 植物涂片法指将植物材料酶解去掉细胞壁后, 经低渗液处理, 用针尖敲碎后在玻片上平铺展开, 火焰干燥使染色体膨胀, 得到分散良好、背景干净的染色体和细胞核, 又称低渗火焰干燥法。涂片制片法在植物细胞生物学、细胞遗传学、分子细胞生物学等研究中应用广泛, 主要进行染色体计数、核型分析、荧光原位杂交等相关实验。

关键词: 涂片, 染色体, 细胞学

材料与试剂

1. 盆
2. 吸水纸
3. 培养皿
4. 滤纸
5. 纱布
6. 2 ml 离心管
7. 吸管
8. 载玻片
9. 柑橘果实
10. 饱和对二氯苯 (RT)
11. 0.075 mol/L KCl (RT)
12. 乙醇
13. 乙酸

14. 柠檬酸
15. 二水合柠檬酸三钠
16. ddH₂O
17. Pectinase (Aspergillus niger, Sigma-Aldrich, 4 °C)
18. Cellulose (“Onozuka”RS, Yakult Pharmaceutical Industry, 4 °C)
19. Pectoligase (Y-23, Yakult Pharmaceutical Industry, 4 °C)
20. 10x EB (柠檬酸钠缓冲液) (见溶液配方)
21. 酶混合液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 刀
2. 镊子
3. 手术刀
4. 打火机
5. 大头针
6. 28 °C 培养箱
7. 水浴锅
8. -20 °C 冰箱
9. 摇床
10. 解剖镜
11. 移液器
12. 相差显微镜 (Olympus, model: BH-2)

实验步骤

1. 取材和前处理

- 1.1 用刀将柑橘果实小心切开，取出种子，放入装有清水的盆中浸泡 30-60 min，浸泡过程中搓洗种子 2-3 次，再平铺于吸水纸上晾干。

注：因柑橘种子外表皮果胶较多，为方便剥掉种皮，需用清水搓洗，种子浸泡时间视果胶多少而定。

1.2 在培养皿中平铺两张滤纸，用清水浸湿，上面盖上 2-3 层纱布，再用清水浸湿。种子剥掉内外种皮，均匀摆放在纱布上，加清水至半浸没种子。28 °C 避光培养 7-10 d (视根尖生长情况而定)，期间不间断观察，水干后及时续加。

注：

- 1) 种子摆放于纱布上时，不宜太过密集，不利于萌发，应保持 2-3 cm 的间距。待初生根生长到 1 cm 左右时，解剖刀切取根尖前端 3-5 mm，用镊子放入装有蒸馏水的 2 ml 离心管中，置于冰上。
- 2) 当根尖生长短于 1 cm 时，分生组织活动最为旺盛，易于得到正在分裂的染色体。
- 3) 取根尖时，至少小于 5 mm，切口更接近于分生区，利于溶液的吸收。
- 4) 根尖最好置于底部较平的 2 ml 离心管中，利于吸收试剂，每个离心管中根尖条数不能多于 15 条。

1.3 取完根尖后，吸管轻轻吸出水，再加入饱和对二氯苯溶液，20 °C 水浴 3 h。吸出饱和对二氯苯溶液，加入 0.075 mol/L KCl 室温处理 30 min，再换新制卡诺固定液 (乙醇:乙酸 = 3:1) 常温固定 24 h。固定后用 70%乙醇 4 °C 保存备用，长期储存在 -20 °C。

注：对根尖进行预处理时，会经常更换试剂，因根尖较小，容易吸出，需小心谨慎。对二氯苯对细胞代谢活动的毒害是较大的，预处理液的温度过高或处理时间过长，很容易导致产生染色体断裂、黏连等类似辐射畸变的效应。

2. 酶解根尖

2.1 用镊子将固定好的根尖取出放入柠檬酸钠缓冲液中，置摇床上中低速摇 3-5 次，5 min/次，每次均需换柠檬酸钠缓冲液。

注：因从卡诺固定液中取出的根尖吸取了大量的乙醇，为保证酶解充分，需用柠檬酸钠缓冲液清洗至少 3 次。

2.2 解剖镜下切除根尖至 2-3 mm，滤纸吸干根尖水分，用镊子轻轻放入装有酶混合液的 2 ml 离心管中，每管最多有 4 条根尖，酶液 40-60 μ l。37 °C 水浴 90 min 左右，根尖上部处于透明弥散状态即表明已酶解好。

注：根尖水分尽量吸干，酶液中放入根尖时，不要用镊子搅动，以免浪费酶液。根尖放入酶液后，确保没有粘在管壁上，确保酶解充分。

3. 涂片制片

3.1 在酶解好的根尖中缓慢加入柠檬酸钠缓冲液或 ddH₂O 稀释，终止酶解。

注：酶解后的根尖已经软化，极易破碎，所以不能剧烈晃动。

3.2 用吸管慢慢将根尖移到预先晾干的干净载玻片中间区域，在解剖镜下仔细地用大头针解剖根尖，去掉杂质和不能解开的材料块，留下乳白色区域。

3.3 用吸管和干净的滤纸吸走多余的水份和杂质，大头针垂直轻轻敲打根尖至匀浆状。在根尖周围用移液枪滴加约 10 μl 新配制的 60%乙酸，大头针再轻轻敲打至混匀。移液枪悬空滴加 1~2 滴约 15 μl (视根尖大小而定) 新配置的卡诺固定液 (乙醇:乙酸=3:1) 展片，用打火机立刻点燃固定液，待固定液干燥后即完成制片。一般来说火焰燃烧能够最大程度的将分裂相展开。用相差显微镜 20 倍下检测，选择染色体分裂相好且多，杂质较少的染色体片，-20 °C 保存备用。

注：

- 1) *用吸管和滤纸吸走水分时，不能完全吸干，要保留一点水分，便于后续展片。*
- 2) *大头针敲打根尖时，也可看出是否酶解充分，若一敲即化，无碎渣，则表示已经酶解好。*
- 3) *60%乙酸和卡诺固定液需放在冰上，悬空滴加卡诺固定液时，不宜太高，防止细胞过于分散。*

溶液配方

1. 10x EB (柠檬酸钠缓冲液)

10x EB	100 ml, 室温
柠檬酸	0.841 g
二水合柠檬酸三钠	1.765 g
定容至 100 ml, 调 pH 到 4.8, 灭菌	

2. 酶混合液

2.1 母液

酶母液	各 8 ml, -20 °C
2.5% Pectolgase Y-23	8 ml of 0.2 g, -20 °C
5% Cellulose“Onozuka”RS	8 ml of 0.4 g, -20 °C

2.2 工作液

工作液	2 ml, -20 °C
2.5% Pectolgase Y-23	500 µl, -20 °C
5% Cellulose“Onozuka”RS	500 µl, -20 °C
Pectinase	12.5 µl, 4 °C
1x EB	up to 2 ml
分装, 每管 200 µl	

参考文献

1. 苗茵, 徐凤娇, 兰红, 陈春丽. (2014). [沙田柚实生苗染色体的荧光显带分析](#). *华中农业大学学报* 33(01): 18-23.
2. Lan, H., Chen, C. L., Miao, Y., Yu, C. X., Guo, W. W., Xu, Q. and Deng, X. X. (2016). [Fragile Sites of 'Valencia' Sweet Orange \(*Citrus sinensis*\) Chromosomes Are Related with Active 45s rDNA](#). *PLoS One* 11(3): e0151512.