

柑橘流式细胞仪倍性鉴定

Identification of Citrus Ploidy by Flow Cytometry

袁东亚[#], 解凯东[#], 王惠芹[#], 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

[#]共同第一作者

引用格式: 袁东亚, 解凯东, 王惠芹, 郭文武. (2018). 柑橘流式细胞仪倍性鉴定. *Bio-101* e1010192. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010192.

How to cite: Yuan, D. Y., Xie, K. D., Wang, H. Q. and Guo, W. W. (2018). Identification of citrus ploidy by flow cytometry. *Bio-101* e1010192. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010192. (in Chinese)

实验原理及目的: 流式细胞仪 (Flow cytometer) 是一台自动分析细胞的高端技术设备, 其原理是悬浮在液体中的携带染料分子的细胞一个个地依次通过测量区, 当每个细胞通过测量区并被激发光照射时产生荧光信号, 然后被光电倍增管 (PMT) 接收并转化成电信号, 这些信号代表荧光强度和细胞数量。电信号被电子-数字转换器转换成数字信号后传输并储存于计算机硬盘中, 再通过流式细胞仪软件将这些数字信号模拟成图形显示出来。于是细胞的定性和定量数据就被快速地、大量地测定。在育种工作中, 流式细胞仪被普遍的应用, 因为传统的染色体计数方法比较繁琐, 特别是对于染色体数多的物种, 倍性分析更为困难。而流式细胞仪可快速精准的检测物种的倍性, 缩短了时间, 节省了人力。

关键词: 流式细胞仪, 信号, 倍性

材料与试剂

1. 塑料皿
2. 滴管
3. 微孔滤膜
4. 样品管
5. 新鲜叶片或愈伤
6. 冰盒

7. 灭菌水
8. Precise T 试剂盒
9. DAPI
10. 清洗液
11. 细胞裂解溶液 (A 液) (见溶液配方)
12. DAPI 染色液 (B 液) (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子
2. 单面刀片
3. 4 °C 冰箱
4. 流式细胞仪 (Partec, model: space)
5. 移液器

实验步骤

1. 前期准备工作

1.1 样品准备: 于实验前取待测样品的新鲜幼嫩叶片或愈伤组织为实验材料, 包括样品的对照 (一般为二倍体)。

注:

- 1) 若在室外取样, 需放在冰盒内; 若不能立即进行检测, 需放在 4 °C 冰箱保持叶片活力。
- 2) 一般来说, 新鲜幼嫩的叶片容易检测且结果峰图明显, 无杂峰干扰, 但对于茶叶来说, 幼嫩叶片酚类多, 易被氧化, 老叶更好。所以检测时, 要清楚不同物种叶片的特性。

1.2 开机前检查: 检查流式细胞仪鞘液 (Sheath) 瓶和废液 (Waste) 瓶的液面情况, 确保每次运行的鞘液 (超纯水) 充足, 如鞘液不足, 需添加提前灭过菌的超纯水 (瓶中鞘液总体积不能超过 1,800 ml), 扭紧瓶盖, 防止漏气。每次关机后, 及时清理废液, 避免长菌。

- 1.3 试剂配制 (Precise T 试剂盒) (见溶液配方):
 - 1) 细胞裂解溶液 (A 液)
 - 2) DAPI 染色液 (B 液)
2. 开机: 依次打开电脑主机及显示屏电源, 然后打开流式细胞仪主机及紫外开关, 最后打开 Flomax 软件, 听到一声“哧”的声音后即表示电脑与仪器连通, 待仪器稳定后 (仪器指示灯在几轮闪烁后最终停在 **stop** 的位置) 即可进行倍性分析。
3. 倍性检测
 - 3.1 镊子取已知倍性材料的叶片约 0.5 cm^2 大小置于干净的塑料皿中, 用滴管加入 2-3 滴细胞裂解液 (A 液) 浸没叶片, 用单面刀片将其切碎后加入 $1,000\text{ }\mu\text{l}$ 染色液 (B 液), 用 $30\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜将样品过滤至样品管中。

注: 用刀片切叶片时, 用力垂直先纵后横切割, 确保每次都切断叶片。若样品为愈伤, 则先将其用滤纸吸干水份, 再用刀片切碎。
 - 3.2 将样品管插入仪器, 点击“开始”按钮启动样品测试, 待流速稳定后, 通过调试电压 (gain 值) 的大小, 将对照样品的峰值调制横坐标为 50 的位置后即保持电压值不变 (一般柑橘叶片的 gain 值为 560 左右), LL 值调为 25-45 左右, 并根据图像数据效果改变流速大小, 确保流速保持在每秒通过流动室的细胞数量为 100 左右。采集的数据达到实验要求后, 可以直接拔下样品管, 终止测试, 仪器会执行一次自动清洗, 结束之后, 可以进行下一个测试。

注: 采集的图像数据细胞数量理论上需达到 3,000 个, 且图像峰值明显, 无杂峰。
 - 3.3 检测样品时, 读取待测样品峰所对应的横坐标数值, 与对照 50 相比, 即可获得待测样品的倍性 (即若待测样品峰的横坐标数值为 100, 则倍性是对照的两倍)。
4. 关机
 - 4.1 所有待测样品检测完毕后, 取 1-2 ml 左右的清洗液进行仪器清洗 (跑一次空样, 进样速度值调为 4); 运行完毕后, 取 1-2 ml 超纯水再次清洗, 直至细胞数量为 0; 最后, 再连续点 **clean** 键 5 次, 仪器自动清洗。
 - 4.2 清洗结束后即可关机, 顺序依次为: 先关闭软件, 其次为流式细胞仪紫外及其

电源开关，最后是电脑及显示器的电源。实验完毕后进行登记，并清理废液（废液倒入废液桶中集中处理，通风橱中操作）。

溶液配方

1. 细胞裂解溶液 (A 液)

取 0.105 g Buffer Reagent (提取液粉末) 溶于 5 ml Nuclear Extraction Buffer 中，溶解后即可使用，A 液一次不要配太多，一般 4 °C 低温保存不能超过 1 周

2. DAPI 染色液 (B 液)

取 200 ml 无菌水，加入 DAPI 母液 20 μ l，再加入 Precise T 试剂盒中的 Staining Buffer 100-200 ml，摇匀，4 °C 冰箱保存

参考文献

1. 解凯东, 王惠芹, 王晓培, 梁武军, 谢宗周, 伊华林, 邓秀新, Grosser J. W., 郭文武. (2013). [单胚性二倍体为母本与异源四倍体杂交大规模创制柑橘三倍体](#). *中国农业科学* 46(21): 4550-4557.
2. 张俊娥, 刘继红, 邓秀新. (2003). [采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异](#). *遗传学报* 30(2): 169-174.