

姚启伦, 李玉洁, 陈发波, 等. 玉米染色体滴片关键技术及其优化[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 255-261.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.003

玉米染色体滴片关键技术及其优化

姚启伦^{1,2}, 李玉洁¹, 陈发波^{1,2}, 高 健^{1,2}, 李文博^{1,2}, 方 平^{1,2}, 李红艳¹

(1. 长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆 408100; 2. 长江师范学院武陵山片区绿色发展协同创新中心, 重庆 408100)

摘要: 探讨优化玉米染色体滴片关键因子处理效果, 寻求一种操作简单、染色体分散度和完整性好, 并且适于玉米染色体分离操作的制片方法。本研究以玉米自交系 B73 根尖为材料, 在单因素试验的基础上采用四因素二次回归正交组合设计, 分析玉米滴片技术中 4 个关键因子的处理效果。结果表明, N₂O 处理时间、冰乙酸固定时间、酶解时间和滴片距离对染色体滴片效果均存在最佳处理效应。基于二次回归方程的统计方法得到了符合实际的优化的染色体滴片技术方案, 即采用 N₂O 处理时间 2.0 h、冰乙酸固定时间 2.0 h、酶解时间 6.0 h 和滴片距离 35.0 cm。由此方案制作了高质量的玉米染色体制片, 保证了细胞中染色体的分散性和完整性。

关键词: 玉米; 染色体; 滴片; 优化

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0255-07

Key techniques and their selective preference of maize chromosomal dropping-slides

YAO Qi-lun^{1,2}, LI Yu-jie¹, CHEN Fa-bo^{1,2}, GAO Jian^{1,2}, LI Wen-bo^{1,2}, FANG Ping^{1,2}, LI Hong-yan¹

(1. Department of Life Sciences and Technologies, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; 2. Correlative Innovation Centre for Green Development in the Wulingshan Region, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

Abstract: To explore the effect of optimizing the key factors on maize chromosome, a method of making dropping-slides with simple operation, good chromosome dispersion and integrity, and good suitability for the operation of chromosome separation was sought. In this study, the root tips of maize inbred line B73 were used as the material. Based on the single factor experiment, four factors quadratic regression right cross design was used to analyze the effects of four factors on chromosomal dropping-slides of maize. The results showed that the treatment time of nitrous oxide, the fixation time of glacial acetic acid, enzymolysis time and the dropping-slide distance all had the best effect on the chromosomal dropping-slide of maize. Based on the statistical method of quadratic regression equation, the optimized chromosome dropping-slides technique was obtained, which consisted of two hours of nitrous oxide treatment, two hours of glacial acetic acid fixation, six hours of enzymatic hydrolysis and 35 cm of dropping-slide distance. High-quality maize chromosome dropping-slides were

mode by the scheme, and the dispersibility and integrity of chromosomes in cells were ensured.

Key words: maize; chromosome; dropping-slides; optimization

收稿日期: 2018-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371633); 重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项(2016shmszx80030); 重庆市教委优秀成果转化项目(KJZH17133)

作者简介: 姚启伦(1964-), 男, 重庆万州人, 博士, 教授, 主要从事玉米遗传育种研究, (Tel) 13908253365; (E-mail) yql641@aliyun.com

通讯作者: 陈发波, (Tel) 13983320701; (E-mail) chenfabo963@126.com

染色体作为基因的载体, 一直是细胞遗传学和分子生物学的热点。染色体制片是观察、鉴定染色体的基本方法, 它是进行生物染色体组型分析、

染色体显带、染色体畸变分析、染色体特殊成分鉴定、DNA 原位杂交和单染色体分离研究的重要技术手段^[1-6]。传统的染色体制片技术是压片法和火焰干燥法,众多学者就染色体制片过程中的取材时间、预处理方式、冰乙酸固定时间、细胞解离及染色方法等作了大量卓有成效的研究^[1,7]。潘颀等^[8]以新疆紫草为材料,用压片法研究染色体制片技术,其研究表明,新疆紫草染色体制片效果主要取决于秋水仙素预处理时间、处理温度和细胞解离时间 3 个关键处理因子。劳世辉等^[9]采用火焰干燥法制备菠萝蜜染色体制片,通过比较不同预处理试剂和预处理时间的作用效果,发现以 1:1 (体积比) 的 8-羟基喹啉 (0.002 mol/L) 与秋水仙素 (0.2%) 混合液预处理制片材料,可达到理想的染色体制片效果。陈雪等^[10]通过对射干染色体压片技术研究指出,室温下用秋水仙素 (0.1%) 预处理材料 8 h 和 37 ℃ 下酶解材料 60 min,用压片法可制作出染色体分散良好的制片。刘丹等^[11]通过比较分析多种植物的染色体压片技术,认为压片法中制约植物染色体制片效果的关键处理因子是预处理药剂和时间。分子生物学技术的发展对染色体制片技术提出新的更高的要求,一张高质量的染色体制片要求处于有丝分裂中期相的细胞多,染色体交叉重叠少、分散性好,细胞内容物少、清晰度高。染色体滴片法是新兴的一种染色体制片方法,目前国内鲜见有关染色体滴片技术研究的相关报道^[12-13]。为此,本试验以遗传学研究的模式生物——玉米为染色体制片材料,采用数理统计法分析影响染色体滴片效果的 4 个关键因子,为规范玉米染色体滴片技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用典型玉米自交系 B73 作染色体制片材料,玉米自交系 B73 种子由长江师范学院玉米育种课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体滴片制作

1.2.1.1 胚根 在培养皿内铺一层无菌纱布,放入预浸 6 h 的玉米种子,在恒温培养箱内 25 ℃ 培养 1~2 d,待胚根长 1.0~2.0 cm 时,剪取 1.0~1.5 cm 根尖置入盛有超纯水的 EP 管中,让湿润根尖贴于管壁。

1.2.1.2 N₂O 处理 将装有根尖的 EP 管放入 N₂O

处理罐,在 0.5 Pa 的压强下进行 N₂O 处理,N₂O 处理罐由解压阀、N₂O 罐、连接管、处理罐和三通阀组成。

1.2.1.3 冰乙酸固定 取出 EP 管并滴加适量 90% 冰乙酸对根尖材料进行固定处理。

1.2.1.4 材料漂洗 固定后的根尖材料从 EP 管取出,在盛有超纯水的培养皿中漂洗 2~3 次,然后置于载玻片切取根尖分生区。

1.2.1.5 制备细胞悬液 根尖分生区材料在 37 ℃ 温度下酶解,酶解后的材料用 70% 乙醇清洗 2 次,再置入瞬时离心机离心 2 次,每次 8 s,最后加入冰乙酸,捣碎混匀制成细胞悬液。

1.2.1.6 细胞悬液滴片 用移液枪吸 10 μl 细胞悬液,在一定高度依靠其自身重力直接滴加在载玻片上,待滴液干燥后进行染色处理。

1.2.1.7 镜检 在光学显微镜下观察、鉴定滴片中细胞有丝分裂中期染色体,并利用照像系统进行拍照记录。

1.2.2 制订染色体制片评分标准 以染色体滴片效果为考察指标,根据有丝分裂中期相的细胞数、染色体重叠率、单细胞染色体数和细胞内容物面积比 4 个参数值,对染色体滴片效果进行评定等级^[1,14],其评分标准见表 1。

表 1 评分标准

Table 1 Criteria for scoring

评分指标				评分
有丝分裂中期相的细胞数	染色体重叠率 (%)	单细胞染色体数	细胞内容物面积比 (%)	等级
0~5	>75	0~10	>30	1
6~10	51~75	11~13	21~30	2
11~15	26~50	14~16	11~20	3
16~19	0~25	17~19	0~10	4
≥20	0	20	0	5

1.2.3 试验设计 基于前期大量的玉米染色体滴片试验,单因素试验设计参照贾建^[15]的方法,按不同的试验设计,选择不同的 N₂O 处理时间 (1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h)、冰乙酸固定时间 (1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h)、酶解时间 (5.0 h、5.5 h、6.0 h、6.5 h 和 7.0 h) 和滴片距离 (10.0 cm、20.0 cm、30.0 cm、40.0 cm 和 50.0 cm)。用二次回归正交组合设计分析染色体滴片效果与各关键因子

间的线性关系^[16]。单因素试验设计得到的最优处理作为二次回归正交设计的零水平,进行回归正交试验,建立染色体滴片效果与各关键因子的回归方程,以探究玉米染色体滴片法的最佳技术方案。

1.3 数据分析

试验数据经 Excel 整理后,利用 DPS 软件进行二次回归正交组合设计统计分析,建立回归方程。

2 结果与分析

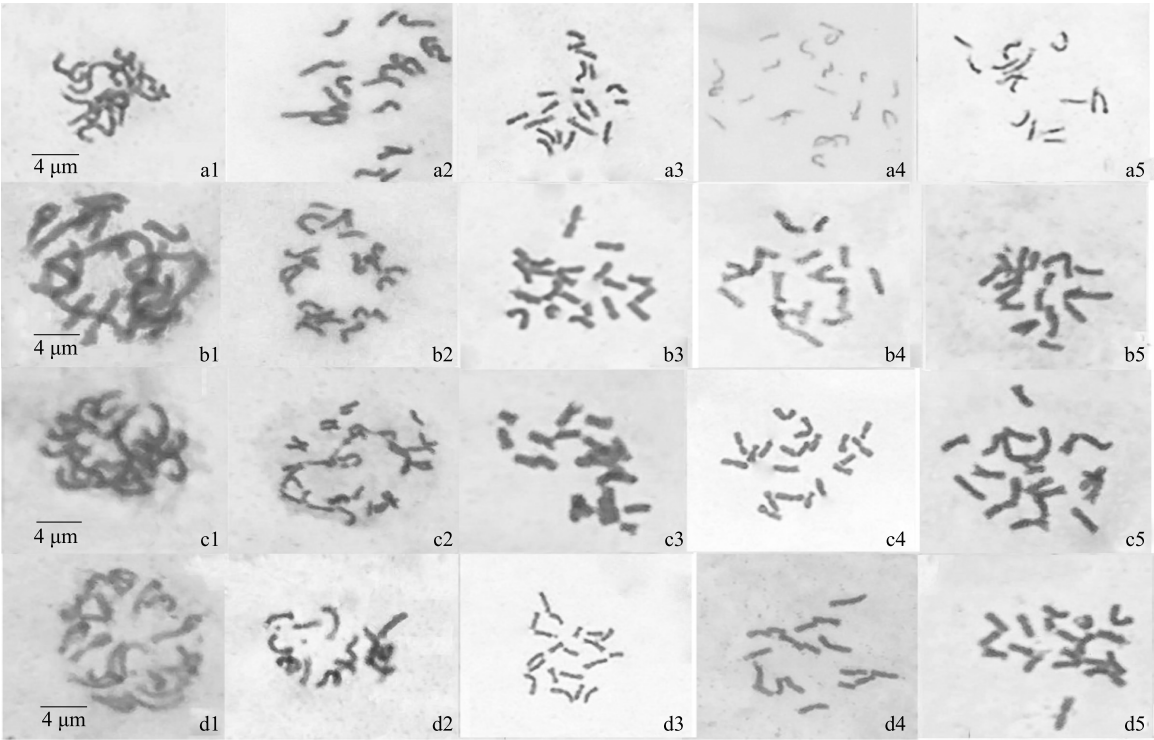
2.1 各关键因子对染色体滴片的处理效果

由表 2 可知,N₂O 处理时间分别为 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h 时,玉米染色体滴片效果的得分等级分别为 1、2、5、4 和 3,以 2.0 h N₂O 处理时间的评分等级最高,染色体滴片效果最好(图 1a3)。冰乙酸固定根尖材料时间分别为 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h 时,其滴片效果的得分等级分别为 1、2、5、4 和 3,以 2.0 h 固定时间的染色体滴片效果最好(图 1b3),评分等级最高。酶解时间分别为 5.0 h、5.5 h、

6.0 h、6.5 h 和 7.0 h 时,其滴片效果的得分等级分别为 3、4、5、2 和 1,以酶解时间为 6.0 h 的染色体滴片效果最好(图 1c4),评分等级最高。滴片距离分别为 10.0 cm、20.0 cm、30.0 cm、40.0 cm 和 50.0 cm 时,其滴片效果的得分等级分别为 1、3、5、4 和 2,以 30.0 cm 距离的染色体滴片效果最好(图 1d3),评分等级最高。

表 2 4 个关键因子对染色体滴片的处理效果
Table 2 Effects of four key factors on chromosomal dropping-slides

N ₂ O 处理		冰乙酸固定处理		酶解处理		滴片距离处理	
时间 (h)	等级	时间 (h)	等级	时间 (h)	等级	距离 (cm)	等级
1.0	1	1.0	1	5.0	3	10.0	1
1.5	2	1.5	2	5.5	4	20.0	3
2.0	5	2.0	5	6.0	5	30.0	5
2.5	4	2.5	4	6.5	2	40.0	4
3.0	3	3.0	3	7.0	1	50.0	2



a1~a5 分别表示 N₂O 处理 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h 的染色体滴片效果图;b1~b5 分别表示冰乙酸固定时间分别为 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h 和 3.0 h 的染色体滴片效果图;c1~c5 分别表示酶解时间分别为 5.0 h、5.5 h、6.0 h、6.5 h 和 7.0 h 的染色体滴片效果图;d1~d5 分别表示滴片距离分别为 10.0 cm、20.0 cm、30.0 cm、40.0 cm 和 50.0 cm 的染色体滴片效果图。

图 1 4 个处理因子分别处理后的染色体滴片效果图
Fig.1 The effect pictures of chromosomal dropping-slides treated by four treatment factors

2.2 二次回归正交设计及回归分析

据单因素试验结果,二次回归正交组合设计零水平分别为 2.0 h、2.0 h、6.0 h 和 30.0 cm。关键处理因子 N_2O 处理时间的上下水平分别为 1.0 h 和 3.0 h,冰乙酸固定时间的上下水平分别为 1.0 h 和 3.0 h,酶解时间的上下水平分别为 5.0 h 和 7.0 h,滴片距离的上下水平分别为 10.0 cm 和 50.0 cm。由 $m=4$ 、 $m_0=3$,选用 $\gamma=1.547$,设计 4 个因素: N_2O 处理时间(Z_1)、冰乙酸固定时间(Z_2)、酶解时间(Z_3)和滴片距离(Z_4),相应编码为 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 ,列出因素水平编码表(表 3),将试验设计中的编码水平转换成相应的实际水平,即得试验实施方案(表 4)。

据四因素二次回归正交组合设计表,整理数据后得到四因素二次回归正交组合设计结构矩阵及试

验结果计算表(表 5),由此建立回归方程: $Y=6.18-0.25x_1+0.12x_2-0.29x_3+0.19x_4-0.30x_1x_2+0.10x_1x_3+0.06x_1x_4+0.29x_2x_3-0.03x_2x_4-0.13x_3x_4-1.47x'_1-1.41x'_2-1.45x'_3-1.20x'_4$ 。

表 3 因素水平编码表

Table 3 Coding table of factor level

水平(x_j)	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
1.547	3.000	3.000	7.000	50.000
1.000	2.650	2.650	6.650	42.930
0	2.000	2.000	6.000	30.000
-1.000	1.350	1.350	5.350	17.070
-1.547	1.000	1.000	5.000	10.000
Δj	0.650	0.650	0.650	12.930

x_j : 表示第 j 个因素的水平, Δj : 第 j 个因素的变化区间。 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 分别表示 4 个因素: N_2O 处理时间、冰乙酸固定时间、酶解时间和滴片距离。

表 4 四因素二次回归正交组合设计及实施方案

Table 4 The design and implementing scheme of the four factors quadratic regression right cross

试验号	因素水平				处理因素			
	x_1	x_2	x_3	x_4	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
1	1.000	1.000	1.000	1.000	2.65	2.65	6.65	42.93
2	1.000	1.000	1.000	-1.000	2.65	2.65	6.66	17.07
3	1.000	1.000	-1.000	1.000	2.65	2.65	5.35	42.93
4	1.000	1.000	-1.000	-1.000	2.65	2.65	5.35	17.07
5	1.000	-1.000	1.000	1.000	2.65	1.35	6.65	42.93
6	1.000	-1.000	1.000	-1.000	2.65	1.35	6.66	17.07
7	1.000	-1.000	-1.000	1.000	2.65	1.35	5.35	42.93
8	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	2.65	1.35	5.35	17.07
9	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.35	2.65	6.65	42.93
10	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.35	2.65	6.66	17.07
11	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.35	2.65	5.35	42.93
12	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.35	2.65	5.35	17.07
13	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.35	1.35	6.65	42.93
14	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.35	1.35	6.66	17.07
15	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.35	1.35	5.35	42.93
16	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.35	1.35	5.35	17.07
17	1.547	0	0	0	3.00	2.00	6.00	30.00
18	-1.547	0	0	0	1.00	2.00	6.00	30.00
19	0	1.547	0	0	2.00	3.00	6.00	30.00
20	0	-1.547	0	0	2.00	1.00	6.00	30.00
21	0	0	1.547	0	2.00	2.00	7.00	30.00
22	0	0	-1.547	0	2.00	2.00	5.00	30.00
23	0	0	0	1.547	2.00	2.00	6.00	50.00
24	0	0	0	-1.547	2.00	2.00	6.00	10.00
25	0	0	0	0	2.00	2.00	6.00	30.00
26	0	0	0	0	2.00	2.00	6.00	30.00
27	0	0	0	0	2.00	2.00	6.00	30.00

处理因素 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 见表 3; x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 分别为 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 的编码。

表5 四因素二次回归正交组合设计结构矩阵及试验结果计算表

Table 5 The results and structure matrix of the four factors quadratic regression right cross design

试验号	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	x_{12}	x_{13}	x_{14}	x_{23}	x_{24}	x_{34}	x'_1	x'_2	x'_3	x'_4	Y
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.5
2	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.2
3	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.6
4	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	3.8
5	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.2
6	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	3.6
7	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	5.4
8	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.8
9	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	5.2
10	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	5.3
11	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	6.0
12	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	5.4
13	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	3.8
14	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	3.8
15	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	5.6
16	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.230	0.230	0.230	0.230	4.8
17	1	1.547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.623	-0.770	-0.770	-0.770	7.5
18	1.000	-1.550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.623	-0.770	-0.770	-0.770	7.8
19	1.000	0	1.547	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	1.623	-0.770	-0.770	7.6
20	1.000	0	-1.550	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	1.623	-0.770	-0.770	8.0
21	1.000	0	0	1.547	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	1.623	-0.770	7.6
22	1.000	0	0	-1.550	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	1.623	-0.770	7.8
23	1.000	0	0	0	1.547	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	-0.770	1.623	8.4
24	1.000	0	0	0	-1.550	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	-0.770	1.623	8.2
25	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	-0.770	-0.770	9.4
26	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	-0.770	-0.770	9.8
27	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.770	-0.770	-0.770	-0.770	9.7
B	166.800	-5.260	2.380	-6.110	3.910	-4.800	1.600	1.000	4.600	-0.400	-2.000	-16.800	-16.100	-16.600	-13.700	
d	27.000	20.790	20.790	20.790	20.790	16.000	16.000	16.000	16.000	16.000	16.000	11.450	11.450	11.450	11.450	
b	6.178	-0.250	0.115	-0.290	0.188	-0.300	0.100	0.063	0.288	-0.030	-0.130	-1.470	-1.410	-1.450	-1.200	
Q	1 030.000	1.330	0.270	1.800	0.730	1.440	0.160	0.060	1.320	0.010	0.250	24.720	22.650	24.020	16.420	

$B = \sum xy; d = \sum x_2; b = B/d; Q = bB; Y$: 因变量。

据表6 显著性检验结果, x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 的二次项均达到极显著水平, 其余各项回归系数均不显著, 说明 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 的二次项对试验结果有极显著影响, 回归关系极显著, 由此建立的数学模型与实际情况拟合较好^[10]。据平方项中心化公式: $x'_j = x_{j2} - (\sum x_{j2} 0)/n = x_{j2} - 0.77$, 得到回归方程: $Y = 10.44 -$

$0.25x_1 + 0.12x_2 - 0.29x_3 + 0.19x_4 - 0.30x_1x_2 + 0.10x_1x_3 + 0.06x_1x_4 + 0.29x_2x_3 - 0.03x_2x_4 - 0.13x_3x_4 - 1.47x_{12} - 1.41x_{22} - 1.45x_{32} - 1.20x_{42}$ 。以 Y 值最大为目标函数, 通过确定参数 $x_j (j=1, 2, 3, 4)$ 的最优值。当 Y 值最大时, 据目标函数解得 $x_1 = -0.078$, $x_2 = 0.040$, $x_3 = -0.110$, $x_4 = 0.360$, 将 $x_1 = (Z_1 - 2)/0.65$, $x_2 = (Z_2 -$

2)/0.65, $x_3 = (Z_3 - 6)/0.65$, $x_4 = (Z_4 - 30)/12.93$ 代入得到实际因素 $Z_1 = 1.95$, $Z_2 = 2.04$, $Z_3 = 5.93$, $Z_4 = 34.65$ 。

综上所述,根据回归方程,优选出各关键处理因子的最佳方案,基于试验操作的实际性,采用取整法,即得到本试验玉米染色体滴片法关键处理因子的最佳技术方案: N_2O 处理时间 2.0 h,冰乙酸固定时间 2.0 h,酶解时间 6.0 h,滴片距离 35.0 cm。

表 6 回归方程方差分析

Table 6 Analysis of variance for regression equation

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	临界 F 值
x_1	1.333	1	1.333	2.048	4.75 ($F_{0.05}$)
x_2	0.273	1	0.273	<1.000	
x_3	1.796	1	1.796	2.758	9.33 ($F_{0.01}$)
x_4	0.735	1	0.735	1.129	
x_{12}	1.440	1	1.440	2.212	
x_{13}	0.160	1	0.160	<1.000	
x_{14}	0.063	1	0.063	<1.000	
x_{23}	1.323	1	1.323	2.035	
x_{24}	0.010	1	0.010	<1.000	
x_{34}	0.250	1	0.250	<1.000	
x'_1	24.720	1	24.720	38.020 **	
x'_2	22.650	1	22.650	34.850 **	
x'_3	24.020	1	24.020	36.950 **	
x'_4	16.420	1	16.420	25.260 **	
R	95.190	14	6.799	10.460 **	4.05 ($F_{0.01}$)
S	7.813	12	0.651		
L	7.726	10	0.773	17.570	19.39 ($F_{0.05}$)
E	0.087	2	0.044		
T	103.000	26			

R:回归;S:剩余;L:失拟;E:误差;T:总变异。**表示在 0.01 水平上差异显著。

3 讨论

3.1 影响染色体滴片效果的主要因素

滴片法的操作步骤有取材、预处理、固定、解离和滴片。材料预处理的目的是改变细胞内染色体形态及分散状态,常采用秋水仙素、8-羟基喹啉和 α -溴萘等药剂进行化学处理,本研究对材料的预处理则是通过增压条件下的 N_2O 处理达到改良细胞内染色体状态的目的,同时避免了秋水仙素等化学试剂带来的毒害和污染。材料固定的目的是使材料快速

失活和蛋白质沉淀,使材料保持初始状态,卡诺氏 I 固定液和甲醇冰乙酸(1:3,体积比)混合液是常用的固定液,固定液固定时间是影响染色体压片技术的因素之一,本试验选择冰乙酸固定材料 2 h,取得了较好的效果。解离是植物染色体制片过程的重要环节,解离能分解细胞壁,消除细胞内溶物,增加染色体清晰度,解离方法有酸解法和酶解法,酸解法往往因酸解过度造成染色体损伤,目前多采用酶解法,对于酶解时间,回归分析选优结果表明,采用 2 % 纤维素酶和 0.5% 果胶酶混合液 37 °C 下酶解材料 6.0 h 最适宜滴片法制片。不同于压片法和火焰干燥法,滴片法的制片质量取决于滴片技术,而滴片距离直接决定染色体制片的成败,滴片距离过小,细胞内染色体交叉重叠、分散性差,滴片距离过大则细胞内染色体过度分散、细胞间染色体混杂,回归分析选优结果发现,细胞悬液以 35.0 cm 的距离滴片可获得分散性好、细胞内染色体数目完整的高质量制片。滴片法常规试验中多采用 20.0 cm 左右的滴片距离,35.0 cm 的滴片距离在实际操作中可能存在滴片不准、细胞悬浮液流向边缘导致浪费等问题。因此,在实际的试验操作中,需综合考虑,或反复进行滴片技术的训练,以达到最佳的制片效果。

3.2 植物染色体制片技术

染色体制片质量是制约细胞生物学和分子生物学发展的重要因素,一张高质量的染色体制片要求细胞有丝分裂中期相多、染色体分散无重叠及染色体完整性好^[17-19]。目前国内外通常采用压片法和低渗涂片法进行染色体制片^[20]。染色体压片技术作为常用的染色体制片方法,被广泛应用于各类生物,尤其是植物染色体研究^[21]。压片法虽然操作简单实用,但需要适宜的取材时间和娴熟的压片技术,对操作者的操作技术要求较高^[22]。染色体低渗涂片技术的核心是将试验材料均匀涂布在载玻片上,从而有效降低压片法所造成的染色体重叠^[23]。低渗涂片法尽管对操作技术要求不高,且制片效果较好,但其操作过程涉及火焰干燥和盖玻片压片,从而影响染色体完整性。染色体滴片法是将处理后的试验材料捣碎于冰醋酸溶液,然后制成细胞悬液,细胞悬液利用自身重力滴落在玻片上,保证了细胞中染色体的分散性和完整性^[24-25]。滴片法是一种新的染色体制片方法,目前国内尚未见有关滴片技术研究的相关报道,鉴于滴片法的技术优势,它将广泛应

用于染色体研究,进而促进细胞遗传学和分子生物学的发展。为规范染色体滴片技术,本研究基于前期的染色体滴片技术经验,通过设置染色体滴片技术关键处理因子,采用回归分析模型,确立了最佳玉米染色体滴片技术方案。由此制作了高质量的染色体制片,制片中细胞有丝分裂中期相多、细胞内溶物和杂质少、染色体着色均匀、染色体交叉重叠少、具有完整染色体组($2n=20$)的细胞较多。

参考文献:

- [1] 李懋学,张赞平. 作物染色体研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:58-92.
- [2] 马婷玉,李明,吴燕燕,等.穿心莲染色体制片优化及核型分析[J].江苏农业科学,2017,45(7):33-36.
- [3] MCFEE A F, SAYER A M, SAOMAA S I, et al. Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes[J]. Environ Mol Mutagen, 1997, 29: 98-104.
- [4] PENG R H, LIU F, HU X, et al. Microdissection and microcloning of chromosome 5 in *Gossypium arboreum*[J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 30(5): 1218-1228.
- [5] JONES N, HOUBEN A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8: 417-423.
- [6] HU Z M, CUI L H, WANG L L, et al. Isolation of single chromosomes and chromosomal fragments of *Lilium regale*[J]. Acta Genetica Sinica, 1997, 24(3): 278-281.
- [7] 杨大翔. 遗传学实验[M]. 3版.北京:科学出版社,2016:3-98.
- [8] 潘 颀,王 芳,郝爱花,等.新疆紫草不同材料染色体制片技术研究[J].新疆农业科学,2013,50(9):1642-1650.
- [9] 劳世辉,魏岳荣,盛 鸥,等.菠萝蜜的染色体制片优化及核型分析[J].中国农学通报,2011,27(16):215-219.
- [10] 陈 雪,商 超,张晓莹,等.射干染色体制片技术的探索[J].中国园艺文摘,2016(1):9-12.
- [11] 刘 丹,夏 雪,吴益梅,等.植物染色体制片效果影响因素的解析[J].浙江农业科学,2015,56(10):1654-1657.
- [12] BARCH M J, KNUTSEN T, SPERBUCK T L. AGT cytogenetics laboratory manual[M]. 3rd. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1991: 39-46.
- [13] JONES R N, GONZALEZ-SANCHEZ M, GONZALEZ-GARCIA M, et al. Chromosomes with a life of their own[J]. Cytogenet Genome Res, 2008, 120(3/4): 265-280.
- [14] DENG W T S, LUCAS J N, LEUNG C S, et al. A new method for improving metaphase chromosome spreading[J]. Cytometry Part A the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2003, 51(1): 46-51.
- [15] 贾 建. 沙果果醋醋酸发酵工艺条件的优化[J]. 中国调味品, 2015, 40(4): 42-45.
- [16] 叶双峰,叶书有,张 影. 回归最优设计进行无花果施肥的研究[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(2): 25-27.
- [17] HENEGARIU O, HEEREMA N A, WRIGHT L L, et al. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing[J]. Cytometry, 2001, 43(2): 101-109.
- [18] MASONBRINK R E, BIRCHLER J A. Sporophytic nondisjunction of the maize B chromosome at high copy numbers[J]. J Genet Genomics, 2010, 37(1): 79-84.
- [19] LAMB J C, MEYER J M, CORCORAN B, et al. Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize[J]. Chromosome Research, 2007, 15(1): 33-49.
- [20] WANG H, WAN Y. A modified method for improving the quality of metaphase preparations[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2013, 21(7): 64-65.
- [21] 徐道娜,薛志强,李世栋,等.西瓜染色体压片技术改进研究[J].西北农业学报,2007,16(6):301-304.
- [22] 姚启伦.玉米染色体制片技术中关键因子处理效应及优化[J].湖南农业大学学报,2007,33(4):419-422.
- [23] KATO A, LAMB J C, BIRCHLER J A. Chromosome painting in maize using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(37): 13554-13559.
- [24] KATO A. Air drying method using nitrous oxide for chromosome counting in maize[J]. Biotech Histochem, 1999, 74(3): 160-166.
- [25] AHLADA M R, RAO I, VICTOR R, et al. Slide making and prototype of a dropper device for chromosomal preparations[J]. Int J Hum Genet, 2005, 5(3): 213-216.

(责任编辑:陈海霞)