

染色体制备实验技术的优化

赖娅娜^{1*}, 周洲²

¹南京医科大学医药实验动物中心, 江苏省医药动物实验基地, 江苏省动物实验中心, 江苏 南京

²南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京

收稿日期: 2022年6月15日; 录用日期: 2022年7月7日; 发布日期: 2022年7月14日

摘要

染色体制备实验技术是生命科学领域各专业学生都须掌握的一项基本实验技能。本文从实验前准备、标本的处理、制片方法、压片方法以及显微拍摄方法等各个实验课程环节进行了创新性优化和改进。在要求学生熟练掌握操作步骤的同时, 强调指导学生开展自主探究性实验, 帮助提高学生实验操作效率, 激发学生对科学探究实验的兴趣, 提高分析问题和解决问题的能力, 为新形势下提升具体高校实验教学工作提供了借鉴。

关键词

实验技术, 染色体制备, 显微拍摄

Optimization of Chromosome Preparation Technology

Yana Lai^{1*}, Zhou Zhou²

¹Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Jiangsu Animal Experimental Center of Medical & Pharmaceutical Research, Nanjing Jiangsu

²School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing Jiangsu

Received: Jun. 15th, 2022; accepted: Jul. 7th, 2022; published: Jul. 14th, 2022

Abstract

Chromosome preparation experimental technology is a basic experimental skill that all students majoring in life science learn to master. In this paper, innovative optimization and improvement have been made in the aspects of pre experiment preparation, specimen processing, production

*通讯作者。

method, tablet pressing method and micrograph method. While requiring students to master the operation steps, it emphasizes on guiding students to carry out independent inquiry experiments, helping to improve students' experimental operation efficiency, stimulating students' interest in scientific inquiry experiments, and improving their ability to analyze and solve problems, which provides a reference for improving specific experimental teaching in Colleges and Universities under the new situation.

Keywords

Experimental Technology, Chromosome Preparation, Photomicrography

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

遗传学是生命科学领域发展的前沿学科之一[1]。随着生命科学的飞速发展,新的研究方法和技术不断涌现,使得遗传学的发展日新月异,由此带来了遗传学实验教学内容的不断更新。新形势下,在确保教学规范性的前提下,在教学过程中积极地改变教学观念和教学手段,通过优化现有的实验课项目内容和流程,提高学生的学习兴趣成为实验课教学改革中尤为值得关注的问题[2] [3] [4]。在新的高校实验教学培养理念和改革形势下,许多高校对遗传学实验改革做了很多探索与改进,增加了一些新的实验项目。在遗传实验教学中,染色体制备、获取和分析实验是正确理解染色体学说的经典实验,即使在当下仍在生命科学领域研究与实践方面占据特殊地位[5]。染色体制备与核型分析不仅仅是培养学生染色体制备技术的基础性实验,对于培养和提高学生创新能力与综合素质也具有重要意义。我们结合多年的实验教学经历,比较和借鉴同行实验室的经验,创新性的增加实验材料准备、实验试剂配制等实验准备环节,鼓励学生全程参与实验方案设计,通过增加实验的探索性和趣味性,激发学生学习兴趣,创新性的提供便捷化与规范化的实验步骤,对实验技术方法和流程进行改进与优化,达到良好的染色体制备实验课教学效果,同时为其它实验内容和技术提供改革思路。

2. 技术优化

1) 准备工作改进:实践中处于细胞分裂状态的植物组织都可作为植物染色体制片的实验材料,其中根尖是用于染色体制片的最常用的材料,因为其细胞分裂旺盛,生长不受季节限制且易于获得,但为了确保实验的规范与实验结果的成功率,实验室仍然提供常见的洋葱或蚕豆作为实验材料。改进后可同时要求学生自主选择与探索其它实验材料进行实验探索与操作,例如选择大蒜、水仙、葱等植物进行培养,当植物发根培养的根长达到一定长度(如2 cm)后将其分出一组置于低温(如0℃~4℃)培养(如24小时)作为对比,增加低温培养主要目的是为了尽可能获得更多的处于分裂期的根尖细胞。

2) 预处理方法改进:为了在根尖培养过程中,用适当物理或化学方法处理,促使根尖细胞周期停留在有丝分裂中期,尽可能获得中期分裂较多的细胞,便于后期染色体观察与拍摄,同时积极鼓励学生实验预处理方法进行改进与探索,夯实实验操作技能,从而激发他们学习兴趣。改进后方法可采用多种处理方法,物理方法可采用如提供冰水混合物进行低温培养,化学方法采用秋水仙素溶液、对二氯苯饱和溶液、8-羟基喹啉溶液等方法处理根尖,促使后续实验能获得更多的中期细胞分裂相。

3) 增加染色前低渗步骤[1]:常规酸解和压片制备植物染色体实验中通常没有低渗步骤,但因为学生

实验需要在较短时间内, 制作大量染色体标本制片, 而样品的低渗步骤的增加, 可以让学生在后续操作中更容易找到质量上佳的标本制片。因为在低渗环境中, 细胞易吸水膨胀, 染色体更易分散, 便于后期观察。另外, 低渗时间的长短关系到染色体分散的好坏, 时间不足染色体分散不好, 低渗过度则染色体分散过度甚至丢失。具体来说是为了促进细胞膨胀, 低渗处理前用蒸馏水洗净材料, 吸干水分, 切取整个根(2 cm 左右)置于 75 mM KCl 溶液中, 在 25℃左右条件下前低渗 30~60 min。

4) 解离方法选择: 为了使细胞间易于分离, 去除部分细胞质以使细胞质背景趋于一致方便观察染色体。需要对植物的细胞壁进行解离操作, 常用的方法有酶解和酸解的方法, 其中酶解方法相对繁琐, 耗时较长, 法用于染色体显带技术或姊妹染色单体交换研究。而酸解方法步骤简便、容易掌握、成本低廉。采用酸解法可快速大量制备染色体标本, 而且对学生初次学习染色体制备的操作经验和熟练程度要求较低, 是实验课中植物根尖理想的解离方法。低渗好的根用去离子水冲洗 2 遍, 吸干水分后进行酸解解离, 在细胞壁软化后, 采用去离子水冲洗和浸泡实验材料, 使其进行低渗条件下促进细胞膨胀和染色体分散。

5) 增加后低渗步骤[6]: 选取已处理过的根尖一枚, 放在干净载玻片中央, 刀片去除非分生组织的部分, 并已滤纸吸去多余水分; 采用 25℃~30℃去离子水多次从样品上方轻柔清洗去除掉酸解液以利于着色。用去离子水继续浸泡实验材料, 对植物根尖细胞进行膨胀化处理, 在蒸馏水中停留 10~30 min 进行后低渗处理, 使染色体尽可能分散。

6) 制片方法改进: 采用合适的压片前处理方法, 可以显著减少细胞重叠的数量。传统方法是把漂洗好根置于载玻片上, 切下约 1~2 mm 的根尖, 其余部分丢弃, 在根尖上滴上染色液, 染色好后直接进行压片, 该方法虽然便捷, 但是细胞容易重叠。改进后的方法是切下根尖后, 另取一张干净载玻片, 呈十字形交叉盖在含有根尖的载玻片上, 用大拇指按压在载玻片的中央, 使根尖压成一薄层; 然后将两载玻片分开, 根据需要可以继续取干净的载玻片进行重复按压操作, 从而使得根尖细胞尽可能分散开, 然后各滴 2~3 滴染色液进行染色, 染色时间为 10~20 分钟。

7) 压片方法改进: 采用合适的压片技术, 简化实验操作, 提高实验效率。如果材料足够, 学生可以大量进行染色体制片操作。传统的压片是轻轻盖上盖玻片, 将滤纸覆盖在盖玻片上, 并用大拇指轻轻按压, 滤纸吸去多余染液后, 用铅笔的橡皮头部轻轻敲打盖玻片, 使细胞分散, 并且将片中空气驱赶出去, 再用滤纸吸去边缘多余染液, 在光学显微镜下面观察拍照。改进后直接轻轻盖上盖玻片, 然后用一张大小合适的滤纸对折(对折后宽度略大于盖玻片), 弯对折后夹住载玻片与盖玻片, 覆盖在盖玻片上; 然后一手固定盖玻片, 另一手大拇指大力摁住滤纸条, 持续按同一方向转动, 使根尖细胞均匀分散。

8) 显微拍摄方法改进: 将制作好的压片置于显微镜的载物台上, 先用低倍镜调焦观察, 在显微镜下检查染色体分散程度, 从大量制备的染色体标本挑选出分裂相多, 染色体分散均匀片子, 仔细观察确认中期分裂相的细胞的染色体分布状态, 寻找染色体集中而不重叠, 着丝粒、次缢痕和随体清晰, 染色体长度适中而不弯曲、不扭曲、不断裂的染色体调整到中间视野, 再转换到高倍镜如油镜下进行观察, 采用显微镜图像采集系统进行拍摄和保存染色体图像。

专业的图像采集系统通常无法给每位同学配备, 这时可以考虑结合智能手机, 实践中可采用智能手机拍摄显微镜图像, 为了便于后期核型分析, 在所拍摄的目镜中添加目镜测微尺, 然后拍摄高倍镜下染色体图像, 同时可以用镜台测微尺在高倍镜如油镜下对其进行标定后拍摄用于核型分析的照片, 并尝试通过镜台测微尺校正目镜测微尺测量的长度。若一次性无法拍摄所有染色体的清晰图像, 这时可以在不同焦距下对同一个视野的图像进行多次拍摄, 从而获得满意的染色体图像。

3. 总结

遗传学实验是一门实践性很强的专业基础课。染色体观察与制备作为理解染色体学说和科学研究实

践的经典实验, 是遗传学实验教学的重要组成部分[7] [8]。本文通过在教学实践中优化与改进实验方法, 从实验材料培养、预处理和前处理、后处理与压片、实验图像拍摄等各个环节着手, 探索出一套操作成功率更高、实践效果更好的学生实验教学技术和方法。增加的低渗步、后低渗步骤和改进压片方法提高了实验的成功率, 制片方法和压片方法的改进则从一定程度上简化了实验流程, 准备工作中环节鼓励学生自主选择实验材料的种类、预处理方法和解离方法和分组对比提高学生探索和学习的积极性, 从不同层面既保证了实验课教学效果又提高了实验效率, 为同行实验教学及准备工作提供可行的参考。生命科学离不开科学实验, 而实验教学又是理论知识的延续、补充和完善, 实验课程不仅能够培养学生的动手能力, 更重要的是能够培养学生的观察问题、分析问题和解决问题的能力。随着生命科学的高速发展, 作为高校实验课教师, 应潜心教学和努力营造良好的教学环境、积极探索适应新时代的实验教学内容和方法, 从而为社会培养大批高素质的具有动手能力和创新能力的专业人才。

参考文献

- [1] 黄飞飞, 解增言. 遗传学教学改革思考与实践[J]. 广东化工, 2015, 42(22): 193-194.
- [2] 肖伟才. 理论教学与实践教学一体化教学模式的探索与实践[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(4): 81-84.
- [3] 黄继英. 国外大学的实践教学及其启示[J]. 清华大学教育研究, 2006(4): 95-98.
- [4] 强华, 李正网, 武时会. 高校实践教学考核方式探索[J]. 实验技术与管理, 2018, 35(6): 170-173.
<https://doi.org/10.16791/j.cnki.sjg.2018.06.042>
- [5] 薛红. “遗传的染色体学说”教学的组织[J]. 生物学通报, 2009, 44(10): 35-38.
- [6] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物染色体标本制备的去壁、低渗法及其在细胞遗传学中的意义[J]. 遗传学报, 1982, 9(2): 151-159.
- [7] 刘志祥, 曾超珍. 本科细胞遗传学核心实验的模块化教学探索[J]. 现代农业科技, 2020(15): 255-256+258.
- [8] 何世斌, 王翔伍, 吉逢逢, 吴礼芳, 王基. 遗传学实验教学的改进与实践[J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(2): 156-159.