

染色液の調製法に関する実験

誌名	農業技術
ISSN	03888479
巻/号	2611
掲載ページ	p. 525-526
発行年月	1971年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



る以上の施用は無駄が多いものと考えられた。

(北海道農業試験場農芸化学部)

関係文献

1) 山口紀子・志賀一一・三宅正紀 (1971): 北農38巻7号1

-14.

- 2) 深井強・串崎光男 (1952): 北農試彙報63, 37-42.
3) 藤原忠 (1962): 北海道における冷害危険度の推定と今後の研究上の問題点, 北海道農試, 北海道立農試 p57.

染色液の調製法に関する実験

岩崎文雄 福沢 務

組織解剖, 染色体の観察など, 生物学の実験では切片を染色して行なう場合が多い。そして, これらの染色法によって各種研究の成果があげられてきたのであるが, 染色方法あるいは染色液の作り方についてはあまり検討が加えられず, 従来の方法によって行なっているのが現状である。

著者らはこれまで染色体の染色法について2・3検討を加えてきたが, 現在使用している染色液の作り方が最良なものであるのか, さらに改良する余地はないのか, などについて検討し, 結果がえられたので報告する。

1. 実験方法

本実験では酢酸カーミン, 酢酸オルセインおよびピロニン・メチルグリーン液について行なった。

このうち, 酢酸カーミンと酢酸オルセインの調製法は次のようにした。

(1) 45%酢酸に1%になるように試薬を加え, その後に加熱した。

(2) 45%酢酸を加熱し, 沸とうしてから1%になるように試薬を加え, ふたたび加熱した。

(3) 45ccの水酢酸を加熱してから1gの試薬を加え, ふたたび加熱し, その後に55ccの水を加えた。

(4) 45%酢酸に1%になるように試薬を加え, そのまま放置した。

各試薬の調製法とも加熱は1, 2, 4および6時間とし, 加熱は三角フラスコに長いガラス管をつけたゴム栓をして行なった。

ピロニン・メチルグリーン液の場合は, 岩崎・河村ら(1967)のようにブタノール可溶部分のピロニンをとることを省略して, 0.5%のピロニン水溶液を用いた。

染色体の観察は, 根端の場合にはニンクで行なった。すなわち, 根端を1規定塩酸で10分間処理し酢酸オルセインを入れた時計皿に移し, 加熱してから押しつぶして検鏡した。

花粉母細胞(PMC)は, 菜類の花蕾を用いて行なった。すなわち, 上記の酢酸カーミンをスライドグラス上

にとり, その中にオシベを2~3本とり, なすりつけて検鏡した。

ピロニン・メチルグリーンの場合は岩崎・河村(1967)と同様, 根端を1規定塩酸で10分間処理し, 水洗後ピロニン・メチルグリーン混合液に入れ, 20分間放置後押しつぶして検鏡した。

2. 実験結果

1) 各染色液の呈色状態 本実験では, 試薬の調製法をいろいろかえて, その影響を調べたのであるが, まず試薬の呈色状態にみられる変化を述べる。

酢酸オルセインの場合: 水酢酸および45%酢酸に試薬を加えてから加熱したものと, 水酢酸および45%酢酸を加熱してから試薬を加え, その後さらに加熱したものとの間には呈色の差はみられない。また, 加熱時間を1, 2, 4および6時間としたが, 呈色状態には差が認められなかった。これに対して, 45%酢酸を加熱しないでオルセインを加えて放置したものでは, 調製直後のものはややうすく, 明らかに呈色に差がみられるが, 放置して日時を経るに従って変色が起こり, 2カ月後にはほとんど加熱したものととの呈色の差は認められなくなった。

酢酸カーミンの場合: 45%酢酸で加熱したものは, オルセインの場合と同様, 試薬を加える時期, 加熱時間の長短に関係なく呈色状態には差が認められない。これに対して, 45%酢酸を加熱せずにカーミンを加えて放置したものでは, 鮮紅色を呈し, 加熱したものととは明瞭に異なり, しかもこの相違は6カ月を経ても認められた。

また, ピロニン・メチルグリーン法でのピロニンの調製の場合, ブタノール抽出をしてブタノールをとばしてから水溶液としたものと, ピロニンを直接水に溶かしたものとの間には呈色上の差は認められない。

2) 染色体の染色状態 酢酸オルセインの場合: 45%酢酸を加熱してから試薬を加えて, さらに加熱したものと, 試薬を加えてから加熱したものの染色程度を比較したが, 両者の間には差が認められなかった。しかも, 加熱時間を1, 2, 4および6時間として加熱時間と染色

程度の関係を調べたが、加熱時間の長短による染色程度の差は認められなかった。ただ、氷酢酸を加熱して試薬を加え、さらに加熱し冷却したあと蒸留水を加えて濾過したものでは、染色程度がきわめて悪かった。無加熱区の場合、調製当初は染まらないが、冬期でも2カ月放置すると染まり、加熱区と同様な染色状態を示す。

酢酸カーミンの場合：酢酸カーミンの場合も、オルセインと同様、加熱前に試薬を入れたものでも加熱後に入れたものでも染色程度には差が認められない。また、加熱時間の長短による差もないが、カーミンの無加温区は6カ月放置後でも染色体を染めることはできなかった。

3. 考察

1) 試薬の調製方法 これまでの酢酸カーミン、酢酸オルセインの調製方法を調べてみると、酢酸カーミンの場合は、45%酢酸にカーミンを加えて加熱する方法が行なわれているが、酢酸オルセインの場合は、吉田(1956)、長尾ら(1956)および西山(1961)とも氷酢酸45ccを加熱したものに試薬を加えて、さらに数時間加熱し、冷却後に55ccの水を加えて濾過して作る方法が行なわれているが、本実験では試薬の調査方法をいろいろと変えて行なってみた。

その結果、酢酸カーミン、酢酸オルセインとも45%酢酸を作り、それに試薬を加える方法では、1時間以上加熱さえすれば試薬を加える時期には関係なく染色体を染めることができた。そして、試薬調製時の加熱時間も、1、2、4および6時間について行なってみたが、1時間加熱したものでも染色液として十分使用できることもわかった。ところが、氷酢酸を加熱したものに試薬を加えて作る方法では、調製直後の染色液では染色体はよく染まらなかった。

一方、45%酢酸を加熱せずに試薬を加えて放置したものでは、オルセインでは2カ月以上放置すれば、加熱したものと同様に染色体を染めることができたが、カーミンの場合は6カ月後でも染めることができなかった。

以上のことから考えると、これらの試薬の調製法としては加熱することに意味があり、試薬はいつ加えてもよいことがわかった。さらに、この加熱の問題は自然状態に放置することで代替されうるのであるが、このことは長尾ら(1956)、西山(1961)のようにヘマトキシンリン試薬を調製するとき、酵熟させると称して試薬を調製後、長期間放置する方法が知られているが、本実験で行なった放置区と同じ意味を有するものかどうかについては、今後検討するべき点である。いずれにしろ、加熱(あるいは長期間の放置)は水の中に染色剤の粒子が均一に分散するために必要な処置なのではなからうか。こ

のように考えた場合、氷酢酸を加熱して調製する従来の方法でよく染めることができなかったのは、最後に水を加えたために、この均一性が乱れたために起こる現象であると考えられる。なお、この最後に水を加える方法でも試薬を調製してから日時を経れば使用可能になるが、これは本実験結果からも当然考えられることである。

つぎに、ピロニン・メチルグリーン液の場合、とくにピロニン液の調製を岩崎・河村(1967)のように行なうと、試薬の調製に長時間を要するのみでなく、真空ポンプがないときには、いっそう長時間を要する。一方、ピロニン・メチルグリーン法によって染色体を染める場合、メチルグリーンによって染色体が、ピロニンによって細胞質が染められるが、この場合、ピロニンは染色体観察での従属的な役しか演じていない。このようなことから、ピロニンには少量の不純物が混在しても影響がないのではなからうかと考えて実験した。その結果、ピロニンをブタノールで抽出したものと水に溶かして直ちに用いたものとの間にはほとんど差が認められなかった。

以上、酢酸カーミン、酢酸オルセインおよびピロニン・メチルグリーンなど染色体の染色に用いられている染色液の調製法に検討を加えたのであるが、従来の調製法にはかなり改善してもよい点のあることがわかった。

4. 摘要

(1) 染色体の染色に用いられている酢酸カーミン、酢酸オルセインおよびピロニン・メチルグリーン液の調製方法に検討を加えた。

(2) カーミン、オルセインとも45%酢酸に加えて1時間以上加熱すればよく、試薬はいつ45%酢酸に加えてもよいことがわかった。

(3) 氷酢酸を加熱して試薬を加え、冷却してから水を加えて作る酢酸オルセインは、調製直後では染色程度がきわめて悪かった。

(4) 酢酸オルセインは45%酢酸に試薬を加えてそのまま放置しても、2カ月後には加熱したものと同様に使用できるが、酢酸カーミンは6カ月放置しても染色体を染めることはできなかった。

(5) ピロニン・メチルグリーン染色液ではピロニンを直ちに水に溶解させても使用できることがわかった。

(東京教育大学農学部)

引用文献

- 1) 岩崎文雄・河村重行 1967. 農技 22(2): 78~79.
- 2) 岩崎文雄 1970. 農技 25(5): 230~231.
- 3) 長尾・高橋・鈴木 1956. 農学実験法, 養賢堂.
- 4) 西山市三 1961. 細胞遺伝学研究法, 養賢堂.
- 5) 吉田俊秀 1956. 遺伝学ハンドブック, 技報堂.