

细胞松弛素 B 诱导马氏珠母贝四倍体形成机制研究*

Mechanism of the Formation of Tetraploids of *Pinctada martensii* Induced with Gytochalasim B

兰国宝 谢若痴 阎冰 叶力 陈文广 王爱民
Lan Guobao Xie Ruozhi Yan Bing Ye Li Chen Wenguang Wang Aiming

(广西海洋研究所 北海市长青东路 92 号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要 为了解在珍珠贝多倍体诱导中四倍体形成的机制,用醋酸地衣红染色技术研究抑制马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 受精卵第一极体排放后的染色体行为。试验用贝为人工养殖贝,贝龄为 2~3 龄。试验用水为沙滤海水,海水比重 1.018~1.020, pH 值 8.10~8.30, 26°C~28°C 下人工授精,授精前用 6% 10⁻⁶ 氨水处理卵子 10 min~15 min。处理组用 0.5 mg/L 细胞松弛素 B (CB) 处理受精卵 15 min; 对照组为不做任何处理的受精卵。受精后每隔 3 min 取样观察,直至受精后 60 min。观察结果表明,在第 2 次减数分裂期间,染色体分离有 4 种主要类型,即“随机三极分离”(28.1%)、“不混合三极分离”(7.6%)、“联合双极分离”(19.3%)和“离散双极分离”(13.6%),余下的 31.5% 因染色体混乱或难以确定而无法分类,但似乎是以上 4 种分离的变体。在受精后 33 min~42 min,在联合双极、三极和离散双极分离的细胞中分别形成 2、3 和 4 个原核。将各种分离类型所出现的频率与产生的三倍体 (33%) 和四倍体 (22%) 比较,表明导致四倍体形成的是“离散双极分离”;“不混合三极分离”也可能导致四倍体的形成;导致三倍体形成的是“联合双极分离”;导致非整倍体形成的是“随机三极分离”和其他不规则的分离。

关键词 马氏珠母贝 受精卵 染色体分离 四倍体

中图分类号 S 968.316; Q 343.24

Abstract To probe into the mechanism behind the formation of tetraploids in multiploid induction of pearl oyster, chromosome behaviour in fertilized eggs of *Pinctada martensii* following inhibition of the first polar body (PB1) was studied with acetic orcein staining techniques. The parent pearl oysters used were collected from the cultured population, aged two to three years. Gametes were obtained by strip-spawning. All fertilization and incubation were conducted at 26°C to 28°C using filtered seawater with specific gravity of 1.018 to 1.020 and pH value 8.10 to 8.30. Eggs were activated by ammonia with a concentration of 6% 10⁻⁶ for 10 min to 15 min before insemination. Two experimental groups were produced after insemination. In the treated group, the fertilized eggs were treated with 0.5 mg/L cytochalasin B (CB) for 15 min beginning at 5 min after insemination. In the untreated group, the fertilized eggs were allowed to develop as controls. Samples for analysis were collected every three minutes from the beginning of fertilization to 60 min post-fertilization. The results showed that, in the treated group, four types of chromosome segregation were found in the second meiosis (MII), namely “randomized tripolar segregation” (28.1%), “unmixed tripolar segregation” (7.6%), “united bipolar segregation” (19.3%) and “separated bipolar segregation” (13.6%). The remaining 31.5% could not be classified because of chromosome disorganization, but appeared to be variants of the above. At 33 min to 42 min post-fertilization, two, three and four female pronuclei could be seen respectively in the eggs with united bipolar, tripolar and separated bipolar segregation. In comparison with the frequencies of segregation patterns and the turnout of triploid (33%) and tetraploid (22%), it seemed clear that resulting in tetraploids was separated bipolar segregation, and unmixed tripolar segregation might also develop to tetraploids; resulting in triploids was united bipolar segregation and resulting in aneuploids was randomized tripolar segregation and other irregular segregation.

Key words *Pinctada martensii*, fertilized eggs, chromosome behaviour, tetraploids

自 Stanley^[1]用细胞松弛素 B (CB) 处理美洲牡蛎

(*Crassostrea virginica*) 受精卵获得多倍体以来,贝类多倍体育种研究十分活跃,已在 30 多种海产贝类中进行多倍体诱导。一般认为,通过物理和化学等方法抑

制贝类受精卵的第一极体 (PB1) 或第二极体 (PB2) 可产生三倍体,但是在诸多的三倍体诱导研究中发现,除了三倍体以外,还有四倍体和非整倍体产生^[1-6]。这说明,抑制 PB 后,染色体发生了复杂的变化。Guo 等^[7]在用 CB 抑制太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 受精卵 PB 产生的遗传效应的研究中,观察到典型的四种染色体分离现象,即“随机三极分离”、“不混合三极分离”、“联合双极分离”和“离散双极分离”,并认为,由联合双极分离和离散双极分离释放两套单体而形成三倍体,由离散双极分离或不混合三极分离释放一套单体而形成四倍体。后来 Que 和 Guo 等^[8]在用 CB 抑制三倍体太平洋牡蛎受精卵 (与二倍体精子杂交) 的研究中,也观察到这几种染色体分离类型。这说明太平洋牡蛎多倍体的形成与这几种染色体的分离行为有密切关系。那么,马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 三、四倍体的形成是否也是这样呢? 目前除了 Komaru 等^[9]用荧光显微技术观察 CB 抑制 PB 后受精卵中原核发生的变化情况外,还没有见有关于马氏珠母贝多倍体的形成与染色体分离行为有关的研究报道。

本研究的目的是通过抑制马氏珠母贝 PB 的形成,观察染色体如何分离及其与四倍体形成的关系,为改进和提高四倍体诱导技术提供细胞学证据。

1 材料与方法

实验于 1999 年 5~8 月间进行。所使用的马氏珠母贝亲贝是由北海市珍珠养殖场提供的人工养殖贝,贝龄为 2~3 龄,使用性腺发育较好的雌贝 3~4 只,雄贝 2~3 只。CB 为 Sigma 产品。

用剖取法获得精卵。吸取精卵前,分别取每个个体组织细胞进行 DAPI 染色,用德国产的多倍体检测仪检测,确认二倍体。

人工授精在 26°C~28°C 下进行。实验用水为沙滤海水,海水比重 1.018~1.020, pH 值 8.10~8.30 用 0.006% 氨水激活卵子 10 min~15 min 后,加入精液进行授精。

实验分为 2 组,一组为对照组,受精卵不作任何处理,直接发育成为二倍体。另一组为 CB 处理组,CB 液用含有 0.1% DMSO 的海水配制而成,临用临配,处理浓度为 0.5 mg/L,处理时间为 15 min。

为了观察染色体的分离变化情况,受精后每隔 3 min 分别从处理组和对照组中取样 1 次,直到受精后 60 min 为止。每次样本用 1:3 (v:v) 冰醋酸-甲醇固定液固定 3 次,每次固定 15 min~20 min。

染色体观察按 Guo 等^[7]改进了的醋酸地衣红染

色法进行。处理组多倍体诱导率测定,除了取胚胎期细胞进行染色计数外,同时还以 DAPI 染色,用德国产多倍体分析仪跟踪测定,综合分析结果。

2 结果

马氏珠母贝卵子的发育有明显的不同步现象。在 28°C 下,大多数卵于受精后 15 min~20 min 排出第一极体 (PB1),于受精后 25 min~30 min 排出第二极体。排出第一极体的细胞数从 10% 增加到 70% 时,历时大约 8 min; 排出第二极体的细胞数从 10% 增加到 70% 时,历时大约 10 min。

2.1 对照组染色体分离

马氏珠母贝染色体 $2n$ 为 28 条染色体。在 28°C 下,大多数卵在授精后 5 min, 14 条四分体紧聚在一起,显然准备进入第 1 次减数分裂 (MI) (图 1A)。受精 8 min~12 min 后,大多数细胞进入 MI 后期和末期,此时,2 个二分体组已移向两极 (图 1B),变得浓粗。紧缩。受精 15 min~20 min 后,大多数卵排出第一极体 (PB1) 但有少数卵在受精后 10 min~13 min 就排出 PB1 留在细胞中的二分体组 (图 1C),在受精后 20 min~25 min,进入第 2 次减数分裂 (MII) 后,末期 (图 1D)。受精后 30 min~35 min,大多数受精卵排出第二极体 (PB2) 留在细胞中的 14 条母本单体变得可见。在第 1 次有丝分裂之前,母本染色体作为 14 条被复制的二分体重新出现。与此同时,二分体父本也变得可见。受精后 50 min~60 min,出现第 1 次有丝分裂 (卵裂)。正常二倍体卵细胞的发育见图 1A~D。

2.2 处理组染色体分离

在 28°C 下,加入精液授精 5 min 后,以 0.5 mg/L CB 处理 15 min。CB 处理组在受精后 14 min 内,染色体的分离与对照组一样,没有什么大的区别。处理组与对照组染色体分离方式只有在受精后 17 min~26 min (即 CB 处理 12 min 后) 才显示出其不同所在。对照组在此期间排出 PB1,而处理组 PB 被留下,并向后移动与留在卵细胞中另一套染色体汇合 (图 1E)。受精后 17 min~26 min,来自 MI 的两组染色体共 28 条二分体 (PB 提供 14 条) 进入 MII 时,出现了如下情形:

(1) 三极分离: 来自第 1 次减数分裂 (MI) 的两个二分体组 (一组来自 PB1) 先合并成一簇 (图 1E),于受精后 22 min 随机地分配形成三组,分布于三极空间结构的 3 个分裂平面上,形成三极分离状态 (图 1F)。马氏珠母贝的 2 个二分体组共有 28 条二分体,在随机三极分离中,每极得到 9~10 条二分体。在 MII 末期,每极均收到来自其相邻的 2 个二分体组的单

体, 最后形成平均为 18~19 条单体。在 MII 末期结束时, 3 个单体组变得浓密、紧缩, 并形成清晰可见的 3 个原核 (图 1G), 靠近细胞周边的那一组被作为 PB 排出。

有少数细胞在进入 MII 时, 来自 MI 的 2 个二分体组在分离过程中, 有一组将自身往周边 2 个分离平面分裂成两极, 每极含有 2 条二分体; 另一组却不发生分裂而含有 4 条二分体。由于 2 组二分体在进入三极分离之前, 不相互结合或发生重叠, 按照 Guo 等^[7]的分类法, 属于“不混合三极”分离 (图 1L)。在 MII 末期时, 姐妹染色体发生分裂, 含有 14 条单体的那组染色体可能被拖向周边并作为 PB2 排出。留下的 4 条母本单体可与一套父本染色体结合, 形成四倍体。

另外, 我们还观察到, 在随机三极分离中, 有些细胞 28 条二分体不按 9-9-10 分配成三极, 而是以 8-9-11、6-10-12 或 7-9-12 等不规则的三极形式分离 (图 1N)。

(2) 联合双极分离: 来自 MI 的 2 个二分体组联合在一起, 并形成二极构造而排列在一个分裂平面上 (图 1H)。其姐妹染色单体发生分裂, 并各自向相对的极分离。在 MII 末期时, 每一极上各分布有 28 条染色体。在末期 II 结束时形成 2 个原核 (图 1I), 其中有一个被作为 PB 排出。

(3) 离散双极分离: 两个二分体组不发生重叠和结合, 独立地进入 MII 每组形成一个二极构造, 然后通过染色体迁移而向前运动, 形成 4 组单体。在 MII 末期结束时, 染色体浓缩形成 4 个原核 (图 1J-K)。

(4) 其他类型分离: 除了以上 4 种分离外, 还有许多种中间类型的分离, 例如, 已观察到“不完全联

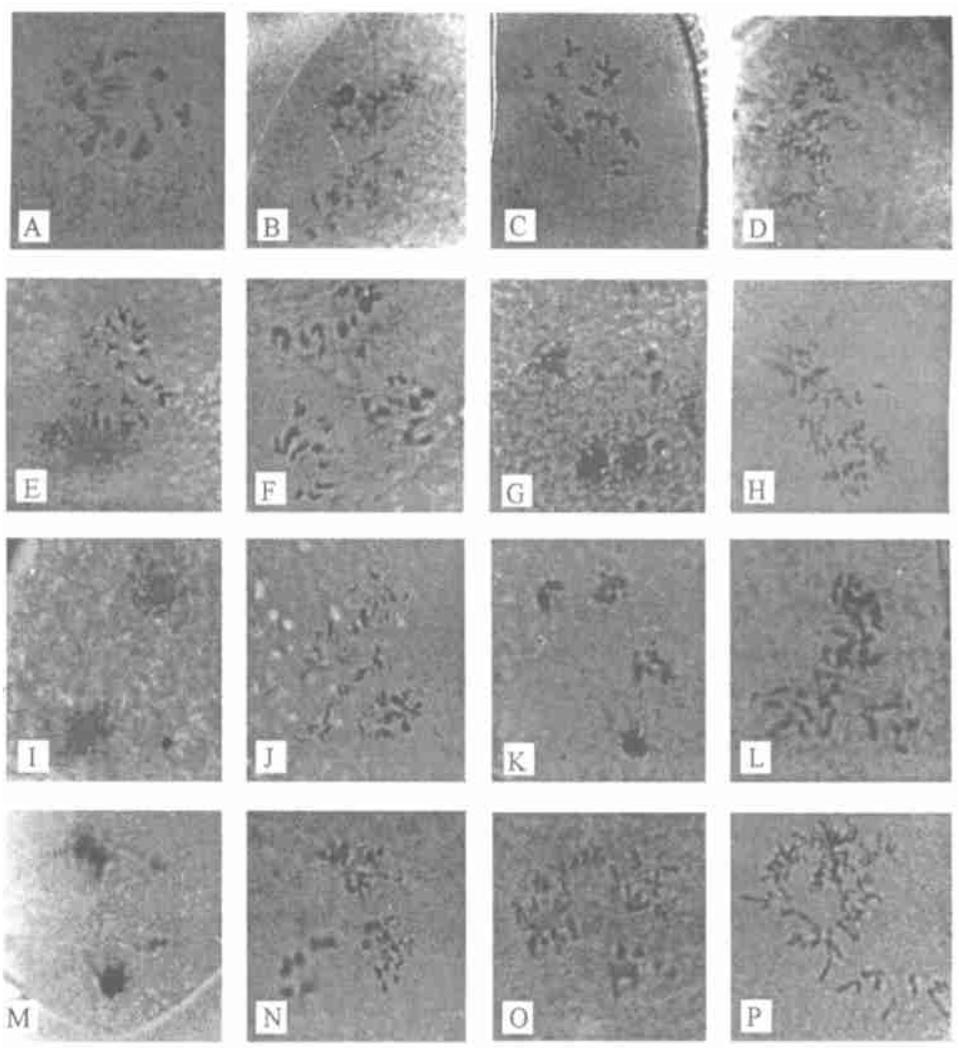


图 1 马氏珠母贝受精卵染色体分离

Fig. 1 Chromosome segregation patterns in fertilized eggs of *Pinctada martensii*

(1) 正常二倍体受精卵的染色体分离 (A~D); (2) 用 CB 抑制第一极体后受精卵染色体分离: 随机三极分离 (E~G), 联合双极分离 (H~I), 离散双极分离 (J~K), 不混三极分离 (L), 不完全联合双极分离 (M) 及其他中间类型分离 (O~P). (1) Normal fertilization (A~D); (2) blocking polar body 1 with cytochalasin B (E~P). E~G Randomized tripolar segregation; H~I United bipolar segregation; J~K Separated bipolar segregation; L Unmixed tripolar segregation; M Incomplete united bipolar segregation; O~P Intermediate segregation.

合双极分离” (图 1M), 但这种分离的细胞很少。有相当多的细胞很难确定是哪一种分离类型, 这与 Guo 等^[7]在观察二倍体太平洋牡蛎受精卵的染色体分离和 Que 等^[8]在观察三倍体太平洋牡蛎受精卵中的染色体分离时所看到的结果相类似, 如有一些为不规则的分离, 并出现“孤独”染色体 (图 1P); 有一些好象是三极结构, 又好象是离散双极结构的分离现象 (图 1O)。此外, 除了卵子发育不同步外, 同一卵内的染色体的形成过程也出现不同步现象 (未列图示)。

另外, 以上这几种类型的染色体分离出现的时间也有所不同。卵子受精后 20 min, 亦即 CB 处理后 15 min, 染色体先出现三极分离, 而其他能观察到染色体的细胞多处于难以确定的分离状态。“离散双极”

分离和“联合双极”分离则在 CB处理后 21 min~ 36 min 才容易观察到。

2.3 处理组原核数量的变化

对照组受精卵在 MII 末期结束时, 形成 2 个可见的原核。CB 处理组卵在受精后 33 min~ 42 min, 形成 2~ 5 个可见的原核。由原核刚形成所留下的痕迹可以判断, 由联合双极分离形成 2 个雌性原核; 由三极分离形成 3 个雌性原核; 由离散双极分离形成 4 个雌性原核。具有 2 个原核的卵细胞可能是二倍体卵的正常分裂, 也可能是联合双极分离极体被排出后形成的 1 个雌性原核和 1 个雄性原核。具有 3~ 4 个原核的卵细胞, 可能是三极分离或离散双极分离分别排出极体后, 各自形成的 2 个或 3 个雌性原核与 1 个雄性原核出现的结果。具有 5 个原核的卵细胞, 无疑是由离散双极分离形成的 4 个雌性原核和 1 个雄性原核组成的, 此时第二极体尚未被排出。

2.4 处理组各种染色体分离类型出现的频率与四倍体诱导率

CB 处理组各种类型的染色体分离所出现的频率, 是在 MII 中、后期通过统计母本染色体组出现的数量而得到的 (表 1)。对于那些难以确定的分离类型也计算在观察细胞总数中。由于 MII 中期和后期历时时间相对较短, 加上染色体往往不是刚好排列在一个平面上, 因此, 要在 MII 期间通过计算染色体数目来确定卵子的倍性相当困难。倍化率是取胚胎期样本通过中期染色体观察加以确定, 并进行数字统计而得到。另外, 非整倍体不但数量多, 而且种类较多, 所以统归类为“其他”一类。

实验观察统计结果表明, 用 CB 抑制马氏珠母贝第一极体排放, 在受精卵进入第 2 次成熟分裂时, 染色体主要以三极分离 (35.7%) 和联合双极分离 (19.3%) 为主, 其次是离散双极分离 (13.6%)。在三极分离中, 随机三极分离占观察总细胞数的 28.1%, 不混合三极分离占 7.6%。其他难以确定的分离类型为 31.5%, 其中有一部分可能是这四种分离类

表 1 用 CB 抑制马氏珠母贝受精卵第一极体各种染色体分离类型出现频率和多倍体形成率

Table 1 Percentage of chromosome segregation patterns and ploidies observed in fertilized eggs of *Pinctada martensii* following the blocking of PB1 with cytochalasin B

交配组 Cross	各种染色体分离类型出现频率 Percentage of chromosome segregation patterns (%)					多倍体形成率 Poidy levels (%)		
	随机三极 Randomized Tripolar	不混合三极 Unmixed tripolar	联合双极 United bipolar	离散双极 Separated bipolar	难确定类 Unclassified patterns	4n	3n	非整倍体 Aneuploid
	I	26.9	8.8	18.1	14.8	31.3	21	33
II	29.2	6.4	20.5	12.3	31.6	23	32	45
平均 Average	28.1	7.6	19.3	13.6	31.5	22	33	46

型的变体, 另一部分可能是畸形染色体。由于我们把不完全联合双极分离当作是畸形分离, 因此也把它们归入不确定的类型中。在这样的染色体分离行为及其出现的频率下, 除了形成约 22% 的四倍体和 33% 的三倍体之外, 还有 46% 的卵细胞形成非整倍体和二倍体。

3 分析与讨论

本研究结果表明, 当用 CB 抑制马氏珠母贝受精卵第一极体释放, 进行三倍体和四倍体诱导时, 染色体也出现“三极”分离、“联合双极”分离和“离散双极”分离等现象, 与 Guo 等^[7]用 CB 抑制太平洋牡蛎受精卵 PB 所观察到的结果一致。Que 等^[8]用 CB 抑制来自三倍体太平洋牡蛎的受精卵 PB 时, 染色体也出现这三种类型的分离现象。除了这三种典型的分离类型之外, 我们还观察到, 马氏珠母贝染色体有“不均等离散双极”分离现象, 即离散双极的四个单体组染色体数目不均等, 这可能是非整倍体形成的途径之一。此外, 一些难以确定的中间类型和“孤独型”染色体等的分离现象也存在。在研究中, 我们还观察到“不混合三极分离”和“不完全联合双极分离”, 但它们出现的频率很少; 而有些“不混合三极分离”在后期 II 却发展成为“离散双极分离”, 即结合状态的那极染色体也发生分离。但未观察到像 Guo 等^[7]在抑制二倍体太平洋牡蛎受精卵 PB 的研究中所观察到的“重叠三极分离”。

用 CB 抑制马氏珠母贝受精卵 PB 后, 来自 MI 的染色体不但在进入 MII 时形成三种类型的分离, 而且还在 MII 后末期形成多个原核。这与 Komaru 等^[9]在马氏珠母贝减数分裂染色体行为的研究中所得到的结果一致。但 Komaru 等^[9]认为, CB 处理可以抑制极体的形成, 但不像矮浪蛤卵那样在减数分裂时有染色体分离现象; 这与我们在本研究中所观察到的情况正好相反, 这可能与研究所使用的材料和方法的不同有关。

关于四倍体、三倍体和非整倍体的形成机制,根据 Guo 等^[7]的研究结果和我们观察到的染色体分离情况作出以下分析(图 2)。三倍体的形成需要保留两套母本染色体,再与一套父本染色体结合而实现。据此,三倍体既可通过联合双极分离形成,又可通过离散双极分离形成。通过这两种分离方式释放两组单体作为第二极体,留下的两套母本染色体,再与一套父本染色体结合而成为三倍体(图 2B, E)。观察结果表明,由联合双极形成三倍体已无可怀疑。但是,离散双极是否也形成三倍体值得进一步研究,因为我们在本研究实验中已经观察到,离散双极分离有只排出一组染色体的趋势;这意味着离散双极分离形成的是四倍体,而不是三倍体。另外,三倍体还可以通过不混合三极分离形成,这时可能是处于结合状态的 2 组单体或处于分离状态的 2 组单体被释放作为 PB2(图 2D)。

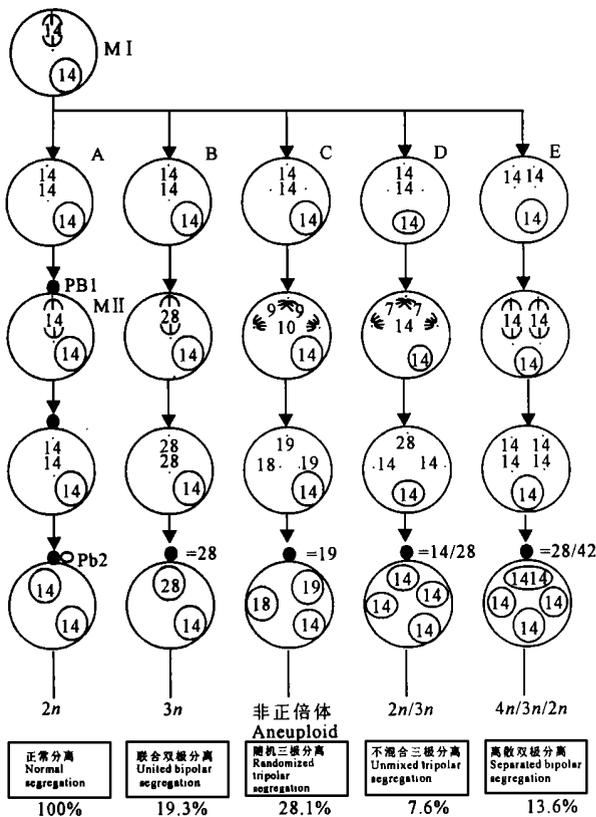


图 2 二倍体马氏珠母贝正常受精卵和 CB 抑制受精卵 PB1 后染色体分离的类型及其形成多倍体

Fig. 2 Schematic summary of chromosome segregation patterns and formation of multiploid in fertilized eggs of *Pinctada martensii* following normal fertilization (A) and blocking polar body 1 with cytochalasin B (B~ E)

四倍体的形成一般是通过离散双极分离释放四组染色体中的一组作为 PB 来实现(图 2D)。另外,在

不混合三极分离中,如果被作为 PB 排出的不是两组单体,而是一组单体,也会导致四倍体的形成(图 2D);尽管我们在本实验中无法观察到这一证据,但从我们观察到的离散双极出现的频率(13.6%)和取得的四倍体诱导率(22%)来看,一部分四倍体由不混合三极分离形成的可能性是很大的。在我们观察到的三极分离中,大约有 21.3% 的细胞可认出不混合三极分离。因此,我们有理由作出这样的判断。

非整倍体显然是三极分离的结果造成的。通过抑制 PB1 而得到 28 条二分体(每组 1 条),在 MII 的三极分裂过程中,形成 3 组染色体,其中有一组被作为 PB 排出,平均上给卵子保留 37~ 38 条母本单体(图 2C)。由 37~ 38 条母本单体染色体与 14 条来自父本的单体结合和复制后,则形成由 51~ 52 条染色体组成的非整倍体。在本研究实验中,我们的确观察到大多数非整倍体细胞含有 50~ 52 条染色体。然而,除此之外,我们还观察到数量不少的卵细胞为靠近 2n 和 3n 的非整倍体,同时还有一些五倍体。这或许如 Guo 等^[7]所述的那样,存在着另外的 2 种可能。第 1 种可能是,三组染色体中的 2 组可能被释放为 PB2,只给卵子留下 18~ 19 条染色体,经过与 14 条父本染色体结合,就形成了只含有 32~ 33 条染色体的非整倍体。另一种可能是,只有一组单体被释放为 PB2,但另外的 2 组却不发生结合而进入第一次有丝分裂(卵裂),或者相互结合后进入子细胞中的一个,结果形成 32~ 33 条染色体的非整倍体,或者形成具有 32~ 33/51~ 52 两条染色体的嵌合性非整倍体。实际上,第 1 种可能已被 Guo 等^[7]在用 CB 抑制太平洋牡蛎受精卵 PB 的研究中所证实,即用 CB 抑制 PB1 后,仍释放 2 个极体。我们在实验观察中无法看出是排出 2 个极体,但却看到三极分离中有两极合二为一往细胞周边迁移,有作为极体排出的趋势。第 2 种可能已被 Komaru 等^[9]在用 CB 抑制马氏珠母贝 PB 的研究中所证实。但在本实验中,我们尚无法由观察结果加以证明。类似地,由来自不混合三极分离所产生的非整倍体平均含有 35 条染色体(图 2D)。另外,由于“孤独”染色体的形成和三极分离、离散双极分离过程中染色体出现不均等的分配现象(图 1N, O),还产生了三极分离以外的其他种类繁多的非整倍体。

总之,用 CB 抑制马氏珠母贝受精卵 PB 诱导四倍体时,可导致染色体产生特定的分离,并相应地形成具有特异分布的三倍体、四倍体和非整倍体。

参考文献

1 Stanley J G, Allen S K, Hidu. Polyploid induced in the *Guangxi Sciences*, Vol. 8 No. 3, August 2001

- American oyster *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 12: 1-10.
- 2 Arai K F, Naito F, Fujino K. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 1986, 52 (3): 417-422.
 - 3 Quillet E, Panelay P J. Triploidy induction by thermal shocks in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 1986, 57: 271-279.
 - 4 Stephens L B, Downing S L. Inhibition of the first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J Shellfish Res*, 7 (3): 550-551.
 - 5 Yamamoto S, Sugawara Y. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 1988, 72: 21-29.
 - 6 Yamamoto S, Sugawara Y, Nomaru T et al. Induced triploid in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae. *Tohoku J Agr Res*, 1988, 39 (1): 47-59.
 - 7 Guo Ximing, Willam K Hershberger, Kenneth Cooper et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster II *Crassostrea gigas* Segregation of chromosomes. *Biol Bull*, 1992, 183: 387-393.
 - 8 Que Huayong, Guo Ximing, Fusui Zhang et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I. *Biol Bull*, 1997, 193: 14-19.
 - 9 Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T et al. Chromosome behavior of meiosis-inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56: 1419-1422.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 198页 Continue from page 198)

参考文献

- 1 慈云祥, 张春阳, 冯 军. 细胞凋亡分析测试方法的研究进展. *化学进展*, 1998, 10 (4): 344-348.
- 2 姚守拙. 21世纪的分析化学. 北京: 科学出版社, 1999. 244-245.
- 3 Liu S P, Liu Z F. Studies on the resonant luminescence spectra of rhodamine dyes and their ion-association complexes. *Spectrochimica Acta*, 1995, 51A: 1492-1496.
- 4 Pasternack R F, Collings P J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269: 935-939.
- 5 梁 宏, 沈星灿, 蒋治良等. 共振 Rayleigh 散射研究 I 与血清白蛋白的结合平衡. *中国科学 (B 辑)*, 2000, 30 (5): 560-565.
- 6 刘绍璞, 刘忠芳, 蒋治良等. $[CdL_4]^{2-}$ 罗丹明染料体系的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2001, 59.
- 7 蒋治良, 杨明媚. 银的光化学共振散射光谱分析. *贵金属*, 2000, 21 (3): 34-39.
- 8 刘绍璞, 刘忠芳. 碲 (IV) 碘化物-结晶紫体系的共振发光和二级散射光谱. *高等学校化学学报*, 1996, 17: 1213-1215.
- 9 蒋治良, 李 芳, 梁 宏. 磷钼杂多酸-罗丹明 S 体系的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2000, 58 (8): 1059-1062.
- 10 Liu S P, Zhou G M, Liu Z F. Resonance Rayleigh scattering for the determination of cation surfactants with Eosin Y. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, 363: 651-654.
- 11 蒋治良, 李 芳, 梁 宏. 金粒子粒径与共振散射光强度的关系. *高等学校化学学报*, 2000, 21(10): 1488-1492.
- 12 Jiang Zhiliang, Feng Zhongwei, Li Fang et al. Resonance scattering spectroscopic study of gold nanoparticle. *Science in China, Series B* 2001, 44 (2): 175-183.
- 13 蒋治良, 钟福新, 李 芳. 绿色银纳米粒子的共振散射光谱研究. *化学学报*, 2001, 59 (3): 438-453.
- 14 谢济运, 蒋治良. 溃疡病菌的共振散射光谱研究. *物理化学学报*, 2001, 20 (5): 552.
- 15 钟福新, 蒋治良, 梁 宏. 蓝色银纳米粒子的光化学合成及其共振散射光谱研究. *感光科学与光化学*, 2001, 21 (1): 17-23.
- 16 Jiang Zhiliang, Lin Xiaoming. Microwave synthesis of TiO_2 nanoparticles and its resonance scattering properties. *Chemical Journal on Internet*, 2001, 3 (4): 017ne.
- 17 蒋治良. 金纳米粒子的分频共振散射光谱研究. *光子学报*, 2001, 36 (3): 331-335.
- 18 蒋治良, 冯忠伟, 刘庆业等. 金纳米粒子的非线性共振散射及光强度函数研究. *无机化学学报*, 2001, 26 (3): 354-359.

(责任编辑: 蒋汉明)