

- [18] Parker L. L. et al., 1991, *EMBO J.*, 10: p 1255—1263.
- [19] Dunphy W. G. & Kumagai A., 1991, *Cell*, 67: p 189—196.
- [20] Sagata N. et al., 1989, *Nature*, 342: p 512—518.
- [21] Minshull J. et al., 1990, *EMBO J.*, 9: p 2865—2875.
- [22] Westerndorf J. M. et al., 1989, *J. Cell Bio.*, 108: p 1431—1444.
- [23] Nash R. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: p 4335—4346.
- [24] Hadwiger J. A. et al., 1989, *Pro. Natl. Aca. Sci. USA.*, 86: p 6255—6259.
- [25] Wittenberg C. et al., 1990, *Cell*, 62: p 225—237.
- [26] Cross F. R. et al., 1988, *Mol. Cell Bio.*, 8: p 4675—4684.
- [27] Herskowitz I., 1989, *Nature*, 342: p 749—757.
- [28] Nurse P., 1981, In *Fungal Nucleus*, K. Gull & S. Oliver, eds. p 331—345.
- [29] Pringle J. R. & Hartwell L. H., 1981, In the *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Life Cycle and Inheritance*. J. N. Southern, E. W. Jones and J. R. Broach, eds, p 97—142.
- [30] Chang F. & Herskowitz I., 1990, *Cell*, 63: p 999—1011.
- [31] Elion E. A. et al., 1990, *Cell*, 60: p 649—664.
- [32] Whiteway M. et al., 1989, *Cell*, 56: p 467—477.
- [33] Dolan J. W. et al., 1990, *Genes Dev.*, 4: p 492—502.
- [34] Dolan J. W. et al., 1989, *Pro. Natl. Aca. Sci. USA.*, 86: p 5703—5707.
- [35] Girard F. et al., 1991, *Cell*, 67: p 1169—1179.
- [36] Blow J. J. & Nurse P., 1990, *Cell*, 62: p 855—862.

## 流式计量核型分析和染色体分选

陈 汉 源

(第一军医大学细胞生物学实验室 广州, 510515)

在经典的静态细胞遗传学基础上, 目前兴起的流式计量细胞遗传学是一大进展<sup>[1,2]</sup>, 盛行的流式计量核型分析依据 DNA 含量、碱基组成和着丝粒指数(CI)等特性, 检测悬液中染色体组型。进而将悬液中不同类型染色体分选出来<sup>[3]</sup>, 既便于基因作图, 又可构建染色体专一的重组 DNA 库, 从而推进基因结构、表达和调节的研究。

### 一、染色体的分离

从中期细胞制备单个染色体悬液是流式计量细胞遗传学的首要条件, 主要步骤如下<sup>[4,5,6]</sup>:

1. 对数生长细胞。常用的单层培养细胞有成纤维细胞株和中国仓鼠-人融合细胞株, 还

有肿瘤细胞株。悬浮生长的有成淋巴细胞株。

2. 阻遏中期。适当的秋水仙胺或长春花碱处理, 可使培养细胞停顿于分裂中期。如处理过度会使染色体凝缩<sup>[6]</sup>。

3. 收集中期细胞。从贴壁生长单层细胞中摇落接触较少的分裂细胞, 其中中期细胞应达 90% 以上。悬浮的成淋巴细胞分裂指数约 30%, 经差速离心去除间期细胞, 富集中期细胞。

4. 低渗膨胀。75 mmol/L KCl 处理使细胞吸水膨胀, 染色体互相散开。

5. 稳定染色体。交链剂和嵌入剂能减少染色体断裂和粘连<sup>[1,6,7]</sup>。如己二醇、propidium iodide (PI)<sup>[8]</sup>、硫酸镁、多胺、柠檬酸钠和亚硫酸钠等稳定染色体原位核

酸<sup>[9,10,11]</sup>。曾用醋酸固定染色体<sup>[12]</sup>。

6. 撕破细胞。去垢剂 triton-X 100 和毛地黄皂甙减弱质膜结构。通过注射、涡流、匀浆或超声处理使细胞破裂, 释放染色体。机械力要适当, 足使小染色体散开, 勿将大染色体断裂<sup>[11]</sup>。

7. DNA 专一的荧光染色。氩离子激光发射 UV 360 nm 和蓝紫光 458—514 nm<sup>[5]</sup>, 选用的染料要适合激发光波长。

(1) 单染色常用溴乙锭或 PI, 当受 520—540 nm 激发后, 发射 600—620 nm 橙荧光<sup>[1,13]</sup>。虽对不同碱基组成 DNA 的染色无差别, 但可与 RNA 结合, 故在染色前要以 RNase 处理, 去除染色体中 RNA, 避免干扰。

(2) 双染色常用 Hoechst 33258(HO)和色霉素(CH)<sup>[1,13]</sup>, 这不与 RNA 结合, 可用于染色体 DNA 含量和碱基组成的双变数分析。HO 经 UV 360 nm 激发后, 发射 440—470 nm 蓝荧光, 这优先与富 A-T 的 DNA 区段结合, 4'-6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)有相似的染色效果。CH 经 430 nm 激发后, 发射 580 nm 黄荧光, 这优先与富 G-C 的 DNA 区段结合。光神霉素与此染色相近<sup>[14]</sup>。至于溴脱氧尿甙能抑制 HO 荧光, 而增强 CH 荧光<sup>[16]</sup>。纺锤霉素和偏端霉素虽无荧光, 但能和 HO 竞争富 A-T 的 DNA 区段<sup>[14]</sup>。

8. 保存。加入 NaN<sub>3</sub>(最终浓度 3 mmol/L)的染色体悬液可于 4℃保存到一周, 用前以机械分散染色体, 经 35 μm 钢网过滤, 去除染色体团块。

制备的染色体要求形态正常和结构完整, 不致过度伸长或缩短, 既无断裂, 又不粘连, 而且各类型染色体保持原来比例不变。通常最终得到的染色体总数约为最初估计的 1—10%<sup>[9]</sup>, 因此收集的中期细胞数要比预计的增多 10—100 倍, 才能满足实验所需。要尽量减少染色体悬液中的混杂物, 如经 75 g 离心 3 min 可除去其中间期核。由己二醇或 PI 分

离的染色体仍可显带, 其他分离液得到的则否。从多胺分离的染色体中抽提的 DNA 分子量较大, 推测硫酸镁激活细胞的内切酶, 而 EDTA 和 EGTA 等螯合剂使酶失活。

## 二、流式计量核型分析

应用流式细胞计量仪<sup>[16]</sup>, 将荧光染色的染色体悬液流经标本管注入鞘液中部, 两者在细管中快速流动, 由于流体力学作用, 标本液压缩成约 3 μm 直径细流, 使其中单个染色体沿其长轴逐一流过喷嘴, 并受激光束照射, 发生荧光(图 1)。

### 1. 单光束或单变数分析

经过单一染色的染色体逐个通过激光束后, 发出一种荧光, 投射到光电倍增管上, 所产生的电脉冲与荧光强度成正比。多个染色体的测量结果积累形成二维直方图<sup>[13,17]</sup>, 以直轴的染色体数目对横轴的荧光强度。含有同量 DNA 的同源染色体在一定位置形成高峰<sup>[1]</sup>, 峰位平均值与此型染色体 DNA 值成正比, 峰下面积代表此类染色体的相对频率, 峰底阔度暗示这类染色体的 DNA 均一性和仪器精密密度。峰间本底由染色体碎片和畸变染色体等混杂物所决定。由于各种染料对碱基专一性的差异, 经过不同染色的同源染色体的峰位稍有改变<sup>[1]</sup>。

### 2. 双光束或双变数分析

经过双重染色(HO-CH)的染色体逐个依次通过两个激光束, 分别为 360 nm 和 458 nm, 两者相距 0.008 吋, 时间相隔 15 μsec。由此发出蓝和橙两种荧光, 经过滤光片分开后, 分别投射到两个光电倍增管上(图 2), 记录染色体数目对两种荧光强度, 形成三维直方图<sup>[1,13]</sup>。峰位平均值代表此型染色体的 DNA 含量和/或碱基组成。峰体积与这类染色体频率成正比。通常以 95% 耐受椭圆显示人 24 类型正常染色染峰位平均值的变异范围(图 3)。

### 3. 流式计量核型检测

流式细胞计量仪能测出 10<sup>-15</sup>g DNA, 约

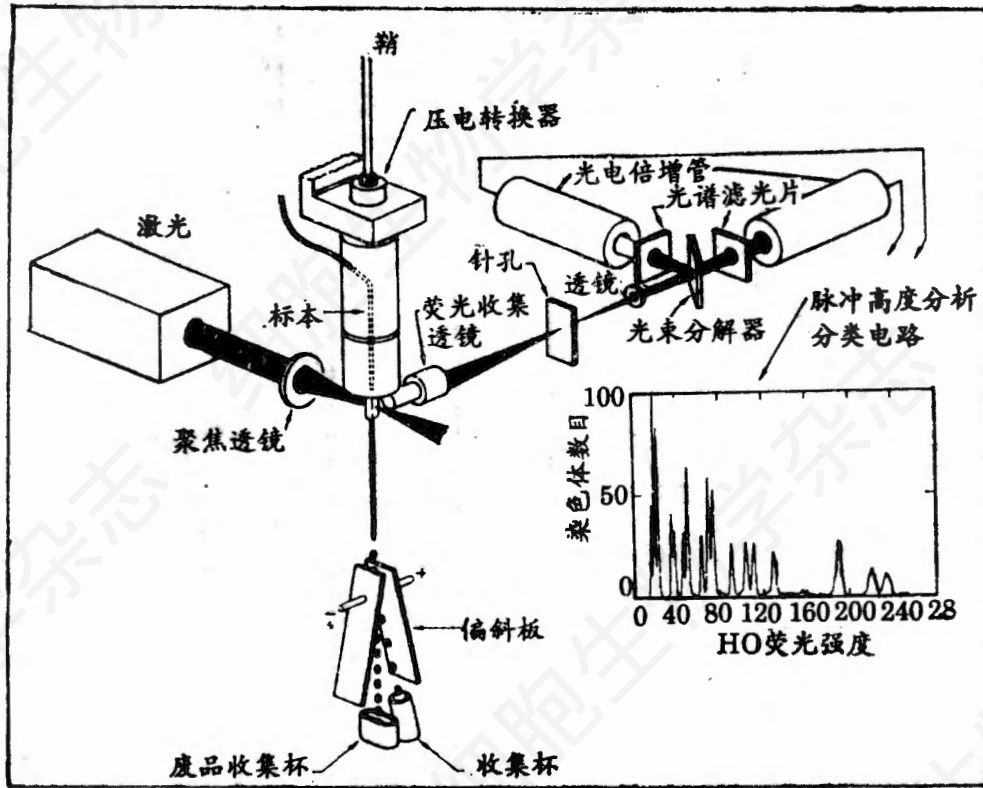


图 1 单光束流式染色体分选仪略图<sup>[1]</sup>

右侧插图为 HO 染色的中国仓鼠染色体荧光强度直方图

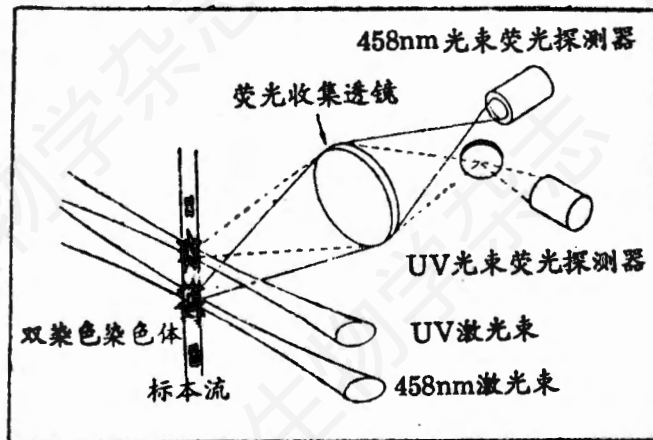


图 2 双光束流式染色体分选仪光学部分略图<sup>[1]</sup>

含  $10^6$ bp, 相当于单个 G 带, 即为 1/2000 基因组。但人染色体 1、9、15、16 和 Y 的着丝粒异染色质和 13—15 与 21—22 的垂休大小变化较大<sup>[18]</sup>。染色体多态性导致峰位漂移。由于

多态性是遗传的, 当将受检的核型图谱与其亲代的比较, 就可避免干扰。通常单变数分析中峰位平均值的变异系数  $CV = 1\% - 2\%$ , 足以辨别达到 10% DNA 含量变化的畸变染色

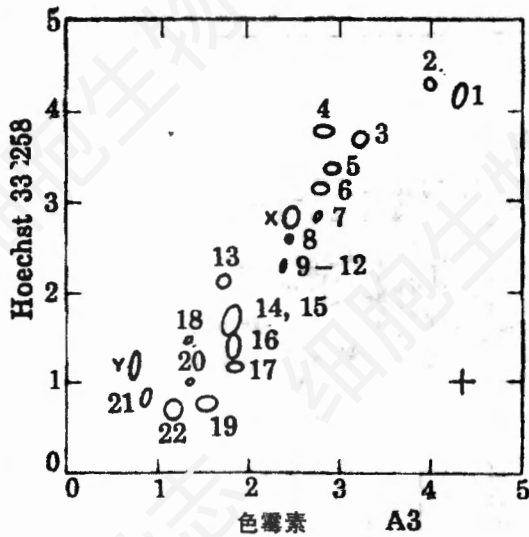


图3 人正常染色体峰位总变异的统计总结<sup>[1]</sup>

椭圆显示人24型染色体的95%耐受区域，切面代表重复或缺失一个带的染色体峰位的预期变化。

体<sup>[19]</sup>。其中染色体重复和插入所产生的新峰位移向原点远方，缺失的新峰位移向原点近方，互相易位产生两个不同的新峰位，倒位并不影响峰位。染色体数目畸变则峰面积改变，如三体的峰面积增加1/2，单体则减少1/2，其余类推。

#### 4. 狭缝扫描分析

经过染色的染色体沿其长轴通过细小(1.3 μm)激光束，或将染色体的荧光成象在狭缝上。沿其长轴扫描得到荧光强度曲线，呈现出染色体轮廓、着丝粒位置和染色粒排列等特征(图4)<sup>[2]</sup>。这曲线的总面积与染色体DNA值成正比，曲线最低点为着丝粒位置，长臂面积/总面积为着丝粒指数<sup>[1,20]</sup>，由此认辨染色体结构畸变<sup>[21]</sup>。应用DNA总量对CI的双变数分析，能提高人染色体1—4的分辨率<sup>[13,22]</sup>。

### 三、染色体分选

从流式细胞计量仪发展成染色体分选仪。自喷嘴射出的染色体悬液形成70 μm直径导电细流，进入空气中。依靠压电晶体的振动力作

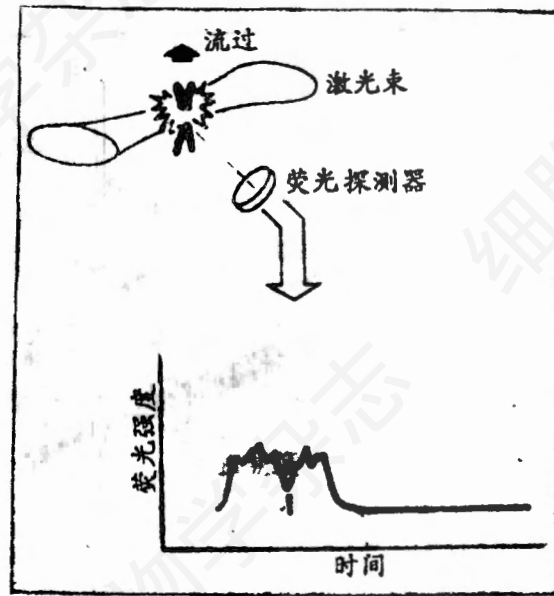


图4 流式计量细胞仪的狭缝扫描部分略图<sup>[1]</sup>

人染色体1经过狭缝扫描的荧光强度曲线，直棒显示着丝粒位置。

用使之断裂为微滴。后者形成速度比单个染色体的流速大20倍，致使每一微滴至多只含一个染色体<sup>[1]</sup>。凡符合设定参数的染色体微滴带正电或负电，在经过高压电场时，向左或右偏斜，承接于离心管或滤膜，以供生化分析或观察。其余空白的或含非所需染色体的不带电微滴垂直降落，没有偏斜，由中部的负压管吸去。应用双变数分选法，人染色体13、18—22和Y容易单独分出，比较不易选出的有1—8和X，目前尚未能分选的为9—22。这些可用适当的中国仓鼠-人融合细胞株来完成，后者只含所需的少数人染色体<sup>[11]</sup>。染色体分选纯度取决于三：(1)两型相邻染色体峰位的分离程度，这取决于两者的DNA含量或碱基组成的差异。(2)悬液中含DNA的混杂物的多寡。(3)分选窗的位置和光学仪器因素。通常分选纯度可达90%以上。

### 四、基因作图

将标记的基因DNA探针与选出的单型染色体DNA滤膜杂交，查明基因定位的染色体

类型。复将探针与易位、缺失或插入等畸变染色体 DNA 杂交,其畸变片段位置为已知,显示基因定位于亚染色体区段<sup>[1,19]</sup>。

### 1. Southern 印迹法

从  $3 \times 10^5$  平均大小的单型染色体能抽提到 30—150 ng DNA<sup>[23]</sup>,经核酸酶消化和凝胶电泳分离后,将 DNA 片段转移到滤膜上,经变性和中和后与标记基因 DNA 探针杂交,结果显示存在基因的 DNA 片段。如铁蛋白轻链基因探针能与 5 个 DNA 片段杂交,各位于人染色体 X、19 和 20 内<sup>[10]</sup>。

### 2. 斑点杂交法

将  $3 \times 10^4$  单型染色体承接于滤膜上,内含 3—15 ng DNA,与标记 DNA 探针后,显示基因的染色体定位<sup>[23,24]</sup>。例如丁醛醇酶-A、B 和 C 基因分别定位于人染色体 16、9 和 17 内<sup>[10]</sup>。应用 t(1:17)和 t(4:11)易位染色体滤膜斑点,分别将 c-src-2 和骨骼糖原磷酸化酶基因定位于 17 pter 和 11 q 13-qter<sup>[23,25]</sup>。以 Yp 专一顺序探针检测到 X-X 男人的一畸变 X',由于经过 X-Y 互换,含有 Y 顺序<sup>[26]</sup>。

### 3. 狭槽印迹杂交法

将  $5 \times 10^8$  单型染色体的 DNA 经变性和中和后,加入狭槽中,并印迹到滤膜上,和标记探针杂交,结果表明从人重复顺序 DNA 库分离的两个克隆, pHuR 48 定位于人染色体 9 qh, pHuR 195 定位于 16 qh (h 为异染色质区)<sup>[27]</sup>。

## 五、构建染色体专一的重组 DNA 库

从单型染色体构建 DNA 库要比全基因组 DNA 库更为优越。在研究目的上, DNA 库可分两类<sup>[10]</sup>:(1)由 DNA 库分离探针,用以基因作图或测定限制性片段长度多态性,这只需长 1—4 kb 插入体。(2)由 DNA 库分离完整基因顺序和侧向顺序,这需长 20—40 kb 插入体。现将美国国家实验室的染色体专一的重组 DNA 库研究方案,简述如下<sup>[29]</sup>。

### 1. 第一期基因库研究计划

自 1982—1983 年开始构建人 24 类型染色

体,全消化,短插入(2—3 kb)的 DNA 库,现已全部完成。应用普通双变数分选仪得到  $(0.5—1.0) \times 10^6$  单型染色体,大约要经过 50 h,能抽提 0.5—1.0  $\mu$ g DNA,高速分选仪的效率提高十倍。经过 Hind III 或 EcoR I 完全消化后,得到 2—3 kb 片段,将此连接到噬菌体 Charon 21 的相当位置内,经过外壳蛋白包裹后,于大肠杆菌 *E. Coli* LE 392 中大量繁殖,得到  $10^{11}$  重组体 DNA 库。

### 2. 第二期基因库研究计划

现从单型染色体抽提 1  $\mu$ g DNA,经内切酶部分消化后,构建重组 DNA 库。初期拟将 10—25 kb 片段插入噬菌体 Charon 40 或 GEM 11。后期拟以 34—46 kb 片段插入装配型质粒 Lawrist 5 或 scos 1,现已建成染色体 19 和 Y 的重组 DNA 库。

### 3. 重组 DNA 库的特性

第一期建成的 DNA 库包含  $10^4—10^8$  独立的重组体,平均由单一染色体产生 5 个重组体,非重组体的出现频率为 1—34%<sup>[28]</sup>。如果染色体来源于中国仓鼠-人融合细胞株,所建成的 DNA 库内混杂物质主要来自仓鼠染色体<sup>[29]</sup>。

(1)流式计量核型分析表明,人染色体分选纯度达 70—95%<sup>[30]</sup>。(2)荧光标记的仓鼠或人全基因组 DNA 探针与分选的染色体原位杂交显示,仓鼠染色体混杂达 3—38%<sup>[24]</sup>。(3)噬斑杂交表明,仓鼠染色体混杂达 5—60%<sup>[24]</sup>。(4)以 DNA 库内单一顺序克隆为探针进行基因作图,检测到库内其他染色体的混杂约占 22%。

## 摘 要

流式计量细胞遗传学包括流式计量核型分析和染色体分选。前者根据 DNA 含量、碱基组成和着丝粒指数等特性分析悬液中染色体组型,检测染色体结构和数目的畸变。后者是在前者基础上,将各种类型的染色体分选出来。染色体分选纯度取决于染色体峰位分离程度,混杂物的多寡和分选窗位置。分选出的单型染

色体用于基因作图或构建染色体专一的重组DNA库,便于研究基因结构和功能。

### 参 考 文 献

- [1] Gray, J. W. and R. G. Langlois, 1986, *Ann. Rev. Biophys. Biophysical Chem* 15: 195—235.
- [2] Cram, L. S. et al., 1988, *Cytometry*, suppl. 3: 94—100.
- [3] Lebo, R. V. et al., 1987, *Cytometry*, 8: 71—82.
- [4] Van den Engh, G. et al., 1984, *Cytometry*, 5: 108—117.
- [5] Young, B. D., Chromosome analysis and sorting. in Ormerod, N. G., ed. *Flow cytometry, a practical approach*. 1990: 145—149.
- [6] Bartholdi, M., Chromosome sorting by flow cytometry. in Colowik, S. P. and N. O. Kaplan, ed. *Method in enzymology*. 1987; 151: 252—267.
- [7] Deaven, L. L. et al., 1986, *Symp. Quant Biol.*, 51: part 1, 159—168.
- [8] Bartholdi, M. F. et al., 1984, *Cytometry*, 5: 534—538.
- [9] Van den Engh, G. et al., 1988, *Cytometry*, 9: 266—270.
- [10] Darzynkiewicz, Z. and J. Kapuscinski, 1988, *Cytometry*, 9: 7—18.
- [11] Deaven, L. L. et al., 1986, *Symp. Quant. Biol.*, 51: 159—167.
- [12] Stoehr, M. et al., 1982, *Histochemistry*. 74: 57—61.
- [13] Gray, J. W. et al., 1986, *Symp. Quant. Biol.*, 51: part 1, 141—149.
- [14] Babinovitch, P. S. et al., 1988, *Exper. Cell Res.*, 174: 309—318.
- [15] Europ, J., 1991, *J. Immunol.*, 21: 2153—2160.
- [16] Friedlander M., Flow cytometric analysis in quantitative pathology. in Baak, J. P. A., ed. *Manual of Quantitative pathology*. 1991; 244—267.
- [17] Shay, J. W. and L. S. Cram, Cell fusion and chromosome sorting. *Flow cytometry and sorting*. 1990; 165—179.
- [18] Ferguson-Smith, M. A., 1988, *Phil. Trans. R. Soc. Land. B*, 319: 239—248.
- [19] Lebo, R. V. et al., 1986, *Symp. Quant. Biol.*, part 1, 51: 169—176.
- [20] Bartholdi, M. F. et al., 1990, *Cytometry*, 11: 165—172.
- [21] Lucase, J. N. et al., 1991, *Cytometry*, 12: 316—322.
- [22] Boschman, G. A. et al., 1990, *Human Genet.*, 85: 41—48.
- [23] Lebo, R. V. and B. D. Bruce, Gene mapping with sorted chromosome. in Colowik, S. P. and N. O. Kaplan, ed. *Method in enzymology*. 1987, 151: 292—313.
- [24] Keller, G. H. and M. M. Manak, DNA probes; Radioactive labeling procedures. Non-radioactive labeling procedures. 1989; 76—82, 107—112.
- [25] Lebo, R. V. et al., 1984, *Science*, 225: 57—59.
- [26] Carter, N. P. et al., 1990, *Cytometry*, 11: 202—207.
- [27] Moyzis, R. K. et al., 1987, *Chromosoma*, 95: 375—386.
- [28] Fuscoe, J. C. 1987, *Gene*, 52: 291—296.
- [29] Van Dilla, M. A. and L. L. Deaven, 1990, *Cytometry*, 11: 208—218.
- [30] Fuscoe, J. C. et al., 1989, *Cytogenet. Cell Genet.*, 50: 211—215.

### 在沪常务理事会议纪要

1993年1月15日下午我会在中科院上海细胞所召开了在沪常务理事会议。出席会议的有王亚辉、左嘉客、徐永华、周郑、庄孝德、姚鑫、罗登应出席了会议。会议作出以下决定：1. 同意庄孝德先生、曾弥白先生分别辞去《实验生物学报》、《细胞生物学杂志》主编职务，由王亚辉、左嘉客分别接任。2. 为适应市场经济的需要，发挥科技在生产中的作用，通过了《中国细胞生物学学会团体会员条例(草案)》，吸收有关企业单位和团体为团体会员，享受索取资料、宣传展览、参与举办活动、接受技术咨询和成果转让等多种权利。有意向的单位或愿意牵线联系的同志请来信至上海岳阳路320号中国细胞生物学学会秘书处(邮编200031)。3. 推荐第二届我会青年论文奖二等奖获得者4位同志中现在国内的3位作为参加1994年第四届中国科协青年科技奖评选的候选人。4. 海峡两岸细胞生物学会会议因条件尚不成熟，暂缓筹备，待条件成熟后再议。5. 我会将向澳大利亚方面索取1994年在悉尼举行的APOCB第二届大会的第一轮通知，分发给地方学会及个人索要者。第二轮通知则由有意参加会议者直接与APOCB第二届大会联系。

(中国细胞生物学学会秘书处)