

已取得重大进展。抗药基因的分离成功及其产物P-膜糖蛋白之阐明,在抗药基因的结构与功能研究方面已进入了一个新阶段,且引向临床应用之探索。本文仅就抗药细胞之选择、遗传学特征、抗药基因的顺序分析及P-膜糖蛋白的结构以及基因的扩增、表达与转移等诸方面作了概述。对抗药基因研究之临床应用可行性亦作了探讨。

参 考 文 献

- [1] Schimke R. T. et al., 1978, *Science* 202 : 1051—1055.
- [2] Beck W. T., 1979, *Cancer Res.*, 39 : 2070—2076.
- [3] Akiyama S. I. et al., 1985, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 11 : 117—126.
- [4] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261 : 7762—7770.
- [5] Shelagh E. L. et al., 1987, *Cancer Res.*, 47 : 2594—2598.
- [6] Roninson I. B. et al., 1985, *Nature* 309 : 626—628.
- [7] Roninson I. B. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 4538—4542.
- [8] Gros P. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 337—341.
- [9] Gros P. et al., 1986, *Nature* 323 : 728—731.
- [10] Ueda K. et al., 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 : 956—962.
- [11] Ling V., 1985, In: *Molecular Cell Genetics*, ed. by Gottesman M. New York. John Wiley. P. 773—787.
- [12] Chen C. J. et al., 1986, *Cell* 47 : 381—389.
- [13] van der Blick A. M. et al., 1986, *Mol. Cell Biol.*, 6 : 1671—1678.
- [14] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *Science* 232 : 643—645.
- [15] Scott K. W. et al., 1986, *Science* 232 : 751—755.
- [16] Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1986, *Mol. Cell Biol.*, 6 : 4039—4044.
- [17] Ueda K. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 3004—3008.
- [18] Kaufman R. T. et al., 1981, *Mol. Cell Biol.* 1 : 1084—1093.
- [19] Wahl G. M. et al., 1983, *Mol. Cell Biol.*, 3 : 2066—2075.
- [20] Lau Y. F. et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4 : 1469—1475.
- [21] Fojo A. T. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 7661—7665.
- [22] Roninson I., 1983, *Nucleic Acids Res.*, 11 : 5413—5431.
- [23] Kartner N. et al., 1985, *Nature* 316 : 820—823.
- [24] Riordan J. R. et al., 1985, *Nature* 316 : 817—819.
- [25] Gros P. et al., 1986, *Cell* 47 : 371—380.
- [26] Gerlach J. H. et al., 1986, *Nature* 324 : 485—489.
- [27] Fojo A. T. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 265—269.
- [28] Fojo A. T. & Shen D. W. (沈鼎武) et al., 1987, *J. Clinical Oncol.* 5 : 1922—1927.
- [29] Cornwell M. M. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262 : 2166—2170.
- [30] Pastan I. & Gottesman M. M. 1987, *New Engl. J. Medicine*, 316 : 1388—1393.

人类特定染色体 DNA 文库的建立和利用

M. A. Van Dilla, L. L. Deaven 等

DNA 文库的建立及其应用于基因定位的可能性首先在基因组较小的生物(如果蝇)中得到证实。由于近年来原位噬菌斑和克隆杂交,改进的 λ 克隆载体以

及体外包装系统的发展,对于具有较复杂的基因组的生物(包括哺乳动物)也进行了基因文库的建立和筛选工作。已经建立了人类胚胎 DNA 片段的文库,并分

离出含人类 δ 和 β 珠蛋白基因的克隆。总之, 这些发展无疑为人类基因组的定位以及基因结构和表达的研究提供了一种新的方法。

被克隆的特定染色体 DNA 顺序的文库代表全部基因组信息的结构亚单位, 比整个基因组定位具有显著的优点。复杂基因组中富集某一特定部分的文库的建立, 在七十年代末至八十年代初已有报道。这些文库虽然有用, 但受到种间顺序的同源性和哺乳动物 DNA 重组动力学的限制。一种更直接的方法是用经流式分选纯化的染色体来建立特定染色体序列文库, 其可行性已在用流式细胞分选术收集的人和啮齿类动物特定染色体 DNA 文库的建立中被证实。

美国 Los Alamos 和 Lawrence Livermore 两个国家实验室关于人类特定染色体的 DNA 文库的构建工作分为两个阶段进行: 第一阶段建立较小插入片段 (平均 4 kb 大小) 的文库, 第二阶段建立较大插入片段 (约 20—40 kb) 的文库。本文报道的第一阶段工作的大致步骤如图 1。

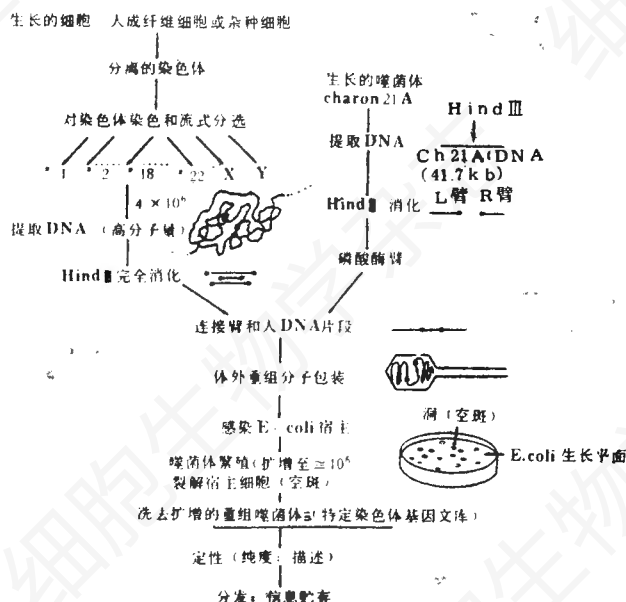


图 1 用噬菌载体 Charon 21 A 的 Hind III 位点和流式分选的人 18 号染色体所构建的人特定染色体基因文库的大致步骤

这种方法用于构建了国家实验室基因文库规划中的人类所特定染色体的基因文库 Live move 利用 Charon 21 A 的 Hind III 克隆位点, Los Alamos 用 Charon 21 A 的 E. coRI 克隆位点。

一、流式细胞术和分选术

1. 基本原理 本计划中的一个关键步骤是用流式细胞术以极高的准确性鉴别出人的 24 种染色体, 从而用流式分选使之纯化, 以极高的纯度获得各种类型染色体。染色体分类和纯化技术在近 5—10 年间得到很大的进展, 综述较多, 不再赘述。双光束流式分选的原理可见图 2。从相应细胞系有丝分裂细胞中释放

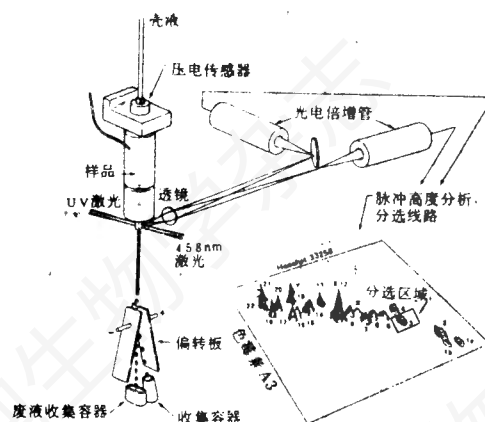


图 2 双激光流式分选的基本原理图

用高压将壳液压入流动室, 用电动机驱动的 1 ml 注射器将样品 (荧光染色的染色体悬液) 注入到流动室中壳液的中轴线上。流动室的底部是一个横截面为正方形的石英毛细管, 它的末端是由手表钻石制成的直径为 75—80 μm 的圆形出口。染色体悬液在壳液的轴心形成一个直径为 5—10 μm 的小柱, 被壳液携带着高速通过出口并在空气中形成一股喷流。经过与高频振荡器相连的压电换能器的作用, 喷流成为均匀的液滴。来自两个激光光源的紫外束和波长为 458 nm 的光束分别激发 Hoechst 33258 和色素素 A₃ 的荧光, 两个光束均聚焦在正方形石英毛细管上, 光信号转变成放大的电信号, 并被传送到脉冲高度分析仪和分选系统。如果要分选每一种染色体 (如 3 号), 它的两个荧光信号就落到预先设定的分选窗内, 在含 3 号染色体的喷流刚刚变成液滴时, 充电电路被打开, 放出一个短暂的电压脉冲, 使含 3 号染色体的液滴充电。由于计时所出现的微小误差, 实际上对三滴同时充电, 充电后充电线路立即关闭, 直到下一个含 3 号染色体的液滴通过时才重新打开。带电的液滴接着通过一个高压电源相联的偏转板, 由于液滴带电而发生偏移进入收集容器中, 而其它液滴 (大多数不含染色体或含不需分选的染色体) 不发生偏移进入废液容器中。现在已能对同一输入样品同时分选出两种类型的染色体。

的染色体放在缓冲液中以保持其稳定性,把这种染色体悬液输入流式系统。用双参数(双激光)分选时,用两种与DNA结合的荧光染料染色。当每个染色体通过激光束时,每个染色体就产生两种荧光信号。图2所示为被染色的染色体通过流式分选计和完成物理分选的全过程,分选后常以几毫升收集于容器,并冷冻以备克隆。

2. 流式核型(Flow karyotyping): 流式细胞术的数据通常显示为频率分布(即直方图),它代表以一或二种荧光强度值为函数来检测的事件的数目,而取决于染色体是否被一或二种荧光染料染色。这种显示就叫流式核型,它和熟悉的细胞遗传学的核型类似,是通过不同的染色方法对被鉴定的所有的单个中期染色体进行的一种有规则的显示。

对于某些类型的染色体,单参数流式核型(即用一种DNA特异性的染料如PI或Hoechst 33258染色)显示出适合于分选的分离峰。这是很有用的,因为单参数分析而设计的单光束流式分选计比为双参数分析而设计的双光束流式分选计更简单和易于操作。Los Alamos小组发现某些来源于仓鼠和人杂交细胞的人染色体可用单光束流式分选计来分选。对某些细胞系,某些大的人染色体(1—8号)也可用此法分选。

然而,双参数流式核型分析具有其固有的优点。

由于两种染料对DNA的不同碱基组成具有不同的结合优势,使许多种染色体能被更好地区分开来,因而分选纯度提高。如Hoechst 33258易于和AT丰富的DNA结合,而色霉素A₃易于和GC丰富的DNA结合,分离后的染色体同时用Hoechst 33258和色霉素A₃染色并在双光束流式细胞计上测量两者的荧光。图3表示人染色体的双参数流式核型。利用此法,许多类型的人染色体可得到适合于分选的完全分开的峰,尤其是较小的染色体。但是,有些峰(如9—12号及更大的染色体)却存在部分或完全重叠。对于这种情况就必须选择仓鼠和人的杂种细胞系。由于在杂种细胞中,人的大多数染色体丢失,所需要的染色体就可以从仓鼠染色体和剩下的人染色体中区分开来。例如亲本为修复缺陷的中国仓鼠卵巢细胞突变株(UV 20)和正常的人淋巴细胞的杂交系UV 20 HL 21—27仅保留了三条人染色体:4号,8号,21号(这由同功酶和细胞遗传学分析可以证实)。流式核型表明4号和8号均可很好地与仓鼠本底分开,因而可以分选出来。但21号峰和仓鼠本底有重叠,不能分选。它可由人的成纤维细胞中选出。实验表明,大的染色体一般可由杂种细胞分选,小的则可从人成纤维细胞中选出。但是,许多杂种核型不稳定,不同的杂种系核型变化很大,在染色体分离前的大量细胞培养过程中必然存在所需要的染色体的丢失或重排。

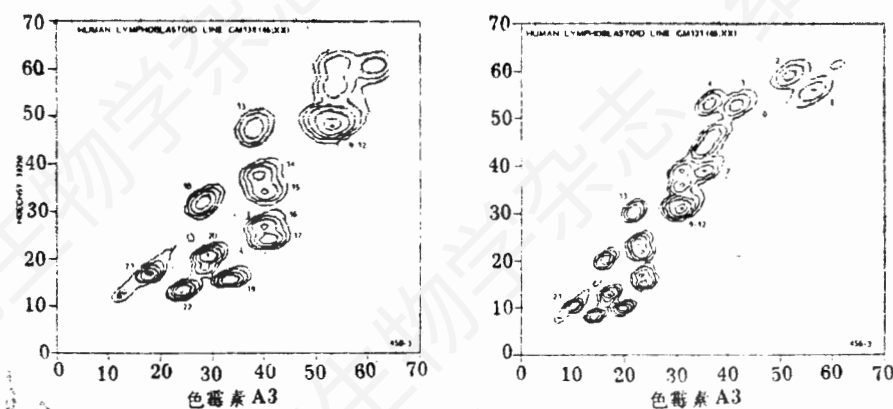


图3 人淋巴瘤细胞系 GM 131 (46; xx) 的流式核型

左图为高增益显示 9—22 号染色体峰。

右图为低增益显示所有染色体峰。

注意除了 14—15 号和 16—17 号重叠外,所有较小的染色体(13—22 号)都能很好的分辨出来。因此,所有这些小的染色体都从人细胞系中分选,由于几乎所有的人细胞系的 9—12 号染色体都重叠很厉害,只好用人仓鼠杂种细胞系做为这些染色体的来源。一般来说,1—2 号染色体在人仓鼠杂种细胞系中分辨率更好,因此也作为这些染色体的来源。

二、细胞培养、染色体分离和染色

1. 细胞系选择 采用的细胞系分别属于下面三种细胞类型: 人二倍体成纤维细胞、人淋巴瘤细胞和中国仓鼠与人的杂种细胞。

2. 细胞大量培养 一般用以下两种方法:

单层培养: 人二倍体成纤维细胞用含 10% 胎牛血清(FCS)的 MEM- α 培养液培养于 T 150 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱。传代时, 用 Puck's EDTA 和 0.025% 胰酶消化分散细胞。将细胞一传三代传两代(此时细胞正处于指数生长期, 有丝分裂细胞最多), 当细胞有 60% 汇合时加入秋水仙酰胺以阻断细胞在有丝分裂期。秋水仙酰胺的处理时间取决于细胞类型和生长速度, 以既能获得较多的有丝分裂细胞而又不因长时间的阻断产生过度的细胞毒性为原则, 如成纤维细胞用振荡法收集, 产率可达 50—90%, 每瓶能得 1×10^6 — 2×10^6 个。大规模的染色体分选需要大约 10^8 个有丝分裂细胞, 即需要 100 个 T 150 瓶左右培养的细胞。

悬浮培养: 中国仓鼠与人的杂种细胞用含 10% 胎牛血清(FCS)的 MEM- α 培养液培养于密闭搅拌瓶内。淋巴瘤细胞用含 10—20% FCS 的 MEM- α 或 RPMI 1640 培养于密闭的 T 150 培养瓶或玻璃瓶中。指数生长期的细胞用秋水仙酰胺处理 4 小时(杂种细胞)至 12 小时(淋巴瘤细胞), 所得到的有丝分裂细胞指数为 10—60%。密度达到 5×10^5 /ml 时指数为 30—35%, 即 1000 毫升培养物就可获得 10^8 个有丝分裂细胞。

3. 染色体的大量分离 有下面三种方法:

① 利用乙二醇甘油缓冲液稳定染色体。此法显著优点是在分选后染色体可用分带法进行细胞遗传学鉴定, 因此可直接用分选样品作纯度检验。但此法产生的样品碎片较多, 且有些样品染色体 DNA 被降解。

② 利用 MgSO₄ 稳定染色体。把来自约 1000 毫升细胞培养物的有丝分裂细胞分成 20 份, 每份约含 5×10^6 个细胞。将每份样品各自悬浮于 1 ml pH 8.0 的低渗缓冲液(50 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES, 10 mmol/L MgSO₄, 3 mmol/L 二硫苏糖醇)中, 室温下孵育 10 分钟, 加入非离子去污剂 Triton X-100 至终浓度为 0.25%, 再孵育 10 分钟(低渗及去污剂处理的目的是使细胞易受机械破裂)。然后用 22 号针头抽打 1—3 次使细胞破裂释放出染色体, 每次抽打后在显微镜下观察染色体形态及分散程度, 抽打至单个分散的染色体数量最多, 而染色体过度伸展及因剪切力而造成的断裂最少为止。

③ 利用多胺稳定染色体。 5×10^6 — 7×10^6 个有丝

分裂细胞中加入 5 ml 40 mmol/L KCl 低渗液 4℃ 下处理 25 分钟, 再离心(1000 r/min, 5 min), 除去低渗液。将细胞重新悬浮在 1 ml 冷的染色体分离液(15 mmol/L Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 14 mmol/L β -巯基乙醇, 0.2 mmol/L 精胺, 0.5 mmol/L 亚精胺 0.1% 毛地黄皂苷 pH 7.2)中, 用力振荡 1 分钟后置于冰浴中 10 分钟。此时可取几微升样品用等量的碘化丙啶(PI)(浓度为 50 μ g/ml)染色, 在显微镜下观察, 悬液中应包含大量分散的染色体, 很少染色体成团或过度伸展。这一技术的关键在于低渗处理时间、低渗液类型以及振荡时间, 应根据不同的细胞类型来改变这些参数以得到最佳结果。

后两种方法在建立完全消化文库(译者注: 即较小插入片段的文库)时都很有效, 都能适用于多种细胞系; 得到的染色体样品纯度都较高; 都可用多种荧光染料对染色体染色; 染色体水解出的 DNA 大小都适合于较小片段的文库的建立; 染色体在 4℃ 下保存几个月形态都很稳定。这两种方法的主要缺点是分离后的染色体不易于用分带法进行细胞遗传分析。

4. 染色体的染色 MgSO₄ 法分离的染色体用 Hoechst 33258(终浓度为 3.7 μ mol/L)和色霉素 A₃(终浓度为 17 μ mol/L)可以在分选前几天染色。测量前 10—15 分钟加入柠檬酸钠(终浓度为 10 mmol/L)以提高流式分选的分辨率。

多胺法分离的染色体也用 Hoechst 33258(终浓度为 2.4 μ mol/L)和色霉素 A₃(终浓度为 62.5 μ mol/L)染色。色霉素 A₃ 贮液(0.5 mg/ml)用 MCl(uane's 缓冲液 CpH 7)和等量的 5 mmol/L MgCl₂ 溶液的混合液配制, 而 Hoechst 33258 贮液(浓度为 0.5 mg/ml)则用蒸馏水配制。用色霉素 A₃ 染色至少要在分选前 3 小时, 而染 Hoechst 33258 则在分选前临时染色就可获得最佳流式核型。

5. 峰同一性的鉴定 有几种方法可用来确定每一个流式核型上峰的染色体来源。这对于杂种细胞尤为重要, 因为其核型可能不稳定, 可能含有仓鼠染色体或人和仓鼠染色体之间的易位, 从而在大小和 DNA 碱基组成上与人染色体混淆。下面是我们所采用的六种方法。

(1) 用 G 带、Q 带、G-11 染色或 DAPI-Netropsin 染色对来自大量培养的中期细胞进行核型分析, 可以验证群体中是否存在所需要的染色体。

(2) 比较流式核型峰的位置和有关染色体的预期

位置,两者相差10%以上的染色体是值得怀疑的,因为在人类染色体由于正常的多形性(译者注:即某些染色体个体之间的染色差异性)引起的大于10%的变化是很少见的。人染色体的预期位置是通过流式核型上其它人染色体峰和仓鼠标记染色体相比较计算出来的,因为仓鼠标记染色体与正常人的染色体的位置关系是已知的。一个来源于人的峰也可根据这个峰是否出现在用作杂交的仓鼠亲本细胞系的流式核型上来验证。

(3)通过人和仓鼠的基因组DNA分别与来自杂种细胞的染色体进行杂交,可验证分选的染色体是否来源于人。分选出来的染色体DNA结合于硝酸纤维素滤膜上,用 ^{32}P 标记的DNA探针与之杂交,或直接固定于载片上,用荧光标记的DNA探针与之杂交。

(4)将所得的DNA克隆作基因图可判断该克隆是否来自重组的DNA文库。但该方法耗时且只涉及有关染色体DNA顺序的很小一部分,因之对有些染色体的重排不敏感。

(5)在杂交细胞中,运用同功酶分析可以证明人染色体的存在。

(6)用分带法也可判断染色体峰是否同一。但用

硫酸镁法和多胺法分离的染色体很难分带,所以这种方法虽有效但不常用。

在实际应用时,常需要同时用几种方法才能准确地判断。例如对人仓鼠杂交系UV 20 HL15-33来说,同功酶分析表明存在9号染色体且无其它相似大小的染色体,而流式核型在预期的9号峰位置上却出现两个峰;用分带法证明这种杂交细胞系存在正常的和非正常的9号染色体;将50000个所分选出的染色体DNA与标记的人和仓鼠DNA进行分子杂交,又表明分选出的染色体大多数来源于仓鼠。所以9号染色体的双峰组成极为复杂,不适宜克隆。

三、分选

流式分选所需要的是,通过流式细胞计筛选能产生良好的流式核型的经染色的染色体样品。使用的仪器是一种特殊设计的高速的双激光流式分选计,其速度比一般流式分选计要快20倍。为了使克隆实验有足够的DNA,所选出的每种染色体至少要有 4×10^6 条。在高速分选计上成纤维细胞染色体只需要半天即可达到这一要求,而在一般分选计上需要9个工作日。(待续)

植物细胞的大量培养技术*

森 木 悌次郎

近年来,用植物细胞培养来生产有用次生代谢产物的研究十分活跃。但是,多数处于实验室规模的阶段,工业生产规模的只有两例,即最近作者等(三井石油化学)用 0.75 m^3 培养罐培养紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)细胞和日东电工的用 2 m^3 培养罐培养高丽参细胞。此外,从目前几乎没有报道有关以次生代谢产物为目的的大量培养技术的详细研究内容来看,可以认为正式的大量培养技术尚未能确立。

本文系作者等将已进行的紫草细胞培养生产紫草宁为例,以迄今为止的大量培养技术开发中所讨论的几个基本项目为中心,予以叙述,以供今后建立大量培养技术的研究作为参考。

1. 培养基

大量培养是在液体培养基中将植物细胞进行悬浮培养。植物细胞来源于从固体培养基上从植物外植体

发生的愈伤组织细胞。这里必须注意的是用于固体培养的培养基大多不适于液体培养。紫草细胞的固体培养与液体培养可作为其中的一例。用已知培养基进行培养的情况见图1、图2^[1]。

可以看出,所有用于固体培养的培养基,均能生成次生代谢产物紫草宁,而在液体培养中能生成紫草宁的仅有White培养基。因为在固体培养和液体培养中细胞处于完全不同的环境,所以建立大量培养技术的第一步,须开发在液体培养中生产次生代谢产物效率最佳的培养基。

如作者等在紫草宁生产一文中(见细胞生物学杂志 Vol 9 No 1 p. 22-24)所说明,详细总结了White

* 本文译自山田康之编著 植物细胞培养マニュアル, 134-140页, 講談社サイエンスライフイック1984)