

BEL-7404 系细胞与 HeLa 细胞的中等纤维蛋白之分布和构型进行了比较观察, 并藉 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了这两类细胞的中等纤维提取物的多肽组成。结果指出, 源自同一实验室保种的人肝癌细胞与 HeLa 细胞, 两者无论在荧光抗体染色式样乃至多肽组成上均存在着显著的差异, 其中最明显的区别是 HeLa 细胞具有较为发达的桥粒——张力纤维复合物和分子量为 40 kDa 的角蛋白多肽; 而在人肝癌细胞中则为乏如。

近已证明, 细胞内源性抗药程度显示出组织、器官之特异性。Fojo 等^[15]曾应用人抗药基因片段作探针, 分析了大量的人肿瘤与正常组织, 发现除肾上腺、肾等一些材料外, 肝、肝癌细胞呈现高水平的抗药基因表达, 而其他的一些正常组织或肿瘤组织则表达很低或不表达。根据作者等^[16]进行的初步分析结果指出, 人肝癌 BEL-7402 系细胞对秋水仙素的耐受程度比 KB 3-1(HeLa 细胞之亚系)为高。这亦提示人肝癌细胞 BEL-7402 仍保留了肝癌的内源抗药性, 也为区别于 HeLa 的参数之一。

综上所述, 就上列癌基因、肝癌单抗、中等纤维构型乃至抗药性等方面之证据而言, 本实验室于 1974 年间建成的三系人肝癌细胞, 虽经体外长期培养(80—120 代), 液氮冻存(8—12 年), 仍然保留着人肝癌的相关特性, 并排除了这三系细胞与 HeLa 细胞发生交叉污染之可能性。

摘 要

本文就癌基因、特异性的单克隆抗体、细胞骨架的中等纤维之构型以及内源抗药性等诸方面, 论证了本所于 1974 年间建立的三系人肝癌细胞在体外长期培养和冻存后, 仍然具有人肝癌细胞之特征。

参 考 文 献

- [1] Freshney R. E. 1986. Ed. "Animal Cell Culture" Alan R. Liss. Inc., New York.
- [2] Nelson-Rees W. A. et al., 1974. *Science* 184: 1093-1096.
- [3] Chen R. et al., 1980. *Scientia Sinica* 23: 236-251.
- [4] Shen D-W & Chen R., 1985. in Tang Z. ed. "Subclinical Hepatocellular Carcinoma. pp. 336-349.
- [5] Fishinger P. J., 1987. *Intern. Cancer News*. 5: 4-12.
- [6] Barbacid M., 1986. *Carcinogenesis* 7: 1037-1042.
- [7] 顾健人等, 1985, 肿瘤, 5: 52-55.
- [8] 刘 黎等, 1979, 动物学报, 25: 1-7.
- [9] 丛笑倩等, 1980, 实验生物学报, 13: 317-329.
- [10] 张宗梁等, 1978, 科学通报, 23: 185-188.
- [11] 谢 弘等, 1985, 实验生物学报, 18: 265-273.
- [12] O'Guin W. M. et al., 1985. *Tissue Culture Methods* 9: 123-128.
- [13] Moll R. et al., 1982. *Cell* 31: 11-24.
- [14] 张荣兴、潘玉芝, 1988, 实验生物学报(付印中)。
- [15] Fojo A. T. et al., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84: 265-269.
- [16] 沈鼎武等, 未发表资料。

人类特定染色体 DNA 文库的建立和利用(续)

四、克隆

1. DNA 分离和克隆: 分选出的染色体 ($0.2-1.0 \times 10^6$) 是克隆的原材料, 在低浓度时还要离心浓缩。(Los Alamos 实验室用多胺法分离染色体, 浓缩容易丢失 DNA, 因此不进行这一步, 而是在分选缓

冲液中加入 SDS 和蛋白酶 K 直接处理染色体)。下一步骤是抽提、纯化、消化并把染色体 DNA 接到载体臂上, 然后用 λ 噬菌体外壳蛋白包装重组 DNA, 最后一步将重组的噬菌体放在含有大肠杆菌 LE 392 株的琼脂平板上生长扩增, 并洗涤平板裂解液。用离心法

除去平板裂解液的碎片, 所得上清液一般为 100—300 ml, 含 10^{11} 个重组噬菌体, 即为终产物——扩增了的文库。这些步骤由图 1 和表 1 概述。下面介绍提高克隆可靠性的两种方法。

表 1 从流式分选法分离出的中期染色体中分离和克隆人 DNA

1. 抽提和纯化分选出的染色体 DNA
① 在 4°C、40000 g 下离心 30 分钟将染色体沉淀下来
② 37°C 下蛋白酶 K 作用一昼夜水解染色体上蛋白质
③ 用酚和氯仿抽提蛋白质
④ 在 0.5 ml Tris-EDTA 液中透析
2. Hind III 或 EcoR 1 完全水解
① 用 Hind III 或 EcoR 1 切割染色体 DNA
② 再次抽提蛋白质, 并在水溶液中透析
3. 把染色体 DNA 片段与载体臂连接起来
① Ch 21 A 臂在真空中浓缩
② 用乙醇沉淀 DNA
③ 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀
④ 把 Ch 21 A 臂与人 DNA 片段连接起来
4. 重组子的包装和文库扩增
① 把重组 DNA 包装到活性噬菌体颗粒中
② 感染 <i>E. coli</i> : LE 392 株, 得到扩增的克隆

(1) 检验上述每一步骤是否真正高效地完成, 这就要求在完成每一步后都要进行染色体 DNA 的大小分布的分析, 即 Southern 印迹法分析。

(2) 用下列方法对文库进行鉴定: a) 分选时积累的流式核型的分析, b) 分选出的染色体的分析, c) 文库克隆的分子分析。

2. 文库的分子鉴定: 文库的分子分析可以得到有关纯度和文库其它特性的资料。用中国仓鼠与人淋巴细胞的杂种细胞构建的文库, 最易为仓鼠 DNA 污染, 因为很少的人染色体得以保留下来, 并且它们在流式核型的峰距实际分选峰很远。由于种间的特异杂交能够把人和仓鼠的 DNA 顺序区分开来, 因而可以用人或仓鼠全部基因组的 DNA 为探针和随机噬菌斑进行分子杂交, 来测定几个由杂交细胞构建的文库的纯度。如果某个特定染色体文库中不含有仓鼠染色体, 文库中就没有能和仓鼠总 DNA 杂交的克隆。如果文库所有的克隆中既有含人重复 DNA 的克隆, 又有含仓鼠重复 DNA 的克隆, 那么后者(译者注: 即为文库的污染部分)可由此法直接测出。实际上, 有必要检验文库中是否存在不含插入片段的克隆、或插入片段太小而不足以包含重复 DNA 顺序的克隆。

对于由正常的人成纤维细胞构建的 18 号和 20 号染色体文库, 我们鉴定了各个克隆插入片段的大小, 以及它们是包含重复序列还是含有严格的单一序列, 这些单一序列是否定位在需要的染色体。这种更深入的鉴定步骤如下:

① 各个克隆的分离和鉴定;

② 来自人仓鼠杂交细胞系的 DNA 板 (DNA panel: 即用 Hind III 消化各细胞系的总 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳后转移到硝酸纤维素滤膜, 以供杂交之用——译者注) 的制备, 这些不同的杂交细胞系含有部分相同的染色体, 在这些相同的染色体上可能含有某一被克隆的单拷贝序列;

③ 将单拷贝的克隆和上述 DNA 杂交, 以验证这些单拷贝克隆预期的染色体来源。

为了鉴定 18 号染色体文库, 随机地挑选 20 个克隆, 以人总 DNA 为探针, 用 Benton 和 Davis 法, 筛选含有重复序列的插入片段, 结果得到 6 个含 DNA 重复序列的克隆, 将其他 14 个克隆在菌体内繁殖后, 再分离 λ 噬菌体 DNA, 并用 Hind III 将插入片段从载体上消化下来, 接着按常规技术进行琼脂糖凝胶电泳。其中 6 个克隆插入片段的大小在 300 bp 以下, 由于太小, 在一般的凝胶中不能看到, 所以不能用作探针。其余 8 个克隆包含的插入片段长度从 0.7 kb 到 5.4 kb, 平均 1.9 kb (其中 3 个克隆含有二、三个 Hind III 消化片段), 这 8 个克隆(包括噬菌体和插入片段)均可作来自仓鼠细胞、人细胞和两种人仓鼠杂种细胞系(一种含 3 条人染色体, 另一种含这 3 条染色体和 18 号染色体)的 DNA 组的探针。将 8 个克隆用缺口翻译法标记 ^{32}P , 分别和上述四种细胞的 DNA 组按常规法杂交。结果 5 个克隆能和所有含有人 DNA 的 DNA 组杂交, 说明它们含有重复序列, 而其余 3 个克隆[其中 1 个包含三倍性片段(triple insert)]只包含单一序列。这个三倍性片段的 3 个 Hind III 切割片段相互邻接, 因为以该克隆作探针和其它酶消化所得的人总 DNA 杂交, 产生的杂交带数目等于插入片段中的酶切位点数加一。三倍性片段是由于 Hind III 消化不完全而形成的。后三个单一序列的插入片段都是 18 号染色体 DNA, 这说明纯度很高, 尽管统计精度较低。

对于 20 号染色体文库也做了上述相似的鉴定实验。选取初次筛选时不和人总 DNA 杂交的 20 个克隆, 再做常规的噬菌斑出现筛选 (Plaque-Lift screen), 结果有 4 个克隆包含重复序列。另外有一种更

表2 克隆到 Charon 21 A 的 Hind III 位点 18 个 Livermore 基因文库特征

文库 ID 号*	染色体来源		包装反应***		非扩增包装反应			扩增平板裂解液		
	细胞系	分选质量	独立重组数 ($\times 10^5$)	染色体当量数**	总噬菌斑形成单位 ($\times 10^5$)	每毫升噬菌斑形成单位 ($\times 10^5$)	染色体当量数**	总噬菌斑形成单位 ($\times 10^{10}$)	每毫升噬菌斑形成单位 ($\times 10^8$)	染色体当量数**
1.1.04 NS 01	UV 20111.21-27	卅	0.23	0.8				0.34	0.4	0.8
1.1.06 NS 01	UV 20111.15-33	卅	7.6	27	1.1	1.6	4	6	1.2	20
1.1.08 NS 02	UV 20111.21-27	卅	22	93	7.1	5.9	30	22	6	20
1.1.09 NS 01	UV 11111 A	卅	3	13				11	5.6	13
1.1.10 NS 01	762-8 A	卅	2.4	10.6	2.3	1.6	1.0	200	70	9.6
1.1.11 NS 01	UV 20111 A	卅	1.1	4.9				6.6	8.9	4.9
1.1.13 NS 01	761	卅	0.22	1.3				0.9	0.33	1.3
1.1.14 NS 01	GM 131	卅	23	135				730	340	135
1.1.15 NS 01	811	卅	26	152	14	9.9	82	140	84	30
1.1.15 NS 01	GM 131	卅	0.7	4.4				29	29	4.4
1.1.16 NS 02	761	+	45	300	17	12	113	22	5.8	20
1.1.17 NS 01	761	+	0.17	1.3				0.62	0.25	1.3
1.1.18 NS 01	761	卅	8.9	72				42	16	72
1.1.19 NS 01	811	卅	15	145	8.7	6.2	84	15	7.2	10
1.1.20 NS 01	811	卅	39	354	38	19	344	29	9.4	20
1.1.21 NS 02	811	卅	1.7	60	2.0	1.2	26	7.5	2.9	20
1.1.22 NS 01	811	卅	6.1	71	2.2	1.6	26	11	6.2	10
1.1.OY NS 01	811	卅	2.5	27				2.6	0.84	27

* 文库 ID 号由 8 个数字或字母组成, 前两个说明制备这个文库的实验室, 例如 LL = Lawrence Livermore 国家实验室, LA = Los Alamos 国家实验室; 第 3、4 个数字下有横线, 表明染色体类型(在有些情况下, 文库是由 14/15 染色体混合而成, 染色体型则表示为 45); 第 5 个字母表示染色体状态, 如 N 表示正常, T 表示易位等; 第 6 个字母可能是 S (小的插入片段, 即完全消化的文库) 或 L (大的插入片段即部分消化的文库); 最后两个字母代表文库构建号。

** 重组子数目 / 1 个染色体当量 = $\frac{(3 \times 10^9)(0.95)(f)}{4100}$, 在这里 0.95 是克隆分数, f 是特定染色体中细胞 DNA 分数, 4100 是片段平均大小。

*** 在建文库时, 包装反应物的效价可以测量, 对于未扩增的包装反应物和扩增的文库的效价, 是在 1985 年晚期至 1986 年早期的 3—4 个月内测定的。

+ #13, 17 和 Y 染色体文库以 1 ml 分装, 在 7% 二甲基亚砷中, -80°C 冰冻保存; 其它扩增文库都在 4°C 保存。

灵敏地检查重复序列的方法。将上述 20 个克隆直接培养在用细菌浸渗的硝酸纤维滤膜上, 再用这些滤膜去和人基因组 DNA 杂交, 结果表明除上述 4 个克隆外, 又有 6 个具有重复序列。从剩余的 10 个克隆中分离出 DNA, 消化得到插入片段, 电泳并转移到硝酸纤维膜上, 和人总 DNA 杂交, 又有另外 2 个克隆被证明具有重复序列。经测定, 另外 8 个克隆的插入片段的大小为 $0.7-7 \text{ kb}$, 平均为 3.1 kb , 而且它们没有一个具有多倍性片段。18 号和 20 号两个文库插入片段大

小和数目的差异的原因至今不得而知, 也许完全是偶然的。8 个克隆中的 6 个具有足够大的片段, 可用作 DNA 组的探针, 以标定 20 号染色体特异 DNA 顺序。6 个探针均无重复序列, 说明第二次筛选采用噬菌体扩增原位杂交法和克隆 DNA 的 Southern 印迹法一样有效。

一般说来, 染色体文库的纯度很高, 但有时也有例外。如尽管 4 号染色体峰能和仓鼠本底完全分开, 和邻近的仓鼠染色体峰也应有微小的重叠, 但在 4 号

表 5 克隆到 Charon 21 A 的 ECORI 位点 26 个 Los Alamos 基因文库特征

文库 ID 号*	染色体来源		包装反应 [†] **		非扩增包装反应			扩增平板裂解液		
	细胞系	分选质量	独立重组数 ($\times 10^5$)	染色体当量数**	总噬菌斑形成单位($\times 10^5$)	每毫升噬菌斑形成单位($\times 10^5$)**	染色体当量数	总噬菌斑形成单位($\times 10^{10}$)	每毫升噬菌斑形成单位($\times 10^8$)	染色体当量数**
1. A 01 NS 01	UV 24111.10-12	††	12.7	31				450	45	31
1. A 02 NS 01	UV 24111.5	††	0.70	1.8	0.14	0.47	0.35	17	2.6	1.5
1. A 03 NS 01	314-16	‡‡	0.27	0.8				8.4	2.7	0.8
1. A 04 NS 01	UV 20111.21-27	‡‡	0.51	1.6				8	2	1.6
1. A 04 NS 02	UV 20111.21-27	‡‡	0.74	2.3				16	2	2.3
1. A 05 NS 01	640-12	‡‡	13	43	11	8.67	36.4	0.18	0.10	6.6
1. A 06 NS 01	UV 20111.15-33	‡‡	0.48	1.7				14.8	1.9	1.7
1. A 07 NS 01	MR 3.3161 G 6	††	2.39	9.2				132	13	9.2
1. A 08 NS 04	UV 20111.21-27	††	0.36	1.5				0.10	0.01	1.5
1. A 09 NS 01	HSF-7	‡‡	1.59	7	1.27	1.59	5.6	0.02	0.02	1.4
1. A 10 NS 01	762-8 A	††	3.97	18	3.18	3.97	14.2	0.3	0.16	3.8
1. A 11 NS 02	801110	††	0.62	2.8	0.37	0.62	1.66	0.01	0.005	1.1
1. A 12 NS 01	81 P 5 d	+	6	27				97.5	6.5	27
1. A 13 NS 03	HSF-7	‡‡	0.75	4.2				0.02	0.007	4.2
1. A 14 NS 01	1634	+	6.15	36				348	35.0	36
1. A 15 NS 02	81 P 5 d	+	4	20	3.2	4	16.3	0.61	0.34	3.7
1. A 15 NS 03	1631	+	0.68	4				43	4.3	4
1. A 16 NS 02	HSF-7	††	0.4	2				6.9	3.5	2
1. A 17 NS 03	GM 130 A	††	1.11	7.9				42	4.2	7.9
1. A 18 NS 04	HSF-7	‡‡	2.51	19				112	11	19
1. A 19 NS 03	HSF-7	‡‡	1.1	11	0.88	1.1	8.4	0.11	0.06	2.6
1. A 20 NS 01	HSF-7	‡‡	0.16	1.5				0.10	0.01	1.5
1. A 21 NS 01	HSF-7	‡‡	10.7	137				450	45	137
1. A 22 NS 03	HSF-7	‡‡	0.93	11	0.74	0.93	8.79	0.11	0.06	2.2
1. AOXNS 01	81 p5d	††	2.14	8.5				4.23	0.28	8.5
1. AOYNS 01	HSF-7	‡‡	1.07	11.5	0.85	1.1	9.2	0.02	0.01	2.3

*、**、*** 同表 2 注。

染色体文库中竟意外地有 20% 仓鼠 DNA 污染。至今 7 号染色体文库污染的可能性较大，是因为该染色体峰和仓鼠背景相距很近，其纯度也不高。其它几个文库(6 号、8 号、9 号和 11 号染色体文库)中仓鼠 DNA 污染范围为 15—50%。对 17 号染色体文库来说，定位数据表明一半的单一序列定位到 17 号染色体上，而另一半定位到其它的人染色体上。这个文库是最早建立的文库之一。它的低纯度应归因于两个事实：一是在所用的人成纤维细胞的流式核型上 17 号峰不能和邻近的 16 号峰很好地分离，二是在分选的染色体制备物中出现许多的碎片和分辨率差。另外，这

个文库小(染色体当量数)，将在以后从更好的原始材料重新克隆。

3. 文库的保存：目前文库保存有下面四种方法：

- (1) 7% 二甲基亚砜 - 80°C 下保存未扩增文库。
- (2) 4°C 下保存平板裂解物(plate lysate)。
- (3) 7% 二甲基亚砜 - 80°C 下保存平板裂解物。
- (4) 4°C 下保存在 CsCl₂ 中。

早期经验表明第二种方法对于保存用 Hind III 构建的文库很有效。例如 1984 年 3 月建立的 18 号文库(第一个文库)4°C 下在氯仿中保存相当稳定，20 个月

后其效价仅下降了 5.3 倍。据统计, 45 个 Hind III 建立的文库中有 10 个在一年中效价降低不到 5 倍, 另一个文库(4号)大约下降 9 倍/年。

然而, 此法保存的 6 号、13 号、17 号 Y 等四个由 Hind III 构建的文库以及 7 个由 Eco RI 构建的文库, 其效价降低速率高于 10 倍/年, 其原因尚不清楚。用第一种或第三种方法来保存 13 号、17 号 Y 文库, 8 个月后效价仅降低了约 2 倍(~3 倍/年)。这样看来, 低温保存可防止文库活性大幅度降低。Hind III 构建的文库有九个非常大, 其中未扩增即原初包装的重组 DNA 先在瓊仿噬菌体稀释缓冲液中 4°C 下保存; 随后转移至 -80°C 7% 二甲基亚砷中, 7—12 月份(4°C 下保存至 6 个月)中它们的效价维持在最初的水平。基于上面的观察, 我们推测平板裂解物中的杂质一定是引起扩增文库效价下降的原因。因此我们用 CsCl₂ 密度梯度离心法纯化浓缩了 10 个 Hind III 文库中的几个(约一半)。简要步骤是: 用聚乙烯乙二醇沉淀噬菌体, 重新悬浮于少量的聚乙烯乙二醇中, CsCl₂ 梯度离心至平衡, 分级收集相应于具有小片段和大片段的噬菌体, 目前正在 4°C 下保存并进一步监测中。Eco RI 建立的 17 号文库也同样用 CsCl₂ 梯度离心法纯化浓缩。

1986 年 2 月所有的文库已被转移到 ATCC (the

American Type Culture Collection), Rockville, MD, 用液氮低温长期保存。

五、文库的状况和利用

1. 文库的状况: 表 2 和表 3 概括了 1986 年 4 月止两个实验室建立的较小插入片段的文库的特征, 包括以下几方面:

- (1) 用于文库构建的细胞系和分选的染色体号, 分选质量。
- (2) 构建文库时所有的包装反应(packaging reaction)。
- (3) 未扩增的包装反应。
- (4) 用平板裂解物表示的扩增文库。
- (5) 部分由 CsCl₂ 梯度纯化的平板裂解物。

2. 利用: 一般的科研机构, 无论国内国外, 均可获得这些文库。从 1986 年 2 月起, 近 1200 份文库被送到约 300 个国内外实验室。贮藏和销售已移交给 ATCC, Rockville, MD, 贮藏由 Division of Resources, N. I. H 主管, 它把来自 Livermore 和 Los Alamos 的文库储备冷冻于液氮中保存, 经营销售业务, 并将用户的反馈信息收集起来并输入到向一般科研机构开放的信息数据库中。

何农高 张云 杨新林摘译自 *Biotechnology*
第 4 卷(1986 年)p 537—552 薛绍白校

植物组织培养中的变异*

三野 真布 大西 昇 山岸 秀夫

植物的培养组织在形状、色泽、坚韧程度等各种性状均富有变异。这些变异大致是受生理的、后生的(Epigenetic)及遗传的支配^[1]。前两者主要是基因发生改变, 而遗传的变异则起因于基因和染色体的变化。弄清培养细胞发生遗传的变异程度, 了解其细胞的特征是很重要的。但是光凭能观察到的性状, 要弄清楚这一点是很困难的。因此, 观察在染色体和 DNA 上发生的变化就很重要。

本文首先叙述观察细胞染色体的方法, 然后就作为基因本身的小环状 DNA 在培养细胞中出现及其观察方法予以说明。

1. 染色体

细胞在一定周期进行分裂增殖。在真核细胞分裂周期中有丝分裂期, 核内染色质浓缩形成染色体。每一种物种染色体的数目和形状原则上是固定的。体细胞的染色体数以 $2n$ 表示, 例如水稻为 24, 玉米为 20。形态上以着丝分裂中期的染色体形状、着丝粒的位置等特点进行研究, 物种特有的形态多数已有记载^[2]。

* 本文摘译自山田康之编著(1984 年)“植物细胞培养マニュアル”第 109~121 页。講談社サイエンティフィック。