

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 and 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 先在瓊脂糖凝胶稀释缓冲液中 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。

通常用伸展良好的根尖进行观察, 因为根尖细胞分裂很活跃, 易于获得较多的中期染色体分裂相。

依据已有的报道, 培养细胞的染色体数目和形态均有变异的倾向^[3-5]。因此, 为了正确地掌握变异的情况, 必须观察多个细胞。和用根尖细胞观察染色体相同, 也采用分裂旺盛时期的培养细胞。一般培养细胞在对数增殖期分裂旺盛, 建议取这一时期的细胞来进行观察。但是对数增殖期时的染色体情况随供试材料、接种的细胞量、培养温度等条件而有所变动。为此, 预先了解各个材料的染色体情况是很重要的。以下叙述培养细胞染色体观察的较为具体的操作流程。

A. 染色液的配制

1) Schiff 试剂

① 置 200 ml 蒸馏水在 500 ml 三角瓶内煮沸, 趁热加入 1 克碱性品红混合后, 再加热数分钟。② 然后在流水中冷却到水温, 加入 20 ml 1 N 盐酸, 再加入 1 克 $K_2S_2O_8$ 混合。③ 三角瓶口用硅塞密封在冰库中贮存 12 小时。④ 贮存后的液体透明, 呈略带红色的浅黄色。加入 1 克活性炭, 搅拌 5 分钟。⑤ 抽吸过滤, 滤液装入棕色瓶内, 密封后贮存于冰库。按此法配制的液体大致无色透明, 如果呈深红色, 则因染色能力极低而不能使用。

2) 醋酸地衣红

① 将 50 ml 5% 醋酸溶液装入 200 ml 三角瓶中, 加入 1 克地衣红混合。② 放入作为沸石的泡沫玻片, 在迪姆罗迺流冷凝器(Dimroth Condenser)中, 于带有可变温的电炉上迺流 2—3 小时。③ 冷却后过滤, 可在室温下保存。

B. 试验材料的处理

a) 前处理: 前处理使有丝分裂停止在中期, 因染色体发生收缩大多能观察到形态良好的染色体。处理方法如下:

1) 冷水处理: 将细胞(约 300 mg)放入已有蒸馏水的样品管中, 密封。在足量的冰水中静置 24 小时。

2) 秋水仙素处理。和 1) 等量的细胞浸入含 0.025~0.25% 秋水仙素水溶液中, 在黑暗中静置 2~6 小时。

3) 8-羟基喹啉处理: 在 2 mmol/L 羟基喹啉水溶液中处理 2~6 小时。

前处理的最适条件随试验材料而异, 建议用不同的处理方法进行试验。药品特别是秋水仙素容易引起染色体的异常收缩, 因此须考虑处理的浓度和时间。此外, 细胞团大的情况下, 须进行减压处理以促进药

剂向细胞间隙渗透。供试材料多的情况下, 应在小纸片上用铅笔编上系统号码, 以利于有条不紊的放入样品管。

b) 固定和保存: 前处理结束后, 样品管内液体用移液管除去。将 Formal 液(3 份体积乙醇 + 1 份体积冰醋酸)加入试验材料中进行固定。为使固定充分可在冰库中放置一夜, 此后换入 70% 乙醇, 在冰库中贮存。

C. 染色

a) 水解: 由于水解处理使细胞解离而易于压片。而且生成 DNA 的水解物, 可与 Schiff 试剂发生孚尔根(Feulgen)核染色反应供染色着色。操作程序如下:

1) 将一部分保存的试剂材料移入已加 1 mol/L 盐酸的样品管中, 室温放置约五分钟。

2) 泡沫苯乙烯(styrol)薄板上开适当的洞穴, 将样品管插入固定。插入的深度以在板下能见试验材料为度。将板在准 60°C 热水中漂浮 6~10 分钟。

细胞的解离程度随材料种类不同而多少有些差异, 须事先了解最适处理时间, 并须注意不因处理过度而使显色反应降低。

b) 水洗: 水解结束后迅速除去盐酸, 注入蒸馏水停止反应。至少换水 3 次, 充分水洗。细胞团大的情况下, 应将样品管在减压下以洗出细胞间隙中的残余盐酸。

c) 染色: 除去样品管内水分, 加入 Schiff 试剂以浸没材料为度, 于室温下放置 20~30 分钟进行染色, 细胞团分为红色点状深染部分、浅染部分及完全不着色部分。深染部分多为管状成分发达的组织, 无分裂相。

d) 观察:

1) 用针尖挑取少量深染部分周围的浅色部分, 置于载玻片上。

2) 试验材料上加一滴醋酸地衣红, 盖上盖玻片。

3) 用削尖竹筷端部在盖玻片上轻叩使细胞散开。此时试验材料如粉状散开的多是大小一致、核大的小形细胞, 其中可找到好的分裂相。反之, 分散不良的则分裂相少, 应立即换用新的试验材料。

4) 在随耐显微镜观察的情况下, 将细胞分散到互不重叠的程度, 同时确认分裂相的大致位置。

5) 盖玻片上复以滤纸, 吸去多余的地衣红, 然后在滤纸上用拇指加压使染色体分散(注意不要移动盖玻片)后镜检。使用酒镜(100 倍)以前盖玻片四周要用指甲油封固。

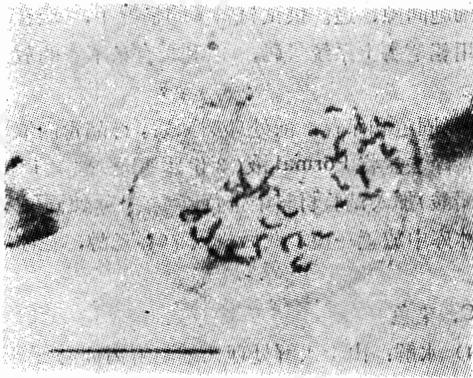


图1 日本黄连培养细胞有丝分裂中期形态, 31条染色体, 标尺为20 μ m

6) 如果细胞内蓄积大量淀粉致使观察困难, 可将染色后的试验材料样品管移入水中加热即沸腾, 淀粉粒即可告消失。

7) 拍摄照片时, 光源应加绿色滤光片, 使用微粒拷贝软片。要查供试材料正常染色体数时, 可参考有花植物的染色图谱(Chromosome atlas of flowering plant eds Darlington & Wylie)等书。

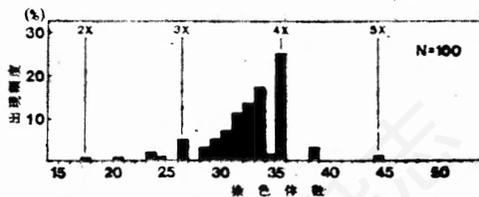


图2 日本黄连培养细胞的染色体数变异, N为观察细胞数

图1为作者等在研究室内存存的小蘗碱高产的日本黄连(*Coptis japonie* $2n=18$)培养细胞中期染色形态的一个例子。这一细胞株具有从三倍体到四倍体的连续变异(图2), 显示了这一培养细胞染色体数变异的一个方面。另一方面, 在观察染色体数的同时, 也应研究染色体的构造, 这对研究培养细胞的遗传变异是很重要的。为此, 必须在常规核型以外用Giemsa等染色法对染色体进行观察。

2. 小环状DNA

对高等生物小环状DNA*的研究, 1972年Smith等首先作了详细的报道^[6], 至今已确认在类人猿、人、小鼠、鸡等多数动物的细胞中存在。Smith等在HeLa细胞对数增殖期的细胞中发现在细胞质内含有50~200个小环状DNA, 又在恒定期用蛋白质合成抑制剂放线菌酮(Cycloheximide)处理的细胞中发

小环状DNA分别增加10~20倍和20~30倍。这些小环状DNA都是0.2~20 μ m的不均一的分子, 显示出其似来源于原有的核DNA。此后, 在高等动物中又有小环状DNA与细胞的分化^[7]、衰老^[8]、特定基因的复制^[9]、转移因子^[10]等有关的令人感兴趣的报告。另一方面对高等植物主要与线粒体有关的基因组DNA的各种各样的许多环状DNA集团的状态进一步进行了研究^[11]。迄今, 植物细胞尚无线粒体以外的小环状DNA的报道, 最近作者等认为在植物培养细胞及叶肉细胞的核内存在有小环状DNA的可能性^[12]。

这样的小环状DNA作为研究对象时最困难之点, 在于细胞内小环状DNA的数量极微(多数情况下占总DNA量的0.02%以下)或不存在, 从大量细胞(10^9 个以上)提取DNA, 小环状DNA的分离、纯化须用繁琐的操作。本文介绍的是能从少量细胞中在短时间检出这样小环状DNA的电子显微镜术。这一方法称为云母压碎吸着法^[13]。这一方法最初是为从大肠杆菌用简单方法检出所含质体而开发出来的^[14], 此后山岸等为观察动物细胞内小环状DNA而加以改良^[15]。这一方法大致是将解离的细胞在云母片上破碎, 云母片将细胞内DNA吸附后, 用白金-投影检出小环状DNA。这里介绍的是根据山岸等方法, 并指出适用于植物细胞应注意的事项。

A. 云母压碎吸着法

作者通常所用方法见图3。

1) 植物细胞与动物不同的是具有坚固的细胞壁, 用以后叙述的机械力压破是困难的, 为此必须用酶处理细胞产生原生质体。或者用细胞部分分离法, 预先将细胞内细胞器分离出来, 以此作为试验材料。后一种情况下操作稍麻烦一些, 但其优点是能同时决定小环状DNA所在部位。分离原生质体及细胞部分分离的方法, 此处从略。

2) 培养皿上滴水数滴, 放入切成适当大小的石蜡, 紧密附着。石蜡上再滴上10 μ l的重蒸馏水, 注入所用的试验材料。在原生质体、游离核的情况下, 注入最多1 μ l的浓度调整到 10^6 个/ml的悬液。如在线粒体、叶绿体的情况下, 应调节适宜的注入量。此时如加入过多的试验材料, 则后面叙述的碳膜从云母片上剥离困难, 因此必须注意。将细胞内小器官用作试验材料的情况下, 分离的纯度也有影响。此外, 重要的

* 此处所谓“小环状DNA”不包括病毒等外来的小环状DNA。



图 5-10 云母压碎吸着法

译者注 剥离的碳膜易粘附于烧杯壁，改用聚四氟乙烯制的容器，可避免此缺陷

是试验材料的悬液中不能含有 Mg^{++} 。存在数 $mmol/L$ 以上的 Mg^{2+} 时，DNA 和云母片之间形成桥，吸着非特异的 DNA，妨碍小环状 DNA 的检出。 Mg^{2+} 存在时，DNase 的活性增高，从这一点考虑，也不能不防止 Mg^{2+} 的渗入。作者等在悬液中，原生质体用 $0.6 mol/L$ 甘露醇，分离的核用 $10 mmol/L$ Tris-acetate、 $0.1 mol/L$ 蔗糖，或用 $1/30 mol/L$ 磷酸缓冲液， $0.1 mol/L$ 蔗糖。根据上述情况，本方法中所需最低限度的细胞数是 $10^6/ml \times 1 \mu l = 1000$ 个。

3) 将 $1 \times 0.5 cm$ 云母片劈开，于劈开的面上放置按 2) 项配制的细胞悬液。云母片在使用前才劈开，劈开时用研磨好的二支镊子插入云母片的断层，用力向两侧扳开。

4) 将镊子柄接在云母片上，在云母片上留下镊子的痕迹。几秒钟后取下镊子，放置 30 秒钟。这时云母片和石蜡之间若有气泡，则应继续用镊子轻压 30 秒钟，用这一操作使细胞破坏，内容物在云母片上铺展。DNA 与云母片均带有电荷，吸附困难。与蛋白质或膜样物质形成复合体的小 DNA 分子形成的配体 (Ligand) 被保持在云母片表面，构成染色体的巨大分

子则难以吸附。

5), 6) 用小镊子夹住云母片的一端，短时间水洗后在 $1 mol/L NaCl$ 中将小镊子上下移动漂洗数秒，洗去残留的蛋白质，用蒸馏水除去 $NaCl$ ，再将云母片置于新的重蒸馏水中泡 1 小时，水洗。

7) 1 小时后，用 99.5% 乙醇脱水 10 秒钟，风干。

8) 用白金投影，随之用碳蒸附复制，详细情况参考有关书籍^[16,17]。将云母片固定平台上时，用指甲油较好。

9) 用小镊子夹住云母片的一端，用剪刀剪去周围 $1 \sim 2 mm$ 。然后自断面将云母片斜插入蒸馏水中，碳膜浮于水面。剪去周围三面，碳膜顺利地剥离。此时如前所述，压碎细胞量过多，则碳膜漂浮困难。此时将云母片在 $1 mol/L$ 尿素中浸数小时，以分解不需要的蛋白质成分，促进复制膜的剥离。但是这样强制剥离完成的样品，附着较多蛋白质一类高分子物质，难以获得良好的电子显微镜图像。可能的话，从头重新制作为佳。

10) 用铜制 400 目筛网，捞取碳膜。筛网事先用丙酮或水处理易于捞取。用波频擦净器 (cymowipe-out) 除去镊子，筛网上残余过剩水分及筛网裹侧周围多余的碳膜，用电子显微镜观察。

作者等依据第 8) 项步骤，用连续蒸附装置 (JHIE 型、日本电子社制)，迄今所用时间为 $2 \sim 3$ 小时，所用设备未发生问题。整个操作过程到电子显微镜观察为止约需半天时间。

B. 运用的事例与考察

作者等在数种植物细胞内小器官中观察了运用本法的小环状 DNA。以小麦培养细胞游离核的分部为例。图 4 是其核分部的照片。将核以 10^6 个/ml 浓度悬浮在 $1/30 mol/L$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0)，其中 $1 \mu l$ 用本法观察，检查出各种长度的小环状 DNA (图 5)，图 5 的 b、c、f 是可见大的蛋白质样物质附着。a、b 是显示检出最多的 $1 \mu m$ (约 3100 bp) 以下的分子，几个 μm 的小环状 DNA 零星可见，观察到的最大分子为 $0.5 \mu m$ 。d、e 显示用本法呈现出所特有形状的小环状 DNA。

这种云母压碎吸着法获得的小环状 DNA，是作为共价闭合环状 DNA (cccDNA, covalent closed circular DNA) 在细胞内存在，或是线状的 DNA 由蛋白质等介入而成为环状，这是重要的问题。今后对小环状 DNA 有必要进一步采用更直接的方法来分析，

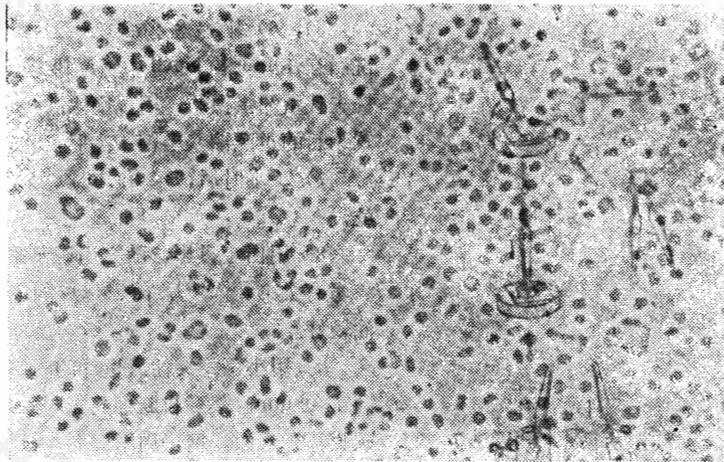


图 4 从小麦培养细胞分离的核分部的相差显微镜摄影

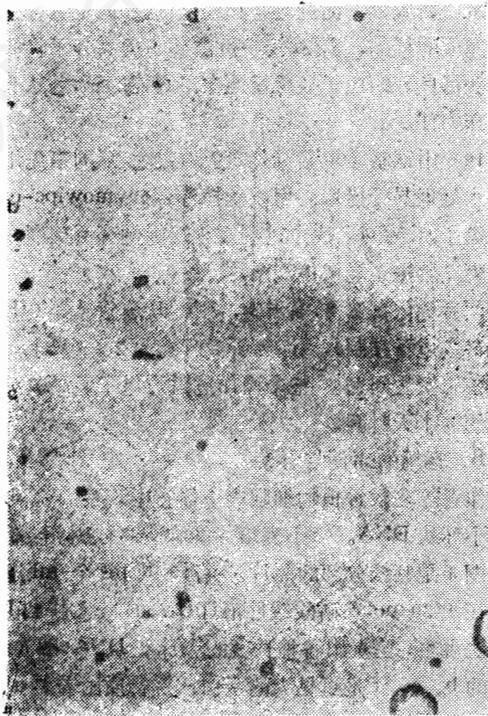


图 5 云母压碎吸附法检出的小麦分离核的小环状 DNA (标尺为 $0.5 \mu\text{m}$)

a $0.63 \mu\text{m}$, b $0.99 \mu\text{m}$, c $1.29 \mu\text{m}$, d $3.36 \mu\text{m}$, e $4.36 \mu\text{m}$, f $3.58 \mu\text{m}$

前者情况下利用已有的 cccDNA 分析技术, 后者须用蛋白质与 DNA 形成复合体保持原样状态的处理技术。关于这一点, 山岸等以 HeLa 细胞、小鼠胸腺细胞^[15]、大鼠成肌细胞(myoblast)用已有的 EtBr-CsCl 密度梯度离心法和云母压碎吸着法分别获得的小环状 DNA

分布, 认为是一致的。所以考虑用本方法观察到的分子多数是作为 cccDNA 在细胞内存在的。事实上作者等从烟草叶肉细胞核分离物依据 EtBr-CsCl 密度梯度离心法获得的 cccDNA 这一事实已准备予以肯定。

植物培养细胞、叶肉细胞的核分离物内检出的小环状 DNA 以什么样的形式存在, 以及这些分子具有什么机能等等是今后的研究课题。

(周荣仁译, 周郑校)

参 考 文 献

- [1] R. S. Chaleff, 1981, *Genetics of higher plants, Application of Cell culture.*, Cambridge Univ. press.
- [2] C. P. Swanson, 1957, *Cytology and cytogenetics*, Prentice-Hall, Inc.
- [3] F. D'Amato, 1975, *Crop resource for today and tomorrow* (eds, O. Frankel, J. G. Hawks). p. 333. Cambridge Univ. press.
- [4] N. Sunderland, 1977, *Plant Cell and Tissue Culture*, Vol. 2 (ed. H. E. Street), p. 177, Univ California press.
- [5] N. Inomata, 1982, *Jpn. J. Genet.*, 57, 59.
- [6] C. A. Smith and J. Vinograd., 1972, *J. Mol. Biol.*, 69, 163.
- [7] R. J. Delap and M. G. Rush, 1978, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.A.*, 75, 5855.
- [8] R. J. Shmookler Reis, C. K. Lumpkin Jr., J. R. McGill, K. T. Riabowol and S. Goldstein, 1983, *Nature*, 301, 394.

- [9] J. O. Roचाix and A. P. Bird, 1975, *Chromosoma*, 52, 317.
- [10] A. J. Flavell and D. Ish-Horowicz, 1981, *Nature*, 292, 591.
- [11] C. W. Douglas 1982, *Microbiol. Rev.*, 46, 208.
- [12] 大西 昇, 山田康之, 山岸秀夫, 1983, 第8回植物组织培养シンポジウム講演要旨集, p. 20
- [13] T. Kunisada and H. Yamagishi, 1983, *Plasmid*, 9, 8.
- [14] 国贞隆弘, 山岸秀夫, 1983, 生物物理, 23, 98.
- [15] H. Yamagishi, T. KUnisada and T. Tsuda, 1982, *Plamid*, 8, 299.
- [16] 山岸秀夫, 1975, 核酸の化学工, p. 349. 东京化学同人.
- [17] 山岸秀夫, 1981, 遺伝子观察への旅, p. 41, 东京大学出版会.

人转移性胰腺癌细胞系 (PU-pan-1) 的建立及其生物学特性

盛宏森 *邵今一 罗江明 孔燕国 蔡力行 钟守先 朱 预
(北京协和医院外科)

胰腺癌在国内外的发病率及死亡率逐年上升。在美国, 胰腺癌死亡人数在恶性肿瘤中居第五位。由于胰腺位于腹腔深部, 早期症状不明显, 一旦出现梗阻黄疸或腰背疼痛时已属晚期, 切除率很低, 五年生存率更低。

为了探讨胰腺癌的发病机理, 寻找胰腺癌新的诊治手段, 建立胰腺癌体外实验模型是很必要的。国外以原发肿瘤或转移癌为材料已建立了多株胰腺癌细胞系, 如 SW-1990, HGC-25, PANC-1 等等^[1-4]。国内尚未见报告。我们自 1986 年 7 月开始着手建系, 从获得转移性胰腺癌的原代培养物开始, 至今已在体外稳定传代一年余, 计共 75 代, 定名为 PU-pan-1。

一、培养细胞的组织来源

肿瘤组织直接取自手术中。患者 1986 年 7 月 1 日剖腹探查时, 见胰头部有约 8 cm 直径肿物, 质地硬, 针吸组织做细胞学检查找到癌细胞。胃肠道及胆囊探查均未及肿瘤, 肝脏表面有大量灰白色赘生结节, 切取结节送病理检查, 同时进行组织培养。病理证实为来自胰腺的转移性中度分化腺癌。H. E. 染色切片显示

肝组织中有大小不等的癌转移结节, 大多位于汇管区附近。转移癌组织中纤维组织大量增生, 癌腺体大小不等, 呈导管样排列, 偶见低乳头状结构突入管腔, 癌细胞呈中度异形性, 可见明显的核仁, 并可见分裂相(图 1)。

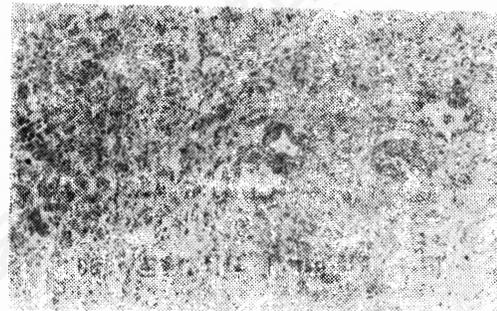


图 1 手术标本切片示转移癌, 在肝组织中, 周围有大量纤维组织 H. E. $\times 100$

二、建系经过

将取下的肝脏转移癌组织用加抗菌素的 PBS(pH 7.4) 冲洗三次, 在无菌条件下用手术刀切成约 1 mm³ 小块, 加入少量含 20% 胎牛

* 中国协和医科大学生理教研室