



人体肝癌细胞中期染色体的分离纯化^{*}

陆荣华 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

纯化的中期染色体不仅可供染色体结构和化学组成的研究,而且可借纯化了的中期染色体将基因由一体外培养的哺乳动物细胞转移到另一哺乳动物细胞^[2-5],为基因的染色体定位研究开拓了崭新的途径。

我们试图应用染色体介导的基因转移技术开展甲胎蛋白的基因定位工作,为此采用 Sekiguchi(1973)^[7]方法,略加改进,分离纯化人体肝癌体外细胞系 BEL-7402 的中期染色体。现将结果简述如下。

材料与 方法

(一) 细胞

人体肝癌细胞系 BEL-7402^[1],用 RPMI-1640 培养液中含 5% 小牛血清培养。

(二) M 期细胞的制备与收集

人体肝癌细胞 BEL-7402 接种 48 小时后长成单层,弃旧液,加入内含 2mM 胸腺嘧啶核苷 (TdR) (Calbiochem 产品) 的新鲜培养液培养 24 小时。弃液后,以 Hanks 液洗涤细胞 3 次,加入内含 5×10^{-8} M 秋水仙素 (E. Merck 产品) 的新鲜培养液,使细胞阻断于 M 期,历时 18 小时。嗣后仅需把培养瓶以平行于细胞培养面的方向摇几下,使处于 M 期的圆形细胞从瓶壁脱下,离心收集。收集所得的细胞以 Hanks 液洗涤 3 次,经低渗 (Hanks 液:蒸馏水为 1:9; 37℃) 膨胀 60 分钟,甲醇冰乙酸(3:1)固定,滴片及 Giemsa 染色,置高倍镜下统计 M 期细胞的百分率。

(三) 中期染色体分离纯化

经上述胸腺嘧啶核苷和秋水仙素处理后离心收集的细胞取 $5-6 \times 10^7$ 个悬浮于 10 倍体积 TM 溶液 (0.02M Tris, 以浓盐酸调至 pH7.0, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂) 低渗膨胀 30 分钟。离心收集细胞置于 10 倍体积 TMS 液 (TM 溶液中加入 0.05% 皂角苷),玻璃匀浆器破碎细胞,然后 2,000rpm 离心 20 分钟,弃上清液。再将含有中期染色体、间期核、破碎细胞以及完整细胞等的沉淀物重新悬浮于

TMS 液,并于 500rpm 离心 5 分钟,弃沉淀中所含的核、破碎细胞及完整细胞。悬液再经 500 rpm—2,000rpm 交替反复离心,充分除去染色体以外的成分,染色体分离纯化过程随时以光学显微镜镜检。

结果与 讨论

细胞经胸腺嘧啶核苷和秋水仙素处理后,受阻于 M 期,细胞呈圆形,又由于含低浓度血清培养液培养的细胞其粘附瓶壁的能力较弱,部分圆形细胞已脱落于培液,因此只需轻轻振荡培养瓶即能收集大量 M 期细胞,收获率为 93—95%。M 期细胞的染色体形态正常。我们曾用此方法制备的 M 期细胞,经 PEG 诱导与同种间期细胞融合,能诱发间期的核形成早熟凝聚态染色体 (PCC)。这提示了该中期细胞具生物学活性。Burkholder 等(1970)也曾采用相类似的方法。制备 M 期 HeLa 和 L 细胞,其收获率分别为 76% 和 87%,低于我们的收获率^[6]。

由于提供分离染色体的细胞中绝大多数是 M 期细胞,因此有利于中期染色体的分离纯化。细胞经匀浆破碎后悬浮在 TMS 溶液中,经多次反复分离纯化,即能得到大量的没有细胞核等污染的纯化的中期染色体(图版图 1)。染色体形态正常,而且各类大小不等的染色体齐全。有趣的是,我们在纯化了的中期染色体中也见到了该细胞系的异常长的、近端着丝点的标志染色体(图版图 2)。Sekiguchi 等分离所得的染色体待转移至另一类细胞时,能复制并有基因表达^[7,8]。目前,我们正在将分离的肝癌细胞中期染色体转移至另一细胞系统中,以图研究基因的表达、定位等。

* 戴信兰同志参加实验工作。

参 考 文 献

- [1] 陈瑞铭、朱德厚、叶秀珍、沈鼎武、陆荣华, 1979, 中国科学, 12:1225—1233.
- [2] McBride, O. W. and H. L. Ozer, 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70:1258—1262.
- [3] Willecke, K. and F. H. Ruddle, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72:1792—1796.
- [4] Spandidos, D. A. and L. Simonovitch, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:3480—3484.
- [5] Sabourin, D. J. and R. L. Davidson, 1979, *Somatic Cell Genetics*, 5:159—174.
- [6] Burkholder, G. D. and B. B. Mukherjee, 1970, *Exp. cell Res.* 61:413—418.
- [7] Sekiquchi, T. et al., 1973, *Exp. Cell Res.* 80:223—236.
- [8] Sekiquchi, T. et al., 1975, *Exp. Cell Res.* 94:327—338.

人 体 染 色 体 的 扫 描 电 镜 观 察

赵寿元 马正蓉 丁 斐

(复旦大学遗传学研究所)

扫描电镜是近十年来迅速发展的一项大型精密电子光学分析仪器, 我国于一九七三年开始试制, 一九七五年有成品出厂。目前在生物学研究中, 扫描电镜已广泛应用于观察细胞表面结构, 结合冰冻蚀刻观察细胞内部结构的立体构型, 以及用于组织化学研究^[1-4]。一九七一年, Golomb 等^[5]第一次用扫描电镜研究人体染色体的立体构型以来, 这方面的报道还不多。我们用扫描电镜比较观察了离体培养的人体外周血白细胞正常染色体和辐射诱发的畸变染色体。

按照过去报道的方法^[6]作人体外周血培养。RPMI 1640 培养液 4 毫升加小牛血清 1 毫升, 加 PHA 和青、链霉素, 滴入正常人体静脉血 0.4 毫升。37℃ 培养 72 小时, 加秋水仙素后继续培养 4 小时。0.025M KCl 溶液低渗 20 分钟, 甲醇:冰醋酸(3:1)固定两次, 空气干燥法制片。这样制备的染色体标本作为正常对照。

另抽取正常人体静脉血 10 毫升, 加肝素抗凝, 置灭菌离心管中, 用钴⁶⁰γ射线照射, 剂量率为每分钟 146.8 仑琴, 总剂量为 200 拉

特。然后按上述方法制备染色体标本, 用以观察畸变的染色体。

制备好的染色体标本放在镀膜机的真空罩里, 抽真空到 6×10^{-5} 托时, 喷涂一层薄的金膜, 镀膜速度约每分钟 60 转, 在一分钟内镀毕, 金膜的厚度为 300 Å—1000 Å。染色体标本经真空喷涂金膜后, 在扫描电镜的荧光屏上观察, 摄影。

一、扫描电镜的景深大, 比光学显微镜的景深大几百倍, 因而可以获得清晰的三维图象。图 1 是人体外周血白细胞有丝分裂中期的染色体照片, 具有明显的立体感和真实感。

二、扫描电镜的标本制备比较简单, 用光学显微镜的标本经真空喷涂后即可观察, 不象透射式电镜需要作超薄切片。此外, 放大倍数在很宽的范围内连续可调, 一般在 20 倍到几十万倍乃至 20 万倍; 这样, 既可观察标本的全貌, 又能观察标本的局部细节。图 2 是正常的单条染色体, 图 3 是染色单体断裂, 图 4 是显示了经 γ 射线辐射引起的双着丝点染色体。同光学显微镜观察相比, 这些畸变图象的分辨率较高。