

中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K 1)中期染色体悬浮液的制备及其流式核型分析*

徐淑惠 宋平根 李荣浩** 薛绍白
(北京师范大学 生物系)

流式核型分析是用流式细胞光度术(FCM)定量分析染色体的DNA分布,以便得到某种染色体在物种或细胞群体中的频数^[1]。其原理是把染色体分散于悬浮液中,用荧光染料对DNA进行染色后,染色体以百万分之一秒的速度逐个通过激光束的焦点,产生的闪光被接收,并转换为电脉冲后,以频率分布图表示。流式分类是上述方法的延伸,使带有特殊DNA荧光值的染色体从其他染色体中分离出来,得到纯的染色体。

流式核型分析可成为常规核型和带型分析的重要辅助手段,在临床上用于对标记染色体和易位的诊断。流式分类得到的某种单纯的染色体可建立染色体DNA文库,研究某种染色体的DNA结构,并对正常和异常染色体中的染色体蛋白质特性进行分析。

1975年Gray等^[2]以及Stubblefield等^[3]已开始用流式核型方法进行研究,目前用这种技术已能分辨出18—20种不同类型的人类染色体^[4]。本文是在我室已建立的流式细胞光度技术的基础上,对流式核型分析的染色体悬浮液的制备、测定条件以及计算机对流式核型分析和处理等方面进行初步的尝试。

材 料 和 方 法

1. 细胞培养 中国仓鼠卵巢细胞株CHO-K 1培养在含10%的小牛血清的MEM-Eagle's培养液中,在对数生长期,加入秋水仙胺(0.032 μg/ml),5小时后,用振荡法收集有丝分裂中期细胞。

2. 染色体悬浮液的制备与染色 按Atten等^[5]方法将收集到的中期细胞悬浮在1.5 ml的碘化丙锭

(PI)的低渗液中[内含0.075 MKCl和PI 0.05mg/ml, pH 8.4],室温静置10分钟,再加入0.75 ml含有Triton-X-100的溶液[含0.075 M KCl, 0.1% Triton X-100和PI 0.05 mg/ml],静置3分钟后,用4号针头抽打细胞悬浮液2—3次释放染色体,并在荧光显微镜下用546 nm激发光检查染色体。

3. FCM测定 用荧光激发细胞分类器FACSIH型(美国Becton-Dickinson公司)测定。2瓦氩离子激光器,激发光的波长514 nm,荧光通过570 nm高通滤光片被光电倍增管接受。测定结果以直方图形式显示在ND-100多道脉冲高度分析仪的荧光屏上,同时把测定的信号贮存在Cromemco-2 D计算机的磁带上,脱机进行分析处理(见讨论和结果部分)。

结 果 与 讨 论

1. CHO-K 1细胞株的流式核型如(图1 A)所示,可见十个分辨得很清晰的峰,峰间谷没有降到基线是由于连续的本底[由非特异荧光、特别小的荧光碎片(debris)和染色体碎片组成]叠加在染色体信号上的结果。用计算机减去指数分布的本底信号(图1 B)后,得到基本上没有本底的流式核型(图1 C)。图中横坐标代表相对DNA含量,纵坐标代表染色体相对数目。由于同号的各个染色体的DNA含量有一定的差异(即离散程度)和仪器的分辨率等原因,使各个峰有一定的阔度。同号染色体的数目以一定DNA范围内峰高的积分即此峰所包括的面积计算。

2. 用正态函数经计算机拟合图1 C的1,

* 本工作得到中国科学院基金资助。

** 1979年北师大生物系毕业生。

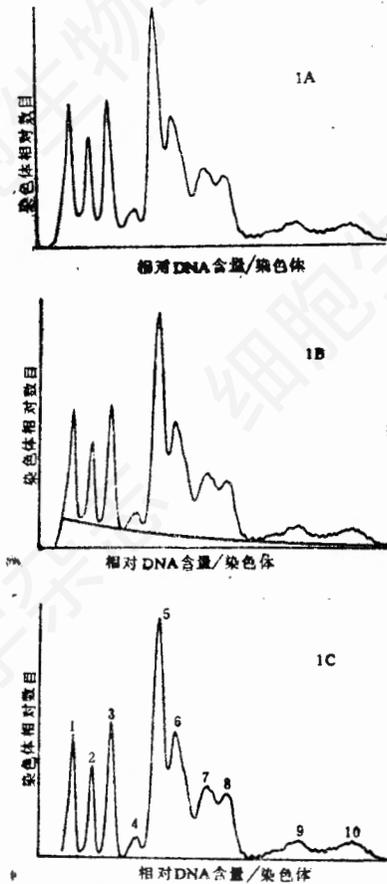


图1 计算机绘制的 CHO-K1 流式核型

- A. 未减去本底前
- B. 所减去的指数分布的连续本底
- C. 减去本底的流式核型

表2 CHO-K1 流式核型各峰相对位置的比较

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
本实验	1	1.58	2.13	2.92	3.54	4.04	5.00	5.58	7.75	9.33
Sillar 和 Young	1	1.48	2.13	3.06	3.56	4.35	5.00	5.60	7.88	9.68

(以峰1在多道脉冲高度分析器上的道数为1)

用本方法制备染色体悬浮液具有方法简单、节省时间的优点，并且以上结果表明本方法可使峰的相对 DNA 含量平均值得到较精确的结果，但对峰的宽度和面积产生一定的误差。所以在样品的制备、仪器的测定和曲线拟合等方面还有待进一步改进。

参 考 文 献

[1] Carrano A. V., et al., in "Flow Cytometry

2 和 3 峰，计算峰的变异系数(CV 值)和染色体所占的信号百分比，并与 Sillar 和 Young^[6] 用多胺——毛地黄皂苷方法制备的染色体样品所测定的 CHO-K1 的结果进行比较(表1)。

表1 用高斯分布计算 CHO-K1 流式核型峰 1,2 和 3 的变异系数(CV 值)和染色体所占的信号百分比

	峰	CV 值(%)	染色体所占的信号百分比(%)
本实验	1	7.6	61.9
	2	4.5	54.4
	3	4.4	64.0
Sillar 和 Young	1	2.99	80.8
	2	3.09	79.9
	3	3.02	79.2

由表1中可见本结果在染色体峰的分辨率和染色体所占的信号百分比上不如 Sillar 和 Young 的结果。其原因是样品的制备和仪器的分辨率还存在一定的问题。另外也与染色体的破碎、仪器的 CV 值(我们仅调到3%)还不够低有关。

3. CHO-K1 流式核型各个峰 DNA 平均值相对位置的比较(表2)

由表2可见本结果与 Sillar 和 Young 的结果基本一致，说明二者都为 CHO-K1 细胞。

and Sorting" P 421—452 eds M. R. Melamed, P. F. Mullaney & M. L. Mendelsohn John Wiley & Sons. N. Y. Chichester, Brisbane. Toronto.

[2] Gray J. W. et al., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 1231—1234.

[3] Stubblefield E. et al., 1975, *Exp. Cell Res.*

美国 Lawrence Livermore 国家实验室 J. Gray 博士在本工作中曾给予大力帮助表示感谢!

94: 464—468.

[4] Langlois R. G. et al., 1980, *Chromosoma* 77: 229—251.

[5] Atten J. et al., 1980, in "Flow Cytometry

IV" pp 287—292 eds O. D. Laerum et al: Universitetsforlaget Bergen-Oslo-Tromsø.

[6] Sillar, R. & B. D. Young., 1981 *J. Histo. and Cytochem.* 29: 74—78.

FPR 实验结果的计算机分析

徐成汤 张孔华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自 1976 年 Axelrod 等人^[1]首先建立了荧光漂白恢复(简称 FPR)理论以来,该理论已被广泛用于研究细胞膜中脂类和蛋白质的侧向运动^[2,3]。我们实验室于 1980 年建立了 FPR 实验装置^[4],并测定了鼻咽癌细胞膜表面受体的扩散系数^[5],和研究了林蛙卵表面受体的运动方式^[6,7]。在数据处理过程中,感到漂白后的初始荧光强度 $F_k(0)$ 、漂白后荧光恢复的渐近值 $F_k(\infty)$ 以及漂白参量 K 的不确定性均会增加实验结果计算的误差。Yguerabide^[8]首先注意到了这一问题,提出了减小计算误差的线性化方法。并指出,对于高斯分布光束,在荧光恢复是单一扩散(无流动)时,在一定的条件下,倒易函数(reciprocal function) $R(t) = F_k(\infty) / [F_k(\infty) - F_k(t)]$ 和时间 t 的关系非常接近于直线,且该直线的截距与斜率之比等于荧光恢复到全部恢复值 $F_k(\infty)$ 的一半所需的时间 $\tau_{1/2}$; 扩散系数 D 可以通过 $D = \beta\omega^2 / 4 \tau_{1/2}$ 来求得(其中 β 是一个限定参数、 ω 是聚焦激光束的有效半径)。Van Zoelen 等人^[9]又在他的基础上指出,可以用一个参考荧光强度 $F_{R,t}$ 来代替 $F_k(\infty)$,从而消除了 $F_k(\infty)$ 不确定性的影响。

我们在数据处理时采用了多元非线性优化法,对 $F_k(\infty)$ 、 K 和 τ_D 进行拟合。这样不仅提高了数据处理的精度,而且在实验中毋需测量 $F_k(0)$ 和 $F_k(\infty)$ (事实上是测量不到的),从而能缩短测量时间,降低对实验装置的要求。本文通过对理论模拟函数、甘油薄层实验数据以及林蛙卵细胞膜实验数据的拟合处理,表明了这一数据处理方法的实用性。

原理和方法

关于 FPR 实验方法的理论在此不予赘述,详情可参阅文献[1]。对于激光光束为高斯分布的单一纯扩散过程,荧光强度的恢复和时间 t 的关系由下式给出^[1]

$$F_k(t) = F_i \sum_{n=0}^{\infty} [(-K)^n / n!] [1 + n(1 + 2t/\tau_D)]^{-1} \quad (1)$$

其中, $\tau_D = \omega^2 / 4 D$, 是特征扩散时间

ω : 激光光束的强度降到中心强度 $1/e^2$ 处的半宽

D : 荧光标记分子的侧向扩散系数

F_i : 漂白前的原始荧光强度

K : 漂白参量, 它和剩余荧光率 η 有关, 又和漂白后的初始荧光强度 $F_k(0)$ 有关

$$\eta = F_k(0) / F_i = (1 - e^{-K}) / K \quad (2)$$

对于荧光不能完全恢复的情况: 假设激光束对荧光标记分子的可动组分和不动组分都具有相同的漂白率, 则 $F_k(t)$ 可由下式表示