

本产理光(Ricon)相机,其镜头焦距为50毫米,相对孔径1:2,在两个镜头之间用自制的金属环连接起来。自制的金属环(铝环)高9毫米、内径45毫米,外径一端为53毫米,另一端为52毫米。在铝环的外侧两端套好丝扣,便可将两个镜头连接在一起了。在许多可供选择的高反差胶片中,我们使用的是燃化部第一胶片厂生产的黑白电影正片。使用时于暗房内(远离红灯)剪下所需长度,装入暗盒。

拍照时把欲制成幻灯片的电镜底片放入放大机的底片夹中。底片夹上如有可供选择调节的活动挡片则更好,这样可适用于不同尺寸的底片,如没有这种活动挡片,可用黑纸挖成与电镜底片大小一致的孔洞,以使电镜底片上的全貌都能拍照下来,并挡住电镜底片周围未曝光的透明部位。按动快门前,通过相机上的取景器进行观察,调节放大机上右侧的细调旋钮,从而改变了镜头与电镜底片之间的距离,可以对视野的大小进行取舍和聚焦。如要剪切掉电镜底片上不需要的部位,可以移动片夹中的电镜底片。为了获得较为正确的曝光值,可以采用下述方法:通过相机上内装式曝光表测得光强度,进行正确曝光;也可以通过试验一个胶卷,用正负两档光圈和不同的快门速度拍照几张底片,经冲洗后检查那种光圈和速度最为合适。我们

使用的是5.6光圈,速度为1/30,对于灰度适中的电镜底片,都能得到较为满意的幻灯片。

在18—20℃温度下,用D-72显影液(稀释一倍)显影5分钟(在远离红灯下进行否则幻灯片发灰)。如用罐洗则不存在这个问题。显影后用水漂洗两遍,在F-5定影液中定影5分钟,然后放入流水中冲洗15分钟,最后把从流水中捞出的片子放入蒸馏水盘中漂洗一下,以防干燥后幻灯片上形成水痕而不易擦去。用细粒海绵吸去片子上的水滴,于空气中干燥。如要想使片子更快干燥,在水中冲洗完毕后,放入乙醇内漂洗一下,这样片子会干燥得更快些。

如有条件可在放大机和照相机之间加一个波纹箱,相机用变焦镜头(F70—150毫米),这样不但能拍照较大视野(80毫米×120毫米),也可用变焦镜头将视野中的某一局部视野拉近拍照。

总之,上述方法利用一般电镜室所具备的条件,按照放大机和照相机镜头螺口的尺寸,自制一个金属环,将两者连接起来,把各部分的位置调节好,进行拍照,就可将电镜负片制成幻灯正片。这种操作方法非但时间大大缩短,而且基本上不会丢失原底片上的细节而获得色调良好的幻灯片。该方法不仅限于制作电镜底片的幻灯片,也适用于其他底片制作幻灯片。

基础知识

染色体提前凝集技术及其应用

杨佩满

(大连医学院组胚教研室)

染色体提前凝集(Premature Chromosome Condensation),简称PCC,是近十几年来在细胞融合和染色体技术的基础上发展起来的一种新技术。PCC的概念是Johnson和Rao于1970年根据其实验结果提出来的^[1]。他们认为,PCC就是分裂期细胞与间期细胞融合后,使间期核染色质提前在间期内凝集成染色体的现象。这种提前凝集的染色体称为PC染色体

(Prematurely Condensed Chromosome)。1977年Lau^[2]用化学融合剂聚乙二醇(Polyethylene Glycol)代替仙台病毒,获得了大量的融合细胞,简化了操作,使这项技术逐渐得到广泛应用。

诱导PCC的过程和机理

诱导PCC,一般分两步进行。第一步是间期细胞和分裂细胞融合,形成有间期核、分裂

期核的多核细胞。第二步是在多核细胞内, 间期核染色质在分裂期细胞成分的诱导下凝集成 PC 染色体。

一、细胞融合

无论是体内的细胞, 还是体外培养细胞均可自发地产生细胞融合现象, 但要获得大量的融合细胞, 必须要有融合剂的帮助。融合剂的种类很多, 一般可分为生物性和化学性两种, 前者主要有日本仙台病毒, 鸡新城疫病毒等病毒类以及一些生物提取物, 而后者主要包括聚乙二醇, 溶血卵磷脂^[3]、咖啡因^[4]等。

关于细胞融合的过程及其发生机制目前尚不完全清楚。通过电镜的连续观察^[3], 推测其融合过程可能与细胞吞噬病毒的过程相似, 一般分为四步进行。1. 细胞凝集。在细胞悬液中加入病毒后立即固定, 超薄切片, 电镜观察, 可见两个或两个以上的细胞互相聚集, 聚集的细胞之间有大量的病毒颗粒粘着。2. 凝集的细胞之间膜与膜的接触部位膜脂微球化 (micellization)。即由于胞质微丝的作用, 与同一病毒接触的两个细胞的质膜均包绕病毒, 形成一个共同吞噬病毒的姿态, 使凝集的细胞膜更加贴近。在分子水平上, 该处质膜中的糖蛋白向病毒附着处流动, 质膜的脂双分子层重新排列形成微球 (micell)。3. 质膜微球减少, 相邻的质膜开始互相融合, 微球之间可有部分膜的界限打通。此时病毒被两个细胞的质膜包绕更紧。4. 打通膜的界限, 形成胞质通道。病毒颗粒被凝集的细胞共同吞噬, 中间膜的界限被打通, 进而融合成一个多核细胞。

细胞融合的过程是一个复杂的过程, 很多因素可以影响融合过程。主要的影响因素有:

1. 细胞种类对融合的影响。微绒毛丰富的细胞较微绒毛少的细胞易融合。同种细胞之间较异种细胞之间易融合^[5]。
2. 钙离子对细胞凝集及融合均很必要。用 EDTA 除去培养液中的钙离子, 则细胞不发生融合现象, 但钙离子浓度过高亦不利于融合^[6]。
3. pH 的影响, 一般认为高 pH 有利于细胞融合, 用 PEG 作融合

剂, pH 在 7.6—8.0 比较合适^[7]。4. 能量的供应, 融合的过程是细胞膜做功的过程, 故必须要有足够的 ATP 供应才有利于融合^[3]。

二、诱导 PCC

分裂期细胞与间期细胞融合后, 其中的分裂期细胞部分就开始诱导间期核染色质浓集成染色体。关于诱导的机制主要有两种观点, 即细胞质诱导和染色体诱导的观点。细胞质诱导的观点认为^[8]主要是分裂期细胞质中某些因子的诱导作用, 用蛋白质合成抑制剂如嘌呤霉素和放线菌素酮等, 抑制细胞 G₂ 期蛋白质的合成则细胞不能进入 M 期, 说明在 M 期细胞质内有一种促染色体凝集因子, 这种因子可能是一种蛋白质。这种蛋白质似无种属特异性。染色体诱导的观点认为, 诱导 PCC 的因子在染色体。用分离出来的纯的活染色体可以诱导 PCC^[14]。Johnson 等提出诱导 PCC 与有丝分裂的启动极为相似, 多胺、二价阳离子等带正电荷的物质可能与染色质上的特异位点结合, 促使染色质浓集成 PC 染色体^[9]。

PCC 一般从细胞融合后 10 分钟开始, 40~60 分钟到达高峰, 以后, 由于大量的分裂期细胞进入 G₁ 期失去诱导作用而逐渐下降^[3]。

三、PC 染色体的形态学特点

1. G₁-PC 染色体 呈细长、着色浅的染色单体细丝, 随着细胞从 G₁ 期向 S 期前进, G₁-PC 染色体亦愈加伸长, G₁ 与 S 期交界处, 很类似于 S 期 PC 染色体, 但用 ³H-TdR 标记, 该 PC 染色体无标记银颗粒, 故又称为 S 样 G₁-PC 染色体。据根染色体伸长的程度, 可将 G₁ 期分为早、中、晚三个期。

2. S-PC 染色体 呈粉末状、不规则的染色体断片, 用 ³H-TdR 标记, 在染色体断片之间有银颗粒分布, 说明断片之间的间隙可能是 DNA 复制的部位。

3. G₂-PC 染色体 经过 S 期 DNA 的复制, G₂ 期每个 PC 染色体是由二个单体组成, 类似于 M 期染色体, 但更细长, 着色更浅。

G₁、S、G₂ 期 PC 染色体的形态学特点,

正反映了DNA从G₁期解螺旋到S期高度解螺旋,进行DNA复制;从S期经G₂期DNA链螺旋化,到M期呈高度螺旋化状态准备分裂这样一个周期性增殖变化的规律特点。

PCC技术的应用

一、PCC技术的主要贡献

由于PCC技术主要是显示间期PC染色体的形态,突破了传统的染色体的概念,因此,大大丰富了染色体的研究内容。

1. 可以直接观察间期染色体的形态,根据其形态特点可以确定该细胞在细胞周期中的位置。

2. 便于研究G₁、S、G₂期PC染色体的分子结构。

3. 由于G₁、G₂期PC染色体细长,因而进行分带染色可以得到比M期染色体更详细的带型结构。

4. 可以确定药物及射线等致染色体损伤,以及药物杀伤细胞的具体周期时相,并可连续观察损伤的修复或发展的过程,用以指导临床制定更合理的治疗方案。

5. 为细胞动力学的研究提供了新手段。目前常用的测定细胞周期的方法,主要有³H-TdR标记法、细胞显微分光光度法、姊妹染色单体差别染色法等。这些方法仅能把细胞周期分为G₁、S、G₂和M期,而PCC技术还能将G₁期进一步分为早、中、晚三期。有的作者甚至将G₁期分为六期。这就可以更精确细致地研究细胞在各周期时相中发生的事件及其调控机制。

6. 通过不同时相细胞之间的相互融合,可以研究细胞在增殖周期中前进的诱导机制。如M期细胞和间期细胞融合,M期细胞可以诱导间期细胞提前进入M期。同样,用S期细胞与G₁期细胞融合,S期细胞亦可诱导G₁期细胞提前进入S期。

二、PCC技术的应用概况

1. 在实验肿瘤研究方面 近年来出现的

抗癌药物的作用,大部分与药物的致染色体损伤有关。已知不少抗药如博莱霉素、争光霉素、阿霉素等均为周期时相特异性杀伤药物,可引起细胞的G₂期积累。而用PCC技术就可以在药物作用后立即直接显示出PC染色体有无损伤,并可确定其杀伤的具体时相及其损伤、修复之间的时间关系。

(1) 对国产抗癌药争光霉素和三尖杉酯碱的研究 争光霉素是国产的一种有效抗癌抗生素。已经知道,该药可以与DNA特异性结合,使细胞阻断在G₂期。但是,争光霉素为什么引起G₂期阻断?它对间期细胞各时相PC染色体的作用如何?过去由于研究方法的限制,了解甚少。我们用CHO细胞作实验材料,用PCC技术观察争光霉素对PC染色体的损伤作用^[7]。用不同剂量的争光霉素处理CHO细胞,然后与同步化M期CHO细胞融合诱导PCC,结果发现争光霉素对CHO细胞G₂-PC染色体有明显的损伤作用,其损伤作用与药物剂量呈依赖关系。这就提示了该药引起的G₂期阻断,可能是由于G₂-PC染色体损伤所致。

潘维林等用PCC技术研究了国产新药三尖杉酯碱的抗癌机制,结果发现该药对CHO细胞G₂-PC染色体损伤显著,并和药物剂量有正的相关性,药物浓度为2微克/毫升时还可见到G₁-PC染色体有裂隙和碎裂等损伤。

(2) 对博莱霉素的研究 Hittlman、Rao于1974年用PCC技术证明该药引起CHO细胞G₂-PC染色体的损伤较M期高5—9倍,如除去药物作用继续孵育4小时(让受药物作用的G₂期细胞进入M期),制备染色体,则损伤率大减,说明药物致G₂-PC染色体的损伤到达M期后相当一部分可以修复^[10]。

(3) 研究多胺对正常及转化细胞的影响 很多研究者证明多胺与正常及转化细胞增殖和死亡过程有密切关系。Sunkara等^[11]用甲基乙二醛鸟嘌呤(methylglyoxal bis-(guanyl-hydrazone)]处理正常细胞和转化细胞,使这些细胞内多胺含量减少,此时制备PCC,可发

现正常细胞阻断在早G₁期,而转化细胞则多数阻断在S期,并发现在S-PC染色体中DNA复制位点数量明显减少,说明多胺对DNA复制的启动有重要作用。

2. 在细胞动力学研究方面 用PCC进行细胞周期分析,就是根据PC染色体的形态辨认G₁、S、G₂各期的细胞,计算出各周期时相的细胞比例及其所经历的时间。除此以外,PCC技术还可将G₁期再分为早、中、晚三个期,这为准确细致地分析药物作用时相提供了新的工具。薛绍白和Rao用PCC技术研究丁酸钠对细胞的阻断作用(未发表资料)。以前的研究已经知道,丁酸钠作实验室中对培养的动物细胞形态学、生长率以及基因表达等均有明显作用,它还可使细胞周期延长,使细胞阻断在G₁期。Darzynkiewicz等1981年用流式细胞分光光度法进一步证明了丁酸钠可把L₁₂₁₀白血病细胞阻断在早G₁期。薛氏等试图用PCC技术验证Darzynkiewicz的结论,同时反证PCC技术在更精确测定细胞周期时相中的可靠性。作者用HeLa细胞作材料,经丁酸钠处理后立即制备染色体,计算早G₁、中G₁、晚G₁、S、G₂期细胞占总数的百分率,结果证明丁酸钠可使HeLa细胞阻断在早G₁期,这一结论与Darzynkiewicz的结果一致。

3. 在临床研究方面 Hittelman^[13]等人从1979年以来,开始把PCC技术应用于临床实践中,判断和预测白血病诱导缓解治疗的效果。他们选21例经诱导缓解治疗的急性粒细胞白血病病人,采集骨髓有核细胞与同步化在M期的CHO细胞融合。诱导PCC,确定骨髓细胞增殖潜能指数(Proliferative Potential Index,简称PPI),即晚G₁-PC染色体占G₁-PC染色体总数的百分率。作者把PPI参数与诱导缓解治疗期间的临床症状、骨髓象变化进行比较,结果发现,有6例临床症状不缓解但PPI低的病人经治疗后5例很快缓解;有4例临床症状已缓解但PPI高的病人,3例经治疗部分缓解或不缓解;7例临床不缓解,骨髓细胞>

10%,而PPI低者,最后全部缓解;4例临床不缓解处于进展期的病人,PPI高,其中2例最后恶化。从这一结果可见,PPI参数有预测病人在缓解诱导治疗期间病情是否真正缓解的作用。

4. 在放射医学中的应用 PCC技术可以用来观察X线引起的染色体损伤及其修复情况。放射线引起染色体损伤早已为人们所知道,但到底损伤哪一时相的染色体,这些损伤随着细胞在周期中前进发生一些什么变化等问题却不知道。Hittelman 1974年^[3]用PCC方法观察X线的致突变作用,发现X线可引起G₁、G₂、M期染色体损伤,G₁期PC染色体损伤大于M期,如果受照射细胞在融合处理前预先培育2小时,PC染色体断裂明显减少,表明断裂的染色体在融合前的培育中得到了再连接。

参 考 文 献

- [1] Johnson, R.T., Rao, P. N.: 1970, *Nature (London)* 226:717.
- [2] Lau, Y. F, et al., 1977, *Exp Cell Res* 110 (1):57.
- [3] Nils, R., Ringertz, Robert, E. Savage: 1976, *Cell Hybrids* P47,35-36,52,59,76,84.
- [4] John, J, Wille, Jr:1980, *J Cell Biology*, 87, 2.
- [5] Harris, H.著, 严绍颀译: 1975, 细胞杂交, p4.
- [6] 冈田善雄著, 杨畔农译: 1974, 细胞融合, p28.
- [7] 杨佩满、王端顺、王永潮: 1982, 争光霉素对CHO细胞G₂-PC染色体及M期染色体畸变的影响, 中华医学会全国肿瘤基础理论专题学术会议论文选编 p192.
- [8] Watsui, S. et al: 1971, *J. Nat. Cancer inst.* 47:401.
- [9] Rao, P. N., Johnson, R. T.: 1971, *J Cell Physiol.* 78:217.
- [10] Hittelman, W. N. & Rao, P. N:1974, *Cancer Res.* 34:3433.
- [11] Sunkara, P. S. et al., 1979, *J Cell Physiol.* 98(3):451.
- [12] Hittelman, W. N. et al., 1980, *Blood*, 55, 3.
- [13] 陆荣华、陈瑞铭: 1980, 人体肝癌细胞中期染色体的分离纯化, 细胞生物学杂志, 4.
- [14] 潘维林、王端顺、王永潮: 1982, 用早熟染色体浓集法和同步化细胞克隆培养法研究三尖杉酯碱对CHO细胞的杀伤动力学, 中华医学会全国肿瘤基础理论专题学术会议论文选编, p195.