

激光微束显微切割植物染色体的研究

王兰岚 陈仲康 黄力全 宋桂英 徐正平 梁宏

(中国科学院遗传研究所, 100101)

Study on laser micro-dissection of chromosome in plants

Wang Lanlan, Lu Zhongkang, Huang Liqun,

Song Guiying, Xu Zhengping, Liang Hong

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

Abstract: Chromosome samples were prepared from dividing cells of root tops of broad bean, maize, wheat, and barley, etc. by means of aquash method. Micro-dissection of chromosome was performed on the microscopic stage using argon laser microirradiation (514.5 nm). The chromosomes could be dissected into 12, 6~9, 6 and 4~6 chromosomal fractions respectively while the suitable laser power densities were applied. The establishment of laser micro-dissection of chromosome in plants provides the possibility of the application of laser microbeam irradiation in chromosome engineering, assignment of genes, and DNA micro-cloning from chromosomal fragment in cros.

Key words: Ar⁺ laser, chromosomes, broad bean

激光微束是六十年代激光技术问世后在生物学和医学领域中出现的一项新技术。该技术利用激光方向性好、光色单一和亮度高等独一无二的特点,把激光束通过光路系统引入显微镜并聚焦成很小的光点对细胞或细胞器进行精细的细胞或亚细胞水平的显微外科手术。染色体是细胞核里一种极重要的结构。每一种真核生物都有一定数目的染色体;每条染色体上都有排列次序一定的基因。任何染色体数目的变化和染色体上基因排列次序的变化,都会引起生物遗传性的变异。激光微束遗传操作真核生物染色体是激光生物学中重要和活跃的研究课题。Berns等^[1~3]以两栖类和哺乳动物细胞为材料进行了激光显微照射染色体及其子细胞遗传分析的大量研究。梁宏等^[4]用氩离子激光显微切割长鼻鼯培养细胞有丝分裂染色体或使受照染色体区域DNA失活都取得了成功。Monajembashi和Oremer^[5]建立了用激光微束显微切割人淋巴细胞染色体的技术。本文报道用激光微束切割高等植物染色体的实验结果,其目的是建立起对农作物染色体进行激光遗传操作的有效技术方法。

一、材料和方法

本研究选用了蚕豆、玉米、小麦、大麦等多种农作物为实验材料。

染色体样品制备:选取上述农作物的饱满种子浸泡在盛有自来水的烧杯中置于25°C条件

下过夜。次日将种子捞出,放入铺有双层纱布的培养皿中水培(小麦、大麦等小粒种子)或砂培(蚕豆、玉米等大粒种子),并置于 25°C 条件下保温培养。当胚根长到 1.5~3 cm 时,用水洗净,切取 2~3 mm 长的根尖放入盛有蒸馏水的小瓶内,放置在 4°C 冰箱中处理 20~24 小时,然后用 Carnoy 液固定 3 小时,洗去固定液后用 2.5% 的纤维素酶和果胶酶等量混合液在 25°C 条件下酶解 3~4 小时,最后放在 70% 的酒精里保存。制片时将酶解过的根尖用镊子挑取到载玻片上,加一滴 45% 的冰醋酸,加盖玻片,用姆指适当用力压片,随即进行镜检。本制片方法与常规植物根尖染色体制片方法基本相同,但减去了染色步骤,其目的为保持染色体上核酸的活性。

激光显微切割。本实验使用 YW-1 型氩离子激光显微仪。激光器多模输出功率 6 W,连续可调。瞄准光和脉冲光来自同一激光器。激光器可发射 514.5 nm 或 488.0 nm 两种波长的光。激光束引入一台 Amplival 相差显微镜。激光经中性滤色镜到达匹配透镜,进行第一次聚焦。聚焦后的激光再经干涉滤色镜向下反射,最后由物镜聚焦到生物样品。我们在实验室中使用了 514.5 nm 绿色激光,用 100× 油浸相差物镜聚焦。YW-1 型氩离子激光显微仪的记录部件除配备有电视摄像机和录像设备外,还备有 35 mm 照相机。实验过程中可将激光切割染色体的全过程录像,或将重要的切割图像进行显微摄影。

二、实验结果

将制备好的染色体样品制片置于激光显微仪的显微镜台上,先用 20× 相差物镜找到所需要的上述几种植物根尖细胞的有丝分裂相。然后转换到 100× 油浸物镜,通过目镜内十字线瞄准好欲照射染色体的靶体部位发射激光进行切割。经反复实验,用本仪器切割植物染色体,当使用脉宽为 0.01~0.02 s,样品损伤光斑直径为 0.5 μm,样品表面功率大约为 0.13~0.16 W 时,能取得较好的切割效果。当激光的功率密度超过这个范围时,受照射的染色体浓缩或被打散,这显然是因为激光能量太大而损伤了整条染色体。同时,如果激光能量太小,则不能切割染色体,甚至见不到照射部位有任何可见的变化。

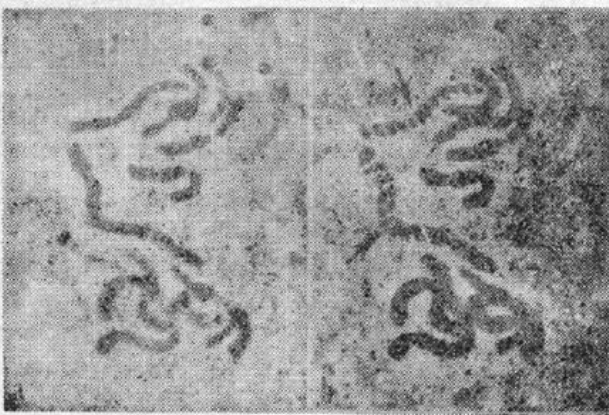


Fig.1 Chromosomes of broad bean
(a) before laser microirradiation; (b) after irradiation, the chromosomal fractions were dissected by laser microirradiation and indicated by arrows



Fig.2 Chromosomes of wheat
(a) before laser microirradiation; (b) after irradiation, the chromosomal fractions were dissected by laser microirradiation and indicated by arrows

实验结果表明,对蚕豆、小麦的染色体靶体部位连续发射 3~5 个脉冲,对玉米、大麦的染色体连续发射 4~5 个脉冲,即可对它们分别切割下一个染色体片断。每条染色体切割的片段数主要取决于该染色体本身的长度。例如,蚕豆的 M 染色体经激光显微照射后可切割成 12 段染色体片断(图 1),小麦染色体可切割成 6~9 段染色体片断(图 2),玉米染色体可切割成 6 段染色体片断(图 3),大麦染色体可切割成 4~6 段染色体片断(图 4)。本实验结果建立了激光显微切割高等植物染色体的技术,这为进一步把这一技术应用于植物染色体工程、基因定位及植物染色体片段 DNA 克隆提供了可能性。

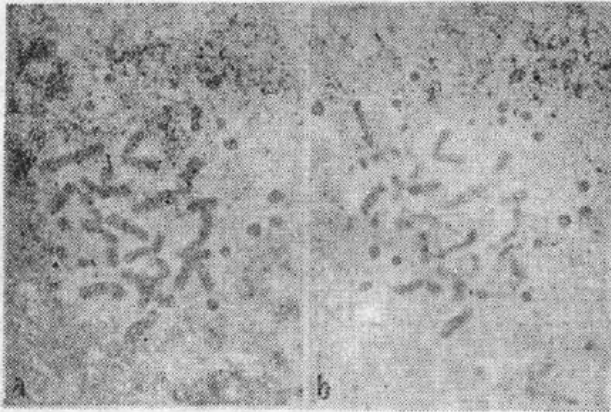


Fig.3 Chromosomes of maize

(a) before laser microirradiation; (b) after irradiation, the chromosomal fractions were dissected by laser microirradiation and indicated by an arrow



Fig.4 Chromosomes of barley

(a) before laser microirradiation; (b) after irradiation, the chromosomal fractions were dissected by laser microirradiation and indicated by an arrow

三、讨 论

许多年来植物细胞遗传学通过连锁研究已经查明某些基因在染色体组中某条染色体上的大致位置。但截至目前人们对这些基因及其基因产物却仍然很不清楚。当前分离某个基因或该基因附近的标记顺序是使用从整个染色体组或一批经过分组的各别染色体所建立的基因文库。近年来 Scalenghe^[6], Rohme^[7] 和 Fisher^[8] 等一些学者尝试了用机械显微切割果蝇、小鼠等染色体片断,然后用微克隆技术建立了该染色体片断的基因文库。预期显微切割染色体和微克隆技术的建立将大大帮助人们对重要遗传位点进行分离和鉴定。微克隆的发展进一步要求能对特定染色体进行更细巧的显微切割。Monajembashi 等^[5] 的实验结果表明,用准分子激光泵浦染料激光的微束系统显微切割人淋巴细胞染色体效果良好。我们用氩离子激光微束显微切割蚕豆、小麦、玉米、大麦等高等植物的染色体也取得了成功。激光切割染色体具有定位准确、切割细致、操作简便等机械显微操作所没有的优点。但需要指出的是我们所用的激光微束系统脉宽较长,不能排除瞬间局部热效应所造成的切割口附近 DNA 顺序的破坏。

近年来由于植物细胞的全能性及其应用潜力大大推动了植物细胞体外培养和细胞工程的迅猛进展。因此,可以设想激光显微切割染色体技术不仅可以与染色体片断微克隆相结合应用于植物中某些重要基因的分离和鉴定,还可以同细胞体外培养相结合,应用于培养细胞染色体的遗传操作,如研究染色体上某特定区段的基因失活和基因定位等。

参 考 文 献

- 1 M. W. Berns *et al.*, *Nature*, **221**, 74(1969)
- 2 M. W. Berns *et al.*, *Science*, **186**, 700(1974)
- 3 H. Liang *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **144**, 234(1983)
- 4 梁 宏 *et al.*, *中国激光*, **13**, 132(1986)
- 5 S. Monajembashi *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **167**, 262(1986)
- 6 F. Scalenghe *et al.*, *Chromosoma*, **82**, 205(1981)
- 7 D. Rohme *et al.*, *Cell*, **36**, 783(1984)
- 8 E. M. G. Fisher *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5846(1985)

(收稿日期: 1989年3月21日)

HPD 加激光对细胞周期中不同时期 Hela 细胞的杀伤作用的比较

蒋如朗 梁 宏

(中国科学院遗传研究所, 100101)

A comparative study of cell killing effect on different stages of cell cycle in Hela by HPD plus laser irradiation

Jiang Rulang, Liang Hong

(Institute of Genetics, Academia, Sinica Beijing)

Abstract: Human cervix Hela cells were synchronized, collected and seeded into Rose chambers for experiment. Cells at G_1 , S and G_2 stages were then treated in the medium with hematoporphyrin (HPD) and irradiated by a laser microbeam at 632.8 nm. It was found that in case of the occurrence of primary and significant visible damage, cells at S stage showed the earliest, G_2 stage the next, and G_1 stage the latest. Variance analysis demonstrated that the variations are statistically significant.

Key words: photodynamic therapy, laser microirradiation, HPD, cell cycle, Hela

血卟啉衍生物(HPD)因其独特的自发荧光和光毒作用以及能选择性地滞留于癌细胞中,而被作为光敏药物应用于癌症的临床诊断和治疗,至今已发展成肿瘤光动力学治疗这一新领域^[1,2]。大量临床治疗的结果表明,HPD-光动力学疗法具有定位准确、对肿瘤杀伤力强、同时对周围组织损伤小的优点^[3]。

人们已知辐射、高热和某些化疗药物等的作用皆受细胞周期的影响。Christensen等^[4]研究了体外培养的NH1K 3025细胞在细胞周期不同时期对血卟啉光敏作用的敏感性差异,发现各时期细胞对光敏作用的敏感性差异很大,王代树等^[5,6]也对MG3-803胃癌细胞进行了类