

Nd·YAG 激光微束切割大麦染色体及 染色体片段的分离*

王 槐 宋桂英 王兰岚 胡赞民 陈正华
(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

提要 以适当参数的 Nd·YAG 激光微束切割大麦 7H 染色体后再利用微细玻璃针挑取了 7HS 端部片段并放入 Eppendorf 管中, 建立了一种激光微束与玻璃针结合使用微切割、微分离植物染色体片段的方法, 为今后植物染色体特定区域 DNA 的微克隆技术提供了一种新的方法。

关键词 大麦, 染色体微切割, Nd·YAG 激光微束

1 引 言

显微切割、分离特定染色体或染色体片段并建立相应染色体(片段)DNA 库对于基因组研究意义十分重大。激光微切割染色体操作方便、精细而准确, 因此自 Monajembashi 等用紫外激光切割人类染色体以来^[1], 激光微束微切割染色体已成为激光生物学中十分活跃的研究课题, 但切割后成功地进行染色体片段微分离及微克隆的报道目前多限于人类和动物材料^[2,3]。在植物方面, 王兰岚等曾用氩离子激光切割了小冰麦^[4]、蚕豆等^[5]的染色体, 但未能分离切割后的染色体片段; 日本学者 Fukui 等建立了氩离子激光微束切割并分离植物染色体片段的技术^[6], 但这种方法需要底部带有特殊薄膜的小皿, 费用高, 步骤也较为复杂。另外, 氩离子激光器脉冲持续时间长, 容易因局部热效应过高造成切口附近 DNA 较大的损伤。因此切割分离染色体的方法尚需进一步改进。

在本实验室已有的工作基础上^[4,7], 我们以大麦为材料, 探索出一条简便有效的用 Nd·YAG 激光微束切割植物染色体、借助玻璃针分离染色体片段的方法, 为大麦染色体片段 DNA 文库的构建奠定了基础, 对其它植物染色体特定区域的微切割、微分离也具有普遍的参考意义。

2 材料和方法

2.1 染色体标本的制备及激光微束切割

以大麦 (*Hordeum Vulgare* L.) “沪麦 6 号”为实验材料, 种子由中国科学院遗传研究所李义文博士馈赠。制备根尖染色体标本的过程基本参照李懋学等的方法^[8]。为保持核酸活性, 只

* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持课题。

在卡诺固定液中(甲醇·冰醋酸=3·1)处理5 min后便移入70%乙醇中。染色体用Giemsa染色并加盖玻片后,即可用于激光显微切割。

切割染色体所用的激光微束仪是由中国科学院遗传研究所与重庆京渝激光生物研究所共同研制的Nd·YAG激光细胞显微照射系统,能够发射4种波长的激光(分别为1.06 μm , 0.53 μm , 0.35 μm , 0.26 μm),输出激光微束的脉宽及能量也均可调,脉宽调节范围为10~15 ns,输出能量调节范围为2~50 mJ。激光器引入一台相差显微镜,激光微束可通过显微镜后聚焦到生物样品,能造成直径小于1 μm 的损伤;激光器还配有屏幕监视系统和照相机,可监视整个显微切割过程及拍照。

照射时将新制备的染色体标本片置于激光微束仪的显微载物台上,先在低倍镜下找到染色体长度适中、分散良好的分裂相,然后转换到100倍油镜下辨认出特定的染色体,并通过目镜内的十字线瞄准染色体待切割部位,调节好激光微束的脉宽、波长和能量后,发射脉冲切割染色体,整个切割过程通过屏幕监测。

2.2 染色体片段的显微分离

激光切割染色体后,液氮冰冻去盖片,稍气干后立即用于显微分离染色体片段。整个分离过程基本上参照胡赞民等^[7]的方法,略有改进。为了便于在高倍镜下操作,将Leitz显微操作器(Code-No. 933114)上原有的普通显微镜换成了倒置显微镜(Olympus 1M)。挑取时,先在15 \times (目镜)40 \times (物镜)明视野内找到目标染色体片段,再在上面加一滴超纯水,用玻璃针(尖部直径为1~3 μm ,向下弯曲120°,手工拉制)轻轻触动激光切割好的目标染色体片段,待其粘附到针上后,将玻璃针从水中缓慢抬起并同时旋转显微镜微调,使挑取的染色体片段始终处于视野中,直至离开液面;然后将粘有染色体片段的玻璃针尖折断于含有20 μL 蛋白酶K(5 ng/ μL , Sigma公司,1 \times T₄DNA连接酶缓冲液(Promega公司)配制)的0.5 mL Eppendorf管中,高速离心机(12 000 r/min)离心30 s, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

3 结果与讨论

大麦含有7对染色体,属中等大小类型,参照大麦的核型图^[8](图1)可以准确地辨认出6H和7H染色体。这两条染色体均带有随体,但是7号染色体与6号染色体相比稍长,臂比大、随

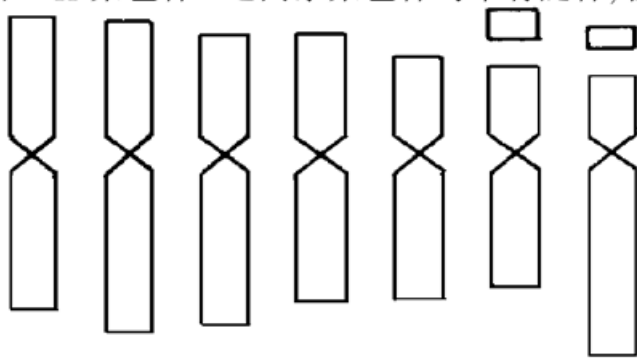


图1 大麦的核型模式图

Fig. 1 The karyotype of *Hordeum Vulgare* L.



图2 大麦根尖细胞有丝分裂前中期染色体($2n = 14$),箭头所示为6H,7H染色体(1 220 \times)

Fig. 2 Mitosis metaphase chromosomes of a root tip cell from *Hordeum Vulgare* L.

6H and 7H indicated by the arrows(1 220 \times)

体稍小,易于识别(图 2),故选择 7H 染色体作为切割目标。

经过反复实验表明,当激光输出波长为 $0.53\ \mu\text{m}$,脉宽为 $10\ \text{ns}$,输出能量大约为 $4\sim 10\ \text{mJ}$ 时,能取得较好的切割效果,样品损伤光斑直径可小于 $1\ \mu\text{m}$ 。当激光输出能量太低时,难以有效地切割染色体,甚至不能观察到损伤;而能量太大时,受照射的染色体往往被打散。我们采用上述参数,用手动控制对 7H 染色体发射激光微束脉冲,照射一个脉冲后可造成一个直径约为 $0.5\ \mu\text{m}$ 的损伤(图 3),发射激光时微调载片位置,结果 $4\sim 6$ 个脉冲后即可切断染色体,可按此法将一条染色体切为多段(图 4)。本研究使用的 Nd·YAG 激光细胞显微照射系统能以极短脉冲的形式(脉宽为 $10\sim 15\ \text{ns}$)发射激光,大大降低了热效应;另外选用偏离核酸光吸收峰值的长波长激光($0.53\ \mu\text{m}$)进行切割也有助于减小切口处的 DNA 损伤。由于使用激光微束进行切割,因此在染色体分裂相上面加盖玻片不会影响切割效果,盖玻片的存在不仅减少了切割过程中外源 DNA 分子的污染,而且为使用油镜更准确地识别目的染色体和定位切割靶点创造了条件。



图 3 对 7H 染色体短臂中部照射一个脉冲后造成的损伤,光斑直径约 $0.5\ \mu\text{m}$,箭头所示($1\ 220\times$)

Fig. 3 Damage of chromosome after one pulse of laser microirradiation, the diameter of the damaged area is about $0.5\ \mu\text{m}$, indicated by the arrow ($1\ 220\times$)

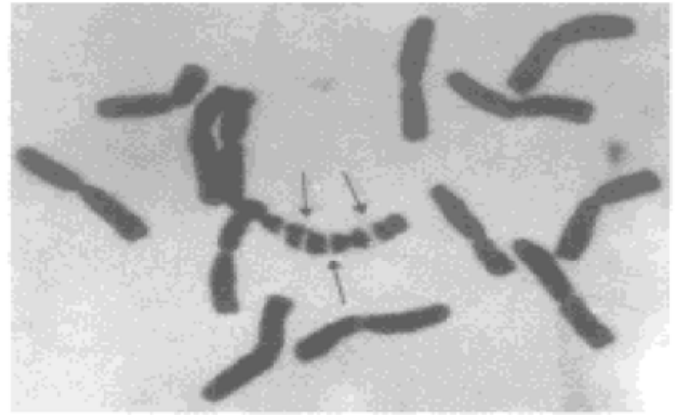


图 4 7H 染色体被 Nd·YAG 激光微束切为多段,箭头所示($1\ 220\times$)

Fig. 4 7H was dissected into many fragments by a Nd·YAG laser beam, indicated by the arrow ($1\ 220\times$)

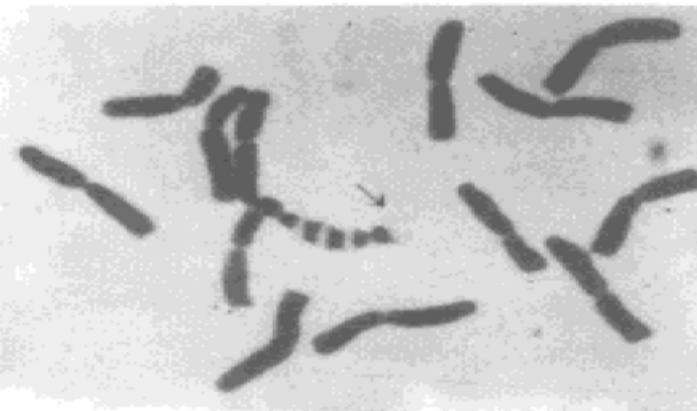


图 5 7HS 含随体染色体片段被玻璃针取走后的染色体分裂相,箭头所示为染色体片段移走区域($1\ 220\times$)

Fig. 5 Chromosomes after a fragment of 7H was removed, the position of the removed fragment is indicated the arrow ($1\ 220\times$)

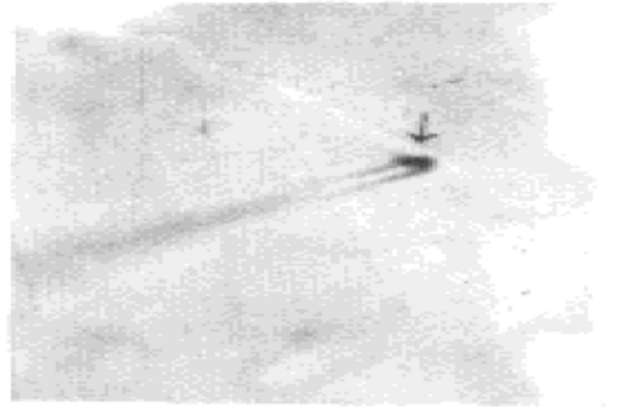


图 6 染色体片段粘附于玻璃针上($686\times$)

Fig. 6 The fragment was adhering on a glassneedle ($686\times$)

按照“材料与方法”中所述程序可用微细玻璃针将切割后的 7H 染色体带随体的端部放入含蛋白酶 K 的 Eppendorf 管中,图 6 为染色体片段粘附于玻璃针上的情形,图 5 为将 7H 短臂端部取走后的染色体分裂相。因为用玻璃针分离切割后的染色体片段,所以用价格较低的普通载玻片进行染色体制备即可达到要求。

本研究说明,将激光微束与玻璃针结合使用切割分离染色体不仅切割细致精确,而且费用较低,这为将来进行染色体特定区域的微切割、微克隆工作的深入展开奠定了基础。

致谢 感谢程祝宽博士与邓向东先生在实验中的指导帮助。

参 考 文 献

- 1 Monajembashi S., Cremer C., Cremer T. *et al.*. Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Expl. Cell. Res.*, 1986, **167**: 262~ 265
- 2 Ponlird N., Bautz E. K. F., Monajembashi S. *et al.*. Telomeric sequences derived from laser-microdissected polytene chromosomes. *Chromosoma*, 1989, **98**: 351~ 357
- 3 Hadano S., Watanabe M., Yokoi H. *et al.*. Laser microdissection and single unique primer PCR allow generation of regional chromosome DNA clones from a single human chromosome. *Genomics*, 1991, **11**: 364~ 373
- 4 Wang Lanlan, Song Guiying, Xu Zhengping *et al.*. Studies on the chromosome dissection of the Alien addition line wheat with chromosomes of Apropyron intermedium by laser microbeam. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1997, **24**(3): 238~ 240 (in Chinese)
- 5 Wang Lanlan, Lu Zhongkang, Huang Liquan *et al.*. Study on laser micro-dissection of chromosome in plants. *Chinese J. Lasers*(中国激光), 1991, **18**(4): 313~ 316 (in Chinese)
- 6 Fukui K., Minezawa M., Kamisugi Y. *et al.*. Microdissection of plant chromosomes by argon-ion laser beam. *Theor. Appl. Genet.*, 1992, **84**: 787~ 791
- 7 Hu Zanmin, Cui Lihua, Wang Lanlan *et al.*. Isolation of single chromosomes and chromosomal fragments of *Lilium regale*. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1997, **24**(3): 278~ 281 (in Chinese)
- 8 Li Maoxue, Zhang Zanping. *Chromosomes and Chromosome Research Techniques in Crops*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1996. 110~ 120 (in Chinese)

Microdissection of Chromosomes by a Nd ·YAG Laser Microbeam and Isolation of Chromosomal Fragments in *Hordeum Vulgare* L.

Wang Huai Song Guiying Wang Lanlan Hu Zanmin Chen Zhenghua
(*Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

Abstract A method for microdissection, isolation of chromosomal fragments using a laser beam incorporated with a microglassneedle was established. Firstly, a 7H chromosome of *Hordeum Vulgare* L. was dissected by the Nd ·YAG laser beam of suitable parameters; then the fragment comprising a satellite was isolated and put into an eppendorf tube by a micro-glassneedle fixed on a micromanipulator. This research provides a new method for the microdissection of special chromosomal regions.

Key words *Hordeum Vulgare* L., chromosome microdissection, Nd ·YAG laser microbeam