

# BUdR\* -Giemsa 显示姐妹染色单体分化染色法 对人类淋巴细胞周期的初步分析

田竞生 徐新来  
(北京市肿瘤防治研究所)

陈采琴 樊蓉 李玉环  
(中国科学院生物物理研究所)

## 前 言

姐妹染色单体互换最早为 Taylor<sup>[1,2]</sup> 在植物细胞中使用 <sup>3</sup>H-放射自显影技术时发现。近来, Latt<sup>[3]</sup> 提出用 BUdR-33258 Hoechst 荧光技术显示姐妹染色单体互换。Perry 与 Wolff<sup>[4,5]</sup> 改良了 Latt 的方法,他们用 Hoechst 荧光染色后,标本经可见光与热盐溶液处理,再经 Giemsa 分化染色,来弥补荧光很快消失,标本不易保存的缺陷。其后, Korenberg; Freedlender<sup>[6]</sup> 又进一步简化了 Perry 与 Wolff 的方法,可以不经 Hoechst 荧光染色和光照处理,标本直接置于 89°C 1.0M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液 (pH 8.0) 中,即能得到满意的染色单体分化染色。这些新技术的发展,克服了过去自显影技术中的粒子散射和乳胶颗粒大小的限制,建立起分辨力高、快速、恒定的染色技术。本文介绍人类外周血淋巴细胞姐妹染色单体分化染色技术,并对人类淋巴细胞周期作初步分析。

## 材 料 和 方 法

### 1. 人外周血淋巴细胞的培养与制片

从健康男女成年人静脉采血 1 毫升,肝素抗凝。每瓶培养基内含有 4 毫升 Eagle 培养液, 1 毫升小牛血清, 0.2 毫升植物血球凝集素 (PHA), 接种全血 8 滴 (6 号针头)。在 37°C 分别培养 48 小时和 72 小时。培养一开始就加 BUdR, 最终浓度为 10 微克/毫升。培养在完

全黑暗条件下进行。在培养结束前 3—4 小时加入秋水仙素,最终浓度为 0.16 微克/毫升。

制片过程如下:用吸管取出培养瓶中的细胞悬液,放在离心管中以每分钟 1000 转转速离心 10 分钟,用 0.075M KCl 低渗处理约 15 分钟,然后用新鲜配制的甲醇冰醋酸 (3:1) 固定。(其间更换三次固定液。)滴片,经空气干燥。

### 2. 姐妹染色单体分化染色的孵育

在孵育前滴片至少需老化 1—2 天,然后放入 pH 8 左右的 1.0 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液中,并经 83—85°C 热处理 15 分钟,然后用温蒸馏水冲洗,8% Giemsa 液染色 8—10 分钟,二甲苯透明,加拿大树胶封固保存。

## 结 果

我们的实验基本上采用 Korenberg 等人的 BUdR-Giemsa 方法。它的原理是人外周血淋巴细胞在 PHA 的刺激下,细胞发生分裂。在分裂的细胞中,每条染色体由两条染色单体组成,每条染色单体由双链 DNA 构成。BUdR 掺入 DNA 后可以取代胸腺嘧啶,取代后的 DNA 按上法用 1.0 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液处理,并用 Giemsa 染色时,染色效果差。如果 DNA 中仅单链掺入 BUdR,另一条链的胸腺嘧啶未被取代则染色深,而当双链中的胸腺嘧啶都被 BUdR 取代时则染色浅,所以此法可以呈现出分化性染色

\* 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-Bromdeoxymidene)。

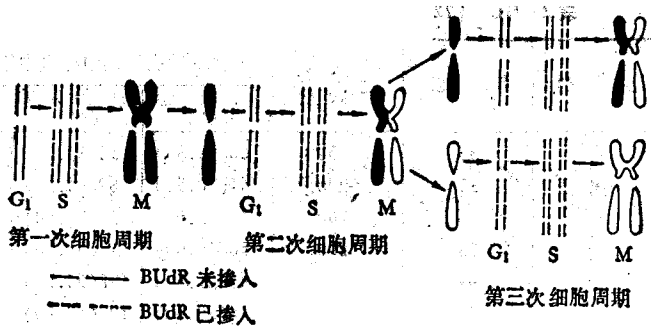


图1 BUdR 掺入图解

第一次细胞周期: BUdR 掺入到每条染色单体的 DNA 单链上, 每条染色单体均为深色。第二次细胞周期: BUdR 掺入到一条染色单体的 DNA 单链上, 另一条染色单体的 DNA 双链上, 故前者为深色, 后者为浅色。第三次细胞周期: BUdR 掺入到 1/4 条染色单体的 DNA 单链上, 3/4 条染色单体的 DNA 双链上, 故 1/4 为深色, 3/4 为浅色

(见图 1)。

根据 DNA 复制过程中 BUdR 掺入的原理, 可以对染色体分裂中期显示的染色类型进行分类: 凡两条染色单体色深者分类为第一次细胞周期; 一条染色单体色深, 另一条染色单体色浅者分类为第二次细胞周期; 1/4 条染色单体色深, 3/4 条染色单体色浅者分类为第三次细胞周期(见封二图版 1—3)。计算范围是每个

供体观察 130—200 个分裂中期的细胞, 分裂指数则以 2000 个细胞中的中期分裂数来表示。我们先后对 5 例 BUdR 48 小时培养标本, 10 例 BUdR 72 小时培养标本作了观察。发现 5 例 BUdR 48 小时培养标本的分裂指数平均为 2.78%。对这些分裂中期进行分析, 第一次细胞分裂占 65.26%, 第二次细胞分裂占 34.64%, 第三次细胞分裂占 0.10% (见表 1)。

表 1 BUdR 48 小时培养物第 1、2、3 次分裂中期频率

编号	姓名	性别	年龄	观察的细胞数	细胞周期中分裂中期数			有丝分裂指数(%)
					第一次分裂(%)	第二次分裂(%)	第三次分裂(%)	
1	高××	男	22	130	55(42.31)	75(57.69)	0	3.95
2	孙××	男	26	200	131(65.50)	69(34.50)	0	2.30
3	武××	女	22	200	145(72.50)	54(27.00)	1(0.50)	3.30
4	孙××	女	40	200	158(79.00)	42(21.00)	0	1.80
5	徐××	男	35	200	134(67.00)	66(33.00)	0	2.55
总计				930	623(65.26)*	306(34.64)*	1(0.10)*	2.78*

\* 为平均值

10 例 BUdR 72 小时培养标本的分裂指数平均为 3.96%。在这些分裂中期中, 第一次细胞分裂占 28.17%, 第二次细胞分裂占 46.51%, 第三次细胞分裂占 25.33% (见表 2)。

## 讨 论

上述结果说明, 我们应用人类淋巴细胞姐妹染色单体分化染色技术, 对淋巴细胞周期作

了初步分析。在全部实验过程中 BUdR 浓度在 10 微克/毫升时, 未见对细胞有毒性作用, 但当浓度超过 15 微克/毫升时, 有引起细胞减少的现象。可能与 BUdR 产生毒性有关。关于 pH 测定, 我们采用一般精密 pH 试纸测试, 温度在 83—89℃ 范围波动, 均可显示出分化性染色。载片需要老化 1—2 天, 过老片孵育后, 需要适当延长染色时间, 方能得到满意结果。我们认

表2 BUdR 72 小时培养物第1、2、3次分裂中期频率

编号	姓名	性别	年龄	观察的细胞数	细胞周期中分裂中期数			有丝分裂指数(%)
					第一次分裂(%)	第二次分裂(%)	第三次分裂(%)	
1	周××	男	35	150	66(44.00)	54(36.00)	30(20.00)	2.35
2	徐××	男	35	200	41(20.50)	89(44.50)	70(35.00)	2.70
3	孙××	男	26	200	44(22.00)	73(36.50)	83(41.50)	4.65
4	樊××	女	38	200	50(25.00)	113(56.50)	37(18.50)	4.60
5	陈××	女	44	200	43(21.50)	108(54.00)	49(24.50)	5.10
6	赵××	女	37	200	76(38.00)	105(52.50)	19(9.50)	3.65
7	杨××	男	35	200	47(23.50)	108(54.00)	45(22.50)	4.05
8	李××	女	41	200	60(30.00)	107(53.50)	33(16.50)	2.80
9	高××	男	22	200	42(21.00)	48(24.00)	110(55.00)	6.75
10	李××	男	23	130	47(36.15)	69(53.08)	14(10.76)	2.90
总计				1880	516(28.17)*	874(46.51)*	490(25.33)*	3.96*

\* 为平均值

为本法简便易行,容易重复,在一般实验室内均可进行。

使用姐妹染色单体分化染色法测定淋巴细胞周期时发现:5例正常人 BUdR 48 小时培养的分裂中期,全部可见到第二次分裂。10例正常人 BUdR 72 小时培养的分裂中期均可见到第三次分裂。过去一般报道认为培养 48—54 小时为淋巴细胞的第一次分裂。我们认为培养 38—40 小时来分析第一次淋巴细胞分裂更为合适,这与 Crossen 和 Morgan<sup>[7]</sup> 提出的看法是一致的。更引人注目的是 1 例 48 小时 BUdR 培养物中竟出现了第三次分裂,说明它的细胞周期更短些,从我们的实验结果可以认为淋巴细胞周期大部分在 48 小时前完成。在观察的样品中,48 小时已有约 35% 的细胞进入第二次分裂,72 小时尚有 28% 的细胞处于第一次分裂,另 25% 已进入第三次分裂,说明在此细胞群体内,细胞分裂不是同步的,而是有早有晚,有快有慢。

无论在 48 小时或 72 小时培养的细胞中,均存在个体之间的差异,个别供体在 48 小时培养中,第二次分裂高于第一次分裂。在 72 小时培养中,也有个别供体,第三次分裂高于第二次分裂,我们认为这些情况可能属于抽样误差以及供体年龄等因素有关;由于我们观察例数较少,尚待进一步研究。

关于姐妹染色单体分化性染色显示姐妹染色单体互换的研究,近年来除了在技术方面取得迅速进展外<sup>[8-10]</sup>,还在医学、细胞遗传学等领域不断取得新成就。这一技术尤其在细胞周期动力学的研究上,比同位素放射自显影技术能更迅速、精确地分析各种细胞的细胞周期。此外,还应用于染色体 DNA 复制过程的研究,包括早复制、晚复制的研究,为细胞或分子遗传学研究工作的进展提供了重要手段。此外如多种突变剂、致癌剂等引起染色体互换率提高,则为进一步研究肿瘤病因、肿瘤遗传、肿瘤药理等工作提供了新的研究途径。

### 主要参考文献

- [1] Taylor, J. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 43, 122, 1957.
- [2] Taylor, J. H.: *Genetics*, 43, 513, 1958.
- [3] Latt, S. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 70, 3395, 1973.
- [4] Perry, P. et al.: *Nature (Lond.)*, 251, 156, 1974.
- [5] Walf, S. et al.: *Chromosoma (Berl.)*, 48, 341, 1974.
- [6] Korenberg, J. R. et al.: *Chromosoma (Berl.)*, 48, 355, 1974.
- [7] Crossen, P. E. et al.: *Exp. Cell. Res.*, 104, 453, 1977.
- [8] Pathak, S. et al.: *Experientia*, 31, 916, 1975.
- [9] Wang, H. C. et al.: *Chromosoma (Berl.)*, 58, 263, 1976.
- [10] Lin, M. S. et al.: *Chromosoma (Berl.)*, 57, 219, 1976.

[本文于 1978 年 2 月 3 日收到]

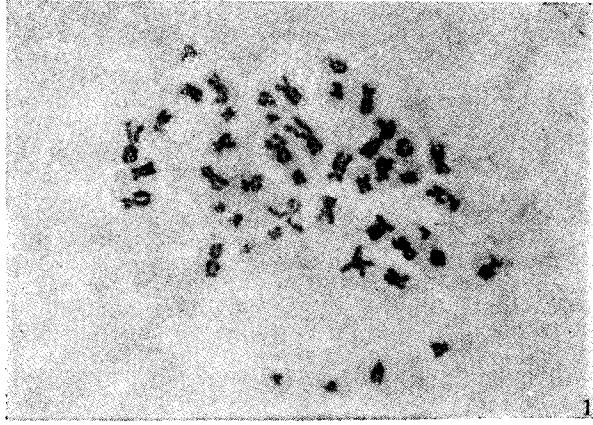


图 1 第一次细胞周期

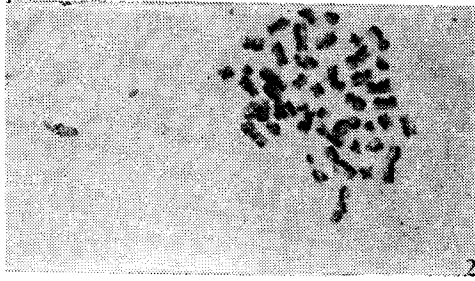


图 2 第二次细胞周期

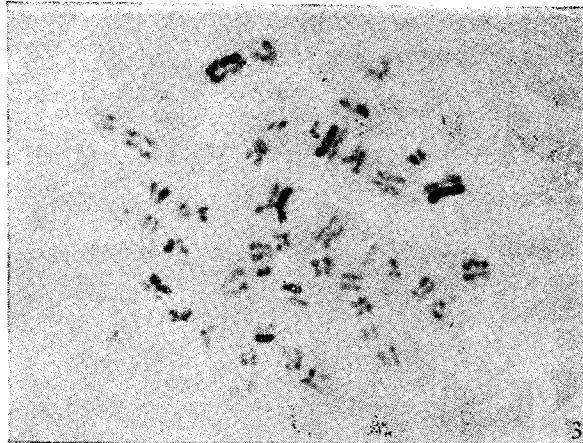


图 3 第三次细胞周期