

技术与方法

染色体显带的自动光度分析法

张丰德 安祝平 岳慧琴 陈瑞阳

(南开大学生物系, 天津)

染色体的分带技术, 近十几年来不仅广泛用于生物学的基础学科作为核型分析的重要手段, 而且与原位杂交技术相结合, 成为基因定位的一种新方法。因此, 深入探索染色体带纹的细节, 获取更多的染色体结构信息, 是当前细胞学、生物化学和分子生物学深入研究的一个重要领域。应用扫描显微分光光度计定量研究染色体上的一系列带纹, 正在引起人们的高度重视。

Zimmer 对显微光度计作了综述^[1], Drets 提出了线性扫描人类染色体分带的计算机程序^[2], Wayne 等人对显微光度计扫描点的重复性进行了研究^[3], Wall 和 Bolter 在自动分析人类染色体 G-带的工作中, 对扫描的精确定位作了详细的讨论^[4], 但是没有报道定量分析的结果。我们采用高分辨率的扫描显微光度计, 对黑麦第 V 染色体 C-带和人类外周血细胞 1 号染色体进行了定量分析, 对显带的自动光度法进行了初步探索。

一、仪器设备

Reichert 生产的 Univar 扫描显微分光光度计, 用 Commodore 8032-SK 微型计算机控制。光度计的波长范围为 400—700nm, 显示 100% T 照明最大灵敏度为 5×10^{-11} 流明。细扫描透镜由定镜和动镜组成, 动镜沿水平方向移动时, 横穿测量光阑的影像也随着移动, 可得到等效步距为 $0.05 \mu\text{m}$ 高分辨率的图像^[5]。

二、染色体带纹定量分析的基本原理

显微光度计将窄带单色光聚焦成微束光, 沿着分带染色体轴, 由短臂到长臂顺序逐点扫描, 因深带和浅带吸光度的不同, 产生一个分带染色体的数字图像, 经平滑预处理并积分后, 转换为积分光密度图形。这是一个具有多个正峰值的连续波形, 每个峰的波形可用点的三元式表示模拟函数 $y = f(x)$ 的特征值:

$$[(x^l, y^l), (x^m, y^m), (x^r, y^r)]。$$

点 (x^m, y^m) 是峰的极值, (x^l, y^l) 是峰的左边界, (x^r, y^r) 是峰的右边界, $x^l < x^m < x^r$ 。

根据连续波形的积分光密度值, 求出相邻两峰之间的谷值, 选取一组特征阈值, 识别每个峰的左右边界, 从而计算出每条深带带纹的宽度、面积和光密度值。

逐点积分、曲线平滑、波形识别和带纹计算是以专用数据处理程序, 在微型计算机上完成的。

三、实验方法和结果

1. 实验材料与测试条件

实验材料 黑麦 (*Secale cereale*) 染色体 C-带, 采用 BSG 法^[7], 扫描对象为第 V 染色体。人外周血细胞中期染色体系采用胰酶 G 带法, 被测染色体为第 1 号。

测量条件 测定黑麦染色体 C-带, 用 3 号矩形光阑 ($0.33 \times 0.98 \text{mm}$), 在 $100 \times$ 物镜下,

有效测量面积为 $0.8\mu^2$ 。人染色体 G-带, 用 2 号矩形测量光阑 ($0.2 \times 1.2\text{mm}$), 在 $100\times$ 物镜下, 有效测量面积为 $0.6\mu^2$ 。照明源为 12V、100W 卤素灯或 400W 氙灯。扫描步距定为 $0.05\mu\text{m}$, 量程扩展为 2, 实际等效步距为 $0.1\mu\text{m}$ 。采用迂迴扫描、测定波长为 550nm 。

带纹的自动光度分析 染色体扫描程序 (Reichert 公司提供), 首先根据染色体的吸光度 A, 显示出积分光密度图, 然后依据手动输入的滤光步距 (Filter Size) 进行自动分析, 显示出分带图形, 并打印出数据处理结果。

2. 染色体带的透光度

为了比较准确地测量出染色体带的吸光度, 分别用了 2 号和 3 号光阑, 用卤素灯和氙灯作为照明源进行了 $400-700\text{nm}$ 的波长扫描, 证明不论那种照明源, 其最小透光率都在 550nm 附近, 形成特征吸收峰。其结果如图 1 所示。

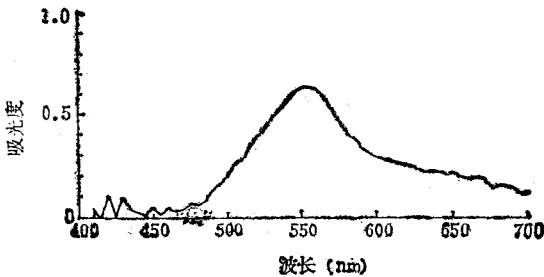


图 1 染色体带的吸收光谱

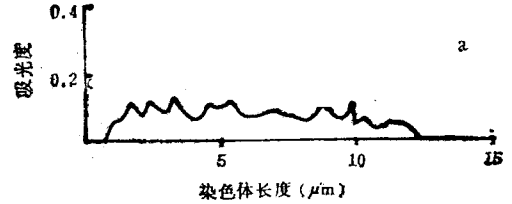
从图 1 可以看出, 吉姆萨染色的带纹, 其最大吸收值在 $550-555\text{nm}$ 。

3. 带纹的光密度分布图

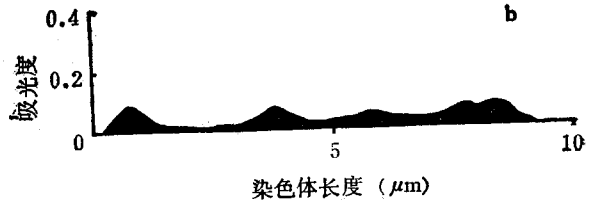
由显微光度计扫描所得的数据, 经 8032-SK 微机处理后, 按照各点的吸光度, 给出整个染色体光密度分布图形。横座标为染色体长度; 纵座标为每点的吸光值。每一小峰相应为染色体一条带的吸收峰。切断消光度为 0.1, 图形有线形和柱形两种, 如图 2 的 a 和 b 所示。

4. 带纹光度自动分析图

获得积分光密度图后, 用键盘输入滤光步距数据, 作为扫描步距的补偿因子, 识别每个小



a. 人 1 号染色体光密度线形图



b. 黑麦 V 号染色体光密度柱形图

图 2

峰的左、右边界, 而显示出与一般光学显微镜下所见带的数量一致。黑麦 V 号染色体显示出 5 条带, 其结果与显微照相所得到的带纹数目相同 (图 3—5), 并得到每条带纹的定量数据 (带宽、带的面积和积分光密度等)。

人外周血细胞前中期 1 号染色体带纹的数



图 3 黑麦 V 号染色体 Giemsa C-带的显微照片 ($\times 1200$)

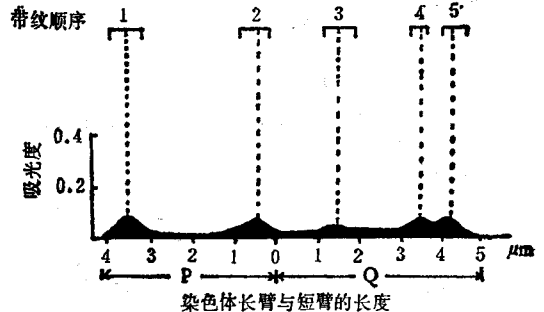


图 4 黑麦 V 号染色体 C-带自动分析光吸收分布图

○——着丝粒位置 P——短臂 Q——长臂



图 5 黑麦 V 号染色体 C-带消光三维图

一种杂交瘤细胞复苏装置的复苏效果

宁国伯 曹文飞* 翁志宏** 郭明珠

(第二军医大学 369 研究室, 上海)

在单抗^[1-4]的研制过程中, 为了获得满意的细胞株, 筛选细胞和冻存细胞的工作量甚大。特别是研究细胞分化抗原, 制备人的单抗及 T 细胞杂交瘤, 需要冻存的样品更多。用常规方法^[5]需要通过逐级扩大培养, 很费事。D.E. Wells^[6]利用 96 孔细胞培养板直接冻存, 证明是一种简便快速的方法, 但人们不能随意单孔或多孔复

苏, 故不利于样品的保存和选择。为此, 我们与有关单位协作, 设计制造了细胞复苏装置, 这样就可以根据需要, 有选择的复苏。我们把这种装置应用于绿脓杆菌单抗的制备中, 其效果良好, 达到了简便快速和微量的目的, 节省了人

* 长海医院免疫室。 ** 修理所。

目较多, 经 $0.1\mu\text{m}$ 等效步距扫描后, 得到 13 条

带纹, 其结果与显微照片相近 (图 6—8)。也得到了每条带纹的带宽、带的面积和积分光密度等的定量数据。

图 6 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带的显微照片 ($\times 1200$)

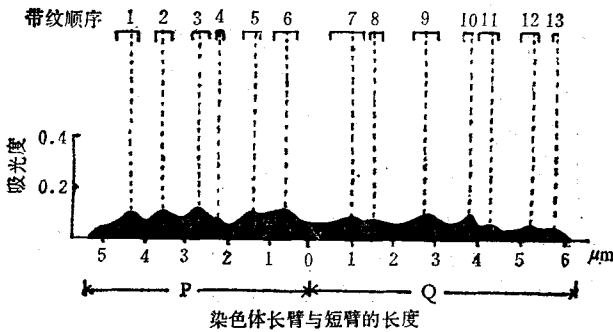


图 7 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带自动分析光吸收分布图

O——着丝粒位置 P——短臂 Q——长臂



图 8 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带消光三维图

四、小 结

染色体分带的定量研究, 采用扫描显微分光光度计可以得到连续带纹的结构信息, 要获得较准确的结果, 必须很好地解决两个问题。一是扫描步距与测量光阑的配合, 二是滤光步距的正确选择。步距与光阑配合不当, 就会漏掉应有的信息, 为以后的分析造成误差^[6]。滤光步距选值太小, 将有噪声带出现, 选值过大又会滤掉真实的细小带纹。根据我们的经验, 选值以 $0.3-0.4\mu\text{m}$ 为宜。

参 考 文 献

- [1] Zimmer, H. G.: *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Vol. 14, 297, 1973.
- [2] Drots, M. E.: *Computer Programs in Biomedicine*, 8, 283, 1978.
- [3] Wayne, A. W. et al.: *J. Microsc.*, 124, 163, 1981.
- [4] Wall, W. J. et al.: *J. Microsc.*, 133, 335, 1984.
- [5] 陈瑞阳等: 《植物学报》, 21, 3, 1979.
- [6] 胡匡祐: 《细胞生物学杂志》, 6(3), 136, 1984.

[本文于 1985 年 9 月 9 日收到]