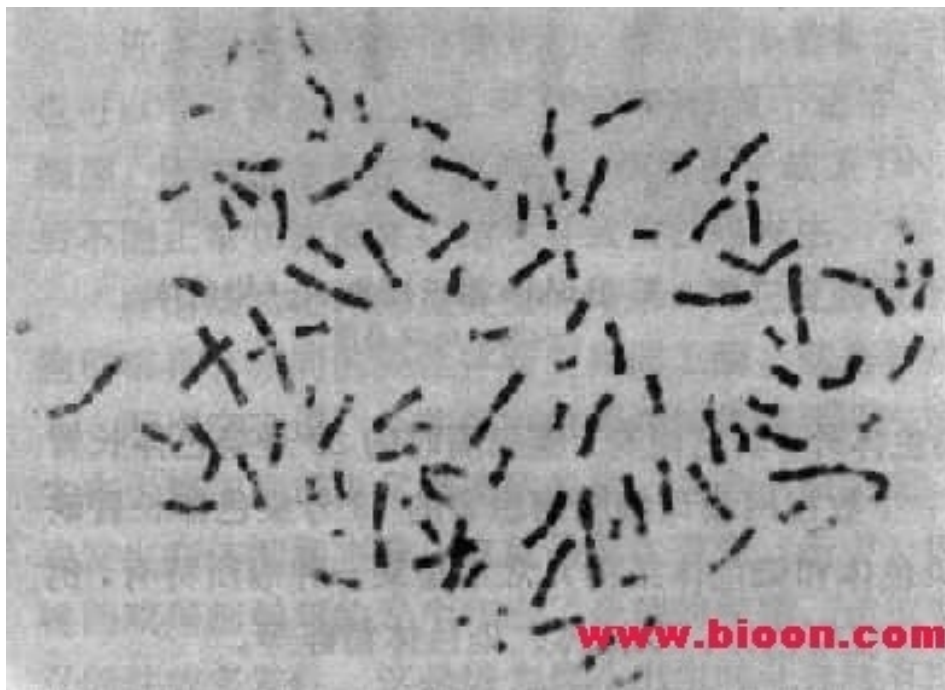


关于染色体显微操作技术

引言:

在大部分人类肿瘤和某些特定人类遗传病中存在染色体重排。肿瘤特定的染色体异常会导致原癌基因产物的激活、肿瘤特异融合蛋白的产生或肿瘤抑制基因的失活。



一个癌细胞的染色体共**104**条，包括许多异常的染色体



Ph染色体示9; 22易位
(9q34;22q11) ;→fi 22q-;▲示9+

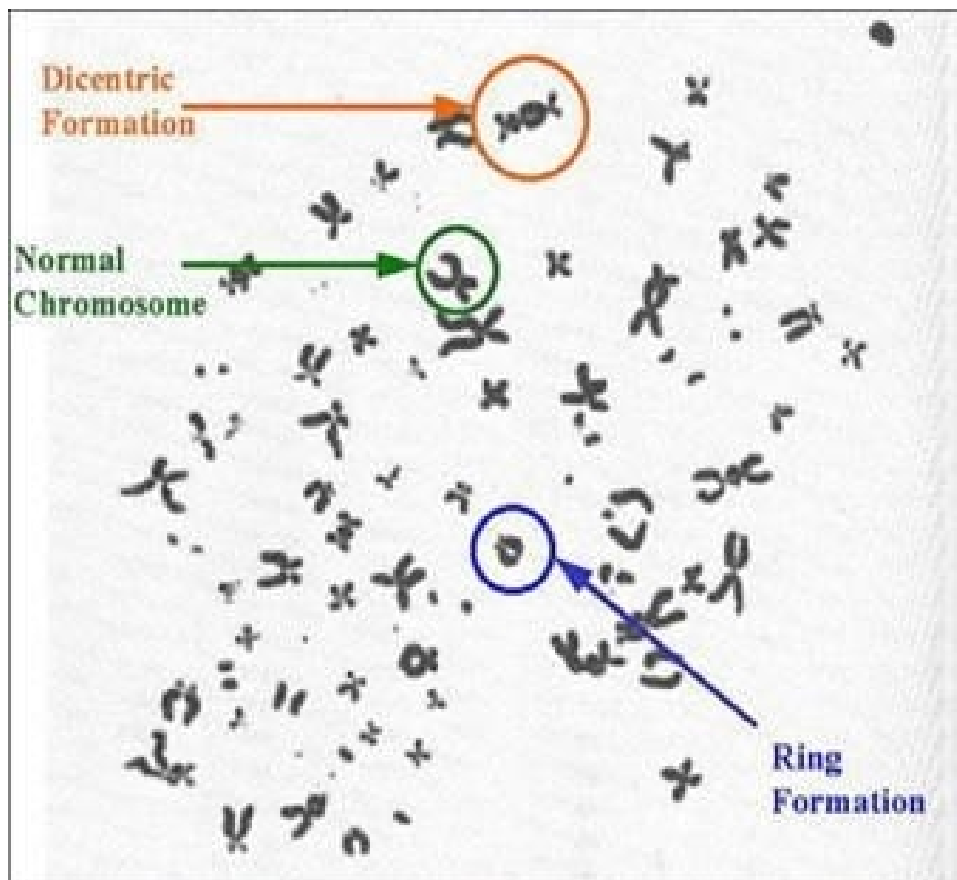


Burkitt淋巴瘤的14q+染色体8q24;14q32易位

一些肿瘤常见的染色体异常

病名	染色体异常
慢性粒细胞白血病	Ph,即t(9;22)
Burkitt淋巴瘤	t(8;14),t(2;8),t(8;22)
急性非淋巴细胞白血病	+8;7q,5q或-5
慢性淋巴细胞白血病	t(8;21),t(15;17),t(9;22); t(11;14),+12
急性淋巴细胞白血病	t(?;11),t(1;9),t(7;12),t(9;14)
恶性淋巴瘤	t(8;14),t(4;11),+21
小细胞肺癌	t(4;11),+12
卵巢乳头状腺癌	14q+,+12
神经母细胞瘤	del(3)(p14-23)
脑膜瘤	t(6;14)
Wilms瘤	del或t(1;?)(p 32-36;?)
睾丸癌	13q
畸胎瘤	-22,22q
	11p
	1(12p)
	1(12p)

染色体显带技术的建立，肿瘤非随机性染色体异常的细胞遗传学分析已成为许多人类肿瘤诊断和预后不可或缺的指标，但常规显带染色体分析不能确定所有的细胞遗传学染色体重排。



该技术的局限性阻碍了许多人类肿瘤，尤其是实体瘤核型的确定，但这种情况已被染色体显微切割和**FISH**技术所弥补。染色体显微切割已经成为由细胞遗传学分析快速过渡到分子检测的有力工具。

显微操作技术:

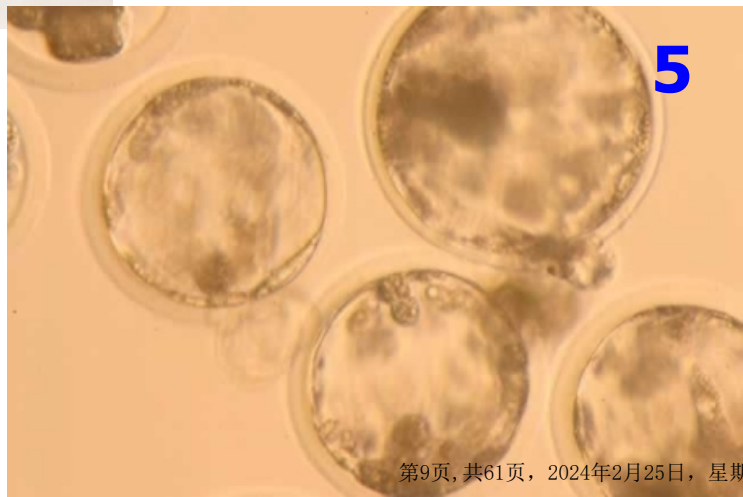
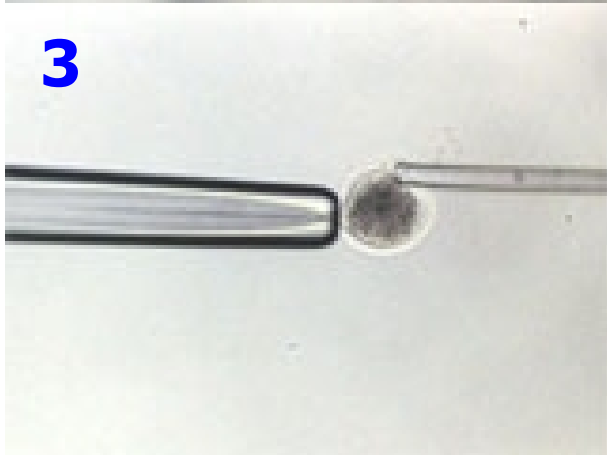
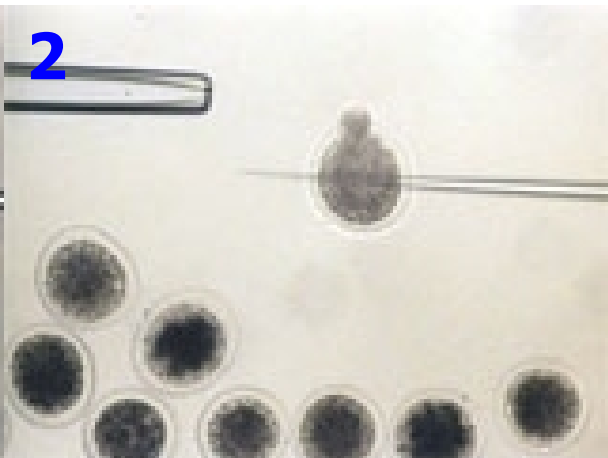
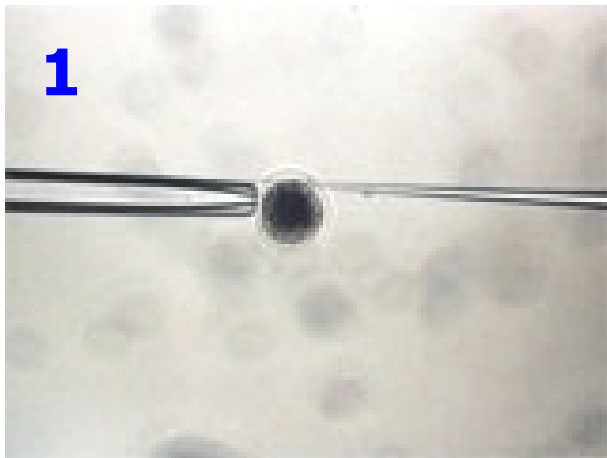
是指在高倍倒置显微镜下，利用显微操作器（**micromanipulator**），这是一套能控制显微注射针在显微镜视野内移动的机械装置，用来进行细胞或早期胚胎操作的一种方法。

显微操作技术包括细胞核移植、显微注射、嵌合体技术、胚胎移植以及显微切割等。



细胞核移植技术：就是将供体细胞核移入除去核的卵母细胞中，使后者不经过精子穿透等有性过程即无性繁殖即可被激活、分裂并发育成新个体，使得核供体的基因得到完全复制。以供体核的来源不同可分为胚细胞核移植与体细胞核移植两种。





1 切开卵母细胞透明带

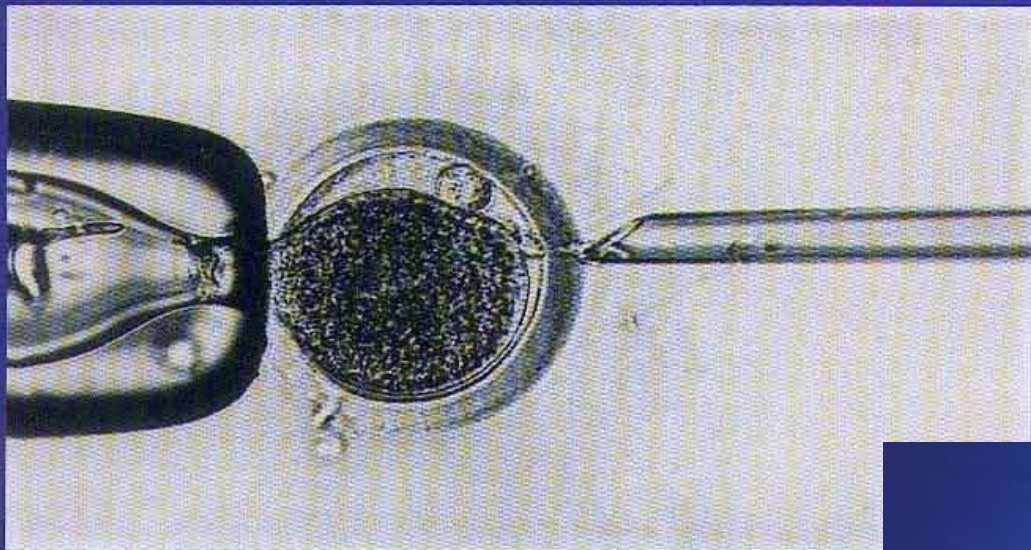
2 挤出卵母细胞细胞核

3 注入供体细胞核

4 电融合仪融合

5 培养

体细胞显微注射 Microinjection of Somatic Cell



大熊猫体细胞移入去核兔卵

Transferring the giant panda somatic cell into enucleated rabbit egg

显微操作仪 →



嵌合体技术

- 嵌合体 (chimera) 一词源于古希腊神话，其意是指狮头、羊身、龙尾等部分拼凑起来的怪兽。
- 嵌合在生物学上是指同一个体中，基因型相异的细胞或组织混合存在的状态。

- 现代的胚胎工程技术中，也有一种叫胚胎嵌合的技术。它是将 2 个胚胎细胞（同种或异种动物胚胎）合并，共同发育成 1 个胚胎，即“嵌合胚胎”，然后将这个胚胎移植给受体，让其妊娠产仔。如果产下来的幼仔具有以上 2 种动物胚胎的细胞，则称其为“嵌合体动物”。
- 例如，用同一种类的黑鼠和白鼠胚胎嵌合，可生下黑白相间的花小鼠；不同种类的绵羊和山羊胚胎细胞嵌合，可生下绵山羊，它既有绵羊的特征，又有山羊的特征。

- **1 囊胚显微注射法：**
- 用显微操作技术将供胚的全部内细胞团注入除去部分内细胞团的受胚囊胚腔中，或将供胚的部分内细胞团注入受胚的**囊胚腔**中，也可以向受胚囊胚腔中（或卵周间隙）注入**16细胞至桑甚胚的卵裂球、胚胎干细胞或已分化的细胞**，使其发育为嵌合胚胎的方法即为**囊胚注入法**。

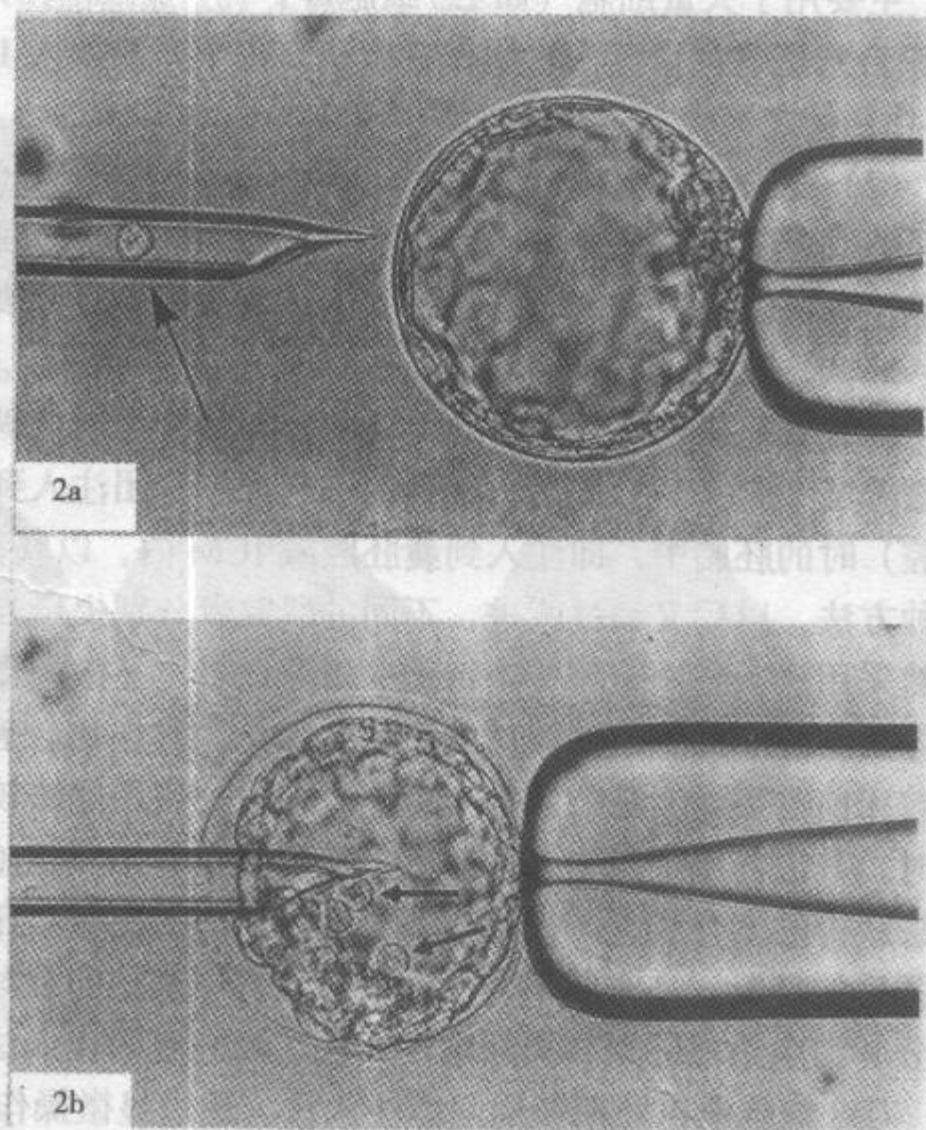


图 7-13 小鼠胚胎囊胚腔注入嵌合法

2a. 用固定细管将囊胚固定，注射细管吸入待注入细胞

2b. 将注射细管刺入囊胚腔，将细胞注入到内细胞团上

(東 真宏、豊田裕, 1991)

2. 聚合法

- 是指将去除透明带的两枚8细胞至桑葚期胚胎，或来自两个不同胚胎的卵裂球，或卵裂球与胚胎聚合在一起的方法。

胚胎移植

1. **概念**: 将雌性动物的早期胚胎, 或者通过其他方式得到的胚胎, 移植到同种的. 生理状态相同的其他雌性动物的体内, 使之发育为新个体的技术.

供体: 提供胚胎的个体。

受体: 接受胚胎的个体。



① 对供、受体母牛进行选择，并用激素进行同期发情处理。



② 用激素对供体母牛做超数排卵处理。



③ 超数排卵的母牛发情后，选择同种优秀的公牛进行配种或人工授精。



④ 胚胎的收集：配种或输精后第7天，用特制的冲卵装置，把供体母牛子宫内的胚胎冲洗出来（也叫冲卵）。



⑤ 冲卵后，对胚胎进行质量检查。这时的胚胎应发育到桑椹胚或囊胚阶段。



⑥ 将收集的胚胎直接向受体移植或放入 -196°C 的液氮中保存。



⑦ 胚胎的移植：(1)手术法：引出受体子宫和卵巢，将胚胎注入子宫角，缝合创口。(2)非手术法：将装有胚胎的移植管送入受体母牛子宫的相应部位，注入胚胎。



⑧ 对受体母牛进行是否妊娠的检查。



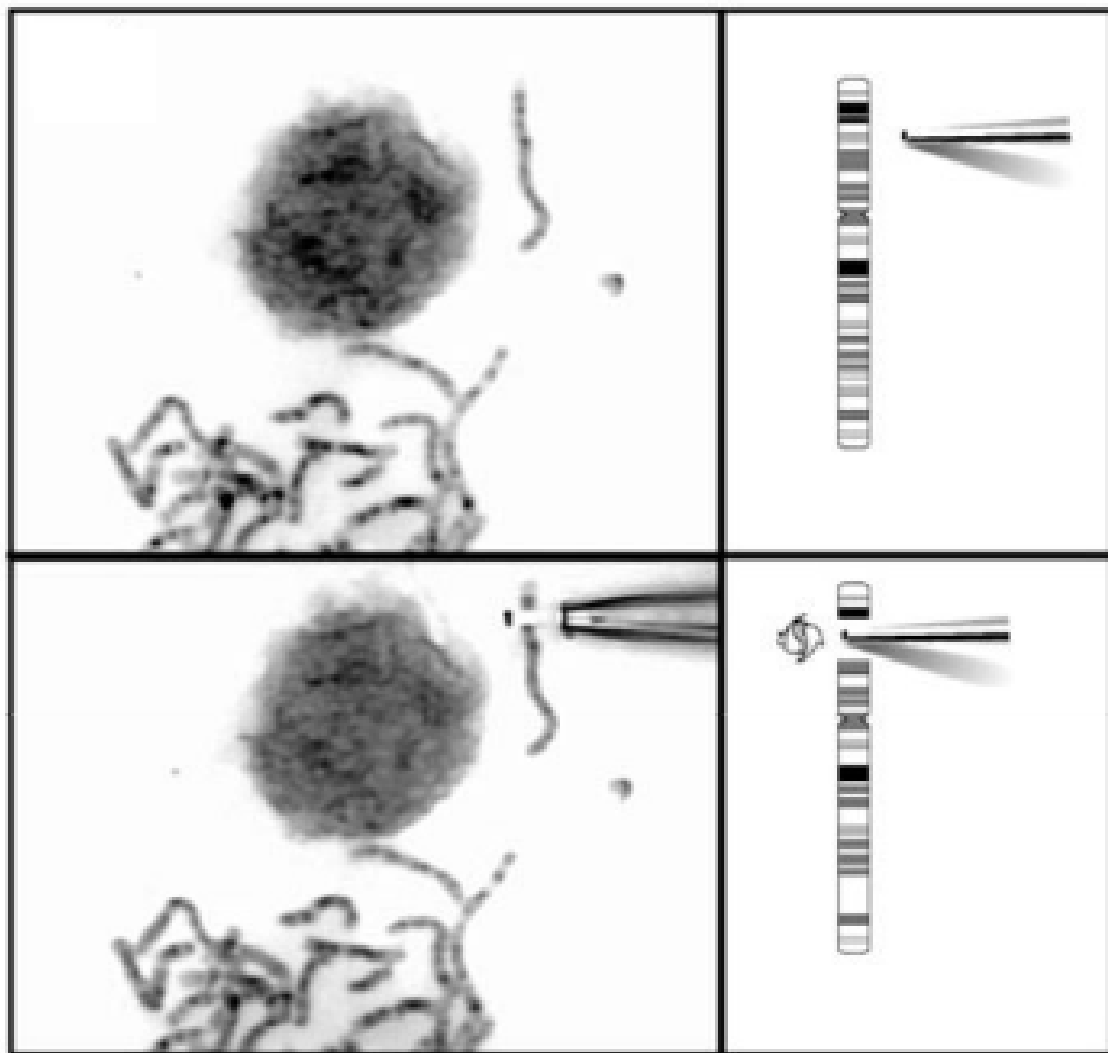
⑨ 受体母牛产下胚胎移植的犊牛。

显微切割(microdissection)

通过显微操作系统对欲选取的材料进行切割分离并收集用于后续研究的技术。显微切割技术可以简单、快速地从含有不同成分的组织中非常特异的分离出同质细胞来进行后续分析，大大削弱组织中异质细胞的混淆作用。染色体显微切割技术是细胞遗传学与分子遗传学相结合的一项桥梁技术。



染色体显微切割分**手工切割**和**激光切割**法，倒置显微镜上装配切割臂，安上硅化玻璃针，找到分散良好的分裂相来切割所需染色体片段。



显微切割图例

1.染色体显微切割技术的发展

染色体显微切割最早起源于从一个特定的染色体区域分离出**DNA**标记，并首先成功地应用于果蝇多线染色体和小鼠染色体的研究。

1981年，德国的欧洲分子生物学实验室（**EMBL**）**Scalenghe**等切割了果蝇唾液腺多线期**X**染色体第**3**段的几个片段，通过蛋白酶消化、酚抽提、**EcoR I**酶切进行重组克隆。

多线染色体:



多线染色体

（果蝇唾腺的巨型染色体，上图是果蝇最小的第IV染色体，长度约 $50\ \mu\text{m}$ ，大致有 140 个横纹和条带）

- 由于成百上千的染色质线并排，就使染色体由于不同区段的螺旋化程度差异而在间期染色时会呈现清晰的带纹。
- 染色体的螺旋化程度体现了染色质遗传活性，因而横纹的深浅和变化也可以作为研究基因活性差异的依据。

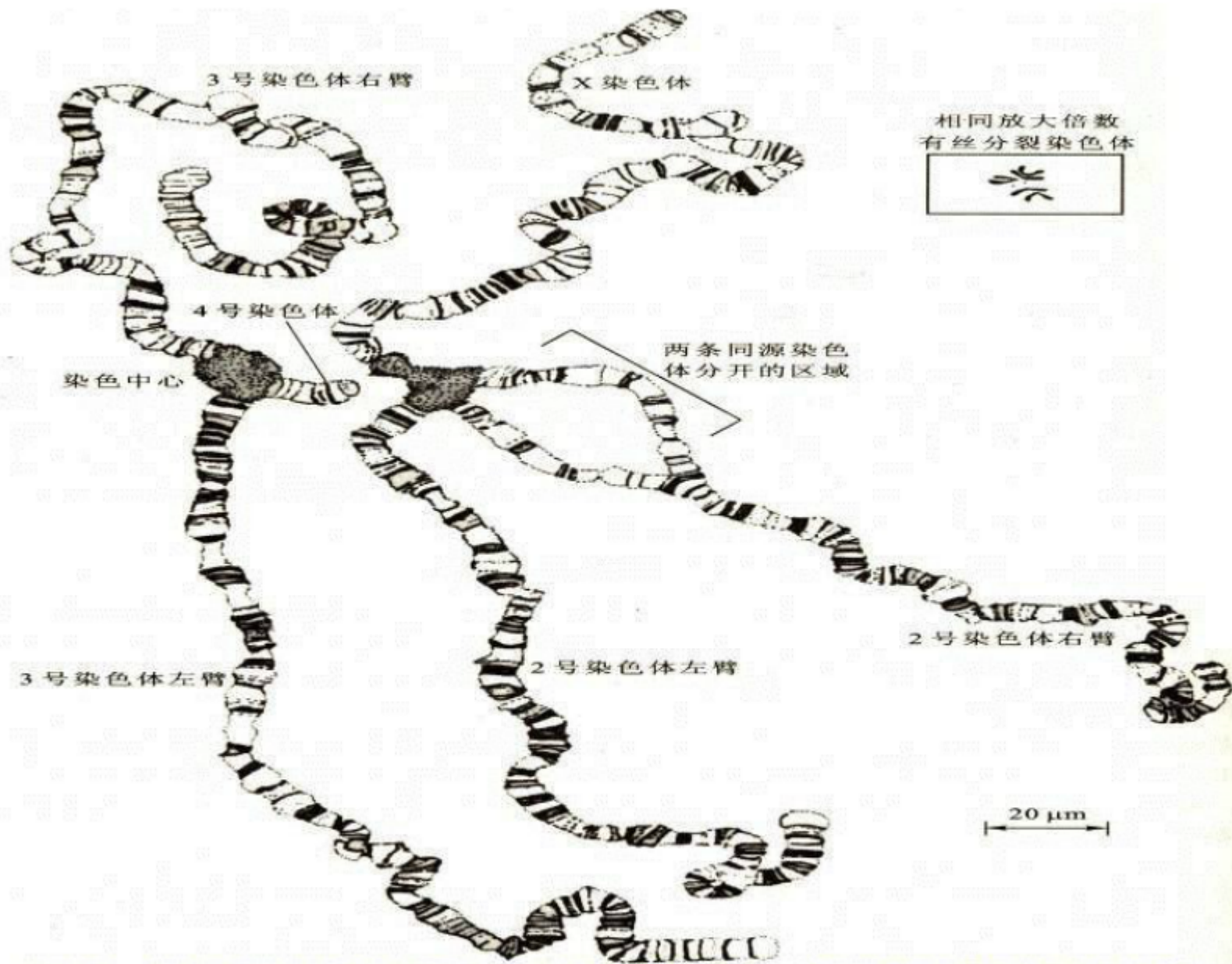


图 果蝇唾腺细胞全套多线染色体压片法制备的4条配对的同源染色体，着丝粒区连接，聚集形成大的染色中心

1984年染色体显微切割应用小鼠；

1986年Bates等切割了人的2号染色体短臂。
但当时由于所切割的染色体DNA量少，通常要切割上百条染色体，且其文库也只含几百个微克隆。

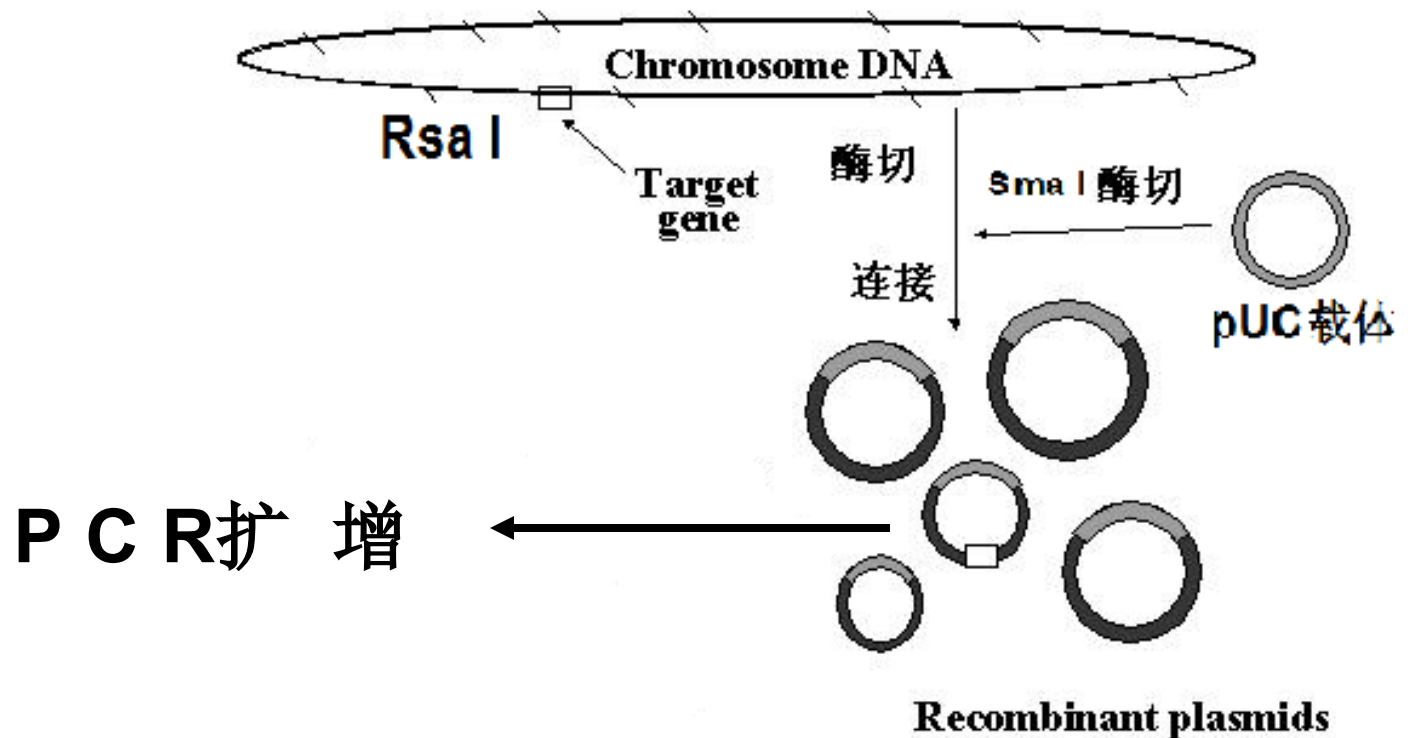
由于无法直接扩增染色体DNA，所以必须在显微镜下反复切割若干拷贝的染色体，才能满足实验的要求这不仅费力耗时，而且要求实验操作人员必须具备熟练的染色体分带和鉴定经验，才保证实验的准确性。

显微切割技术的突破在于它与**PCR**的结合，**1989年Ludecke**等切割了人类**G**显带染色体，结合**PCR**技术进行体外扩增，使其工作量大大减小。

对于同一条染色体，只要切割和收集**5 ~ 10**个拷贝，通过**PCR**扩增，即可满足实验要求。从而极大地提高了实验技术的可行性和准确性。

在1989年，Ludecke等建立了一个显著提高克隆效率的方法。

该方法首先用Rsa I酶切显微切割的DNA，连接到一个用Sma I酶切的pUC载体，然后用PCR扩增插入位点两侧的载体序列。



随后的研究对该方法进行完善，显微切割**DNA**经酶切后连接到一个由**24碱基或20碱基**的寡核苷酸组成的**5'**端突出接头。用**20个碱基**接头作为引物进行**PCR**扩增显微切割的**DNA**，限制酶切扩增产物并克隆到质粒载体中去。

替代方法：

该方法用简并寡核苷酸引物直接用**PCR**扩增显微切割**DNA**。该方法在显微切割的**DNA**进行**PCR**扩增前增加了拓扑异构酶I处理，大大简化了显微切割的程序。

优点：

通过减少显微切割**DNA**的拷贝数降低显微切割的操作时间和难度，同时也降低了外源性**DNA**污染的风险。

2.染色体显微切割的应用

2.1 感兴趣区域DNA克隆的构建

2.2 FISH探针的制备

2.3 染色体重排的检测

2.4 区域特异性cDNA的选择

2.染色体显微切割的应用

2.1 感兴趣区域DNA克隆的构建

显微切割在人类基因组计划启动之前主要是分离填补物理作图缺口的染色体区域特有的DNA标记。定位克隆计划已经建立了几个区域的特异文库。

2.2 FISH探针的制备

2.3 染色体重排的检测

2.4 区域特异性cDNA的选择

物理作图

要完成真核生物基因组测序的巨大工程，通常首先需要把基因组分解成为许多较小的DNA片段，然后分别测序，再综合组装。

物理作图就是要把基因组分解成为许多较小的DNA片段，然后再把这些DNA片段连接起来，构建一个由DNA片段重叠群组成的物理图（physical map）。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/565314130024011200>