



与 Sanger 法有所不同,Maxam-Gilbert 化学降解法<sup>[2]</sup>侧重对 DNA 双链进行化学降解:将 DNA 片段的 5'端磷酸基团做放射性同位素标记后,采用不同的化学方法修饰并裂解特定碱基,产生一系列长度不同的 5'端被标记的 DNA 片段,最后,通过凝胶电泳方法将片段群分离,经同位素放射性自显影,确定各片段末端的碱基,最终得到目的 DNA 的碱基组成。该测序技术重复性较高,所需要的化学试剂简单,不需进行酶的催化反应,还可对未经克隆的 DNA 片段进行直接测序,因此,可利用 Maxam-Gilbert 法进行表观遗传学方面的研究,即能够分析 DNA 的甲基化修饰等情况。

## 2 第2代测序技术

进入 21 世纪以来,伴随着科技的进步,第 2 代测序技术问世:以 454 测序平台(Roche 公司)<sup>[5]</sup>、Solexa 测序平台(Illumina 公司)<sup>[6]</sup>和 SOLiD 测序平台(ABI 公司)<sup>[7]</sup>为标志。第 2 代测序技术原理是边合成边测序,所以被誉为“下一代测序技术”:即依照第 1 代 Sanger 测序技术的原型,利用测序仪器捕捉新掺入的末端荧光标记来确定 DNA 序列组成<sup>[8]</sup>。

第 2 代测序技术相比第 1 代测序技术精准性更高,并大幅度降低了测序成本,提高了测序速度,使科学家从宏观揭示所研究物种的基因组成和基因表达情况成为可能。上述所提的 3 个测序技术平台各有优点:454 测序平台得到的片段能够达到 400 bp,并且读长的质量高;Solexa 测序平台的性价比最高<sup>[9]</sup>,在数据量相同的情况下,测序成本仅为 454 测序平台的 1/10;SOLiD 测序平台准确度能够达到 99.94%,在片段覆盖率为 15× 时,测序准确度可接近 100%(图 2)。

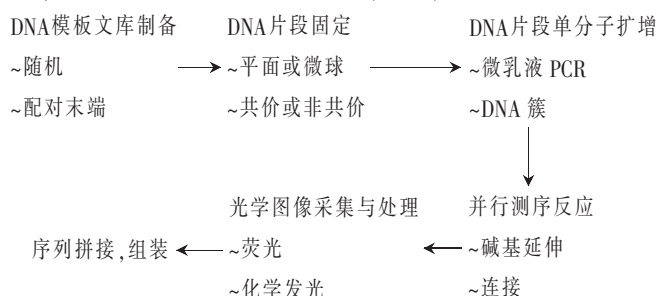


图 2 第 2 代测序技术流程  
(图 2 来源于 <http://www.bb100.com>)

现以 Solexa 测序平台为例,详细说明测序过程如下:

2.1 测序文库的构建(library construction) 将样品 DNA(或 RNA)随机片段化,形成长度为几百个碱基的片段或更短的片段,之后在片段两端加特定的接头(adaptor),值得注意的是:片段的大小直接关系到后续数据的分析,乃至科学家们将数据与生物学现象联系的准确度。

2.2 锚定桥接(surface attachment and bridge amplification) 测序过程在微流量池(flow cell)中进行,每个 flow cell 含有 8 个单元通道(lane),每个 lane 的内表面含有无数个被固定的单链接头。

2.3 预扩增(denaturation and complete amplification) 利用固相桥式 PCR(bridge solid phase PCR)进行扩增:添加没有被标记的 dNTP 和 Taq 酶,即能够得到固相表面上大约百万条双链待测目的片段,这些片段成簇分布。

2.4 单碱基延伸测序(single base extension and sequencing) 根据掺入荧光标记的 dNTP 在测序簇延伸其互补链时,能够释放出相应的荧光,测序仪据此就能捕捉荧光信号,之后计算机可以将荧光信号转化为不同颜色的测序峰图,使研究者能够获得待测片段的序列信息<sup>[10]</sup>。

2.5 数据分析(data analyzing) 通过构建重叠群(contigs)分析测序数据。重叠群,即将含有 STS 序列标签位点的基因片段分别进行测序,通过重叠分析,最终得到完整的染色体基因组序列信息。测序得到的原始序列长度只有几十个碱基,需要通过生物信息学分析将这些原始序列组装成较长的重叠群或者脚手架结构乃至整个基因组的框架结构,将组装的序列信息比对到已有的全基因组信息或与测序物种相近的物种基因组数据库中,分析得到有生物学意义的结果<sup>[11]</sup>。

由于第 2 代测序技术的高通量性,成为目前开展物种测序生产化的主要平台。例如,应用第 2 代测序技术完成测序的物种主要有大熊猫、马铃薯、棉花等,为进入宏观基因组学和后基因组学研究阶段提供保证。在人类疾病研究方面,加拿大英属哥伦比亚癌症研究中心 Huntsman 等,应用 Illumina 公司测序平台 Genome Analyzer II 对粒层细胞瘤 GCTs 进行研究;对成年的 GCTs 的 4 个全转录组双末端进行测序,将得到的数据、已发表的人类基因组、11 个上皮卵巢肿瘤以及 SNP 数据库进行 Blast 比对,发现在卵巢粒层细胞发育过程中,

转录因子 FOXL2 发生了一个错义突变——第 402 位的碱基 C 突变为 G, 致使翻译产物中因突变而产生了色氨酸<sup>[12]</sup>导致病变。

### 3 第3代测序技术

2010 年, Elizabeth Pennisi 等在 Science 中报道: 第3代测序技术又称直接测序技术, 或称新一代测序技术(next-next-generation sequencing), 建立在纳米孔基础之上而进行的单碱基读取技术, 通过测定碱基经过纳米级别的蛋白孔洞而产生的跨膜电导率变化进行测序。纳米孔是比 DNA 分子略宽的蛋白质孔, 宽度为 4 nm, 因此, 测序时, DNA 分子像一条线一样穿过蛋白孔洞, 而组成 DNA 分子的每种碱基的化学性质不同会导致流经该孔洞的电流值发生改变。因此, 纳米孔也可以设计成检测跨越孔洞的隧道电流, 由于每种碱基的电阻率不同, 可分辨出待测 DNA 双链分子的碱基组成, 该技术不需要光学检测及洗脱。

目前, 科学家在科学杂志上已经公布了应用第3代测序技术获得的3个低成本的完整人类基因组序列, 比起应用传统测序技术完成人类全基因组测序的速度以及精确性有大幅度提升。

### 4 基因芯片技术

近年来, 随着分子生物学及医学领域的科技进步, 基因芯片技术(DNA microarray)应运而生, 该技术基于 DNA 杂交原理, 通过把数以万计的 cDNA 或寡聚核苷酸固定于一块小面积的尼龙膜或玻璃片等支持物上, 制成阵列。在芯片表面固定了已知序列的核苷酸探针, 便于与溶液中含有荧光标记的相应核酸序列发生互补配对, 之后, 利用仪器确定出现最强荧光的位置以及荧光强度, 获得一组组点阵列信息, 利用生物信息学算法推测目的靶核酸的序列组成。

该技术主要利用点样法、光蚀刻合成法和压电印刷法<sup>[13]</sup>制备基因芯片。应用基因芯片技术可以进行基因测序、基因表达研究以及基因突变分析, 为科学家查找某一生物学现象中感兴趣的基因表达情况提供依据。其中, 基因表达谱芯片的应用性最强, 能够检测全基因组内数万个基因在 mRNA 水平的表达变化情况, 但芯片点阵的密度较普通基因芯片高: Janet A. Warrington 等报道(2001 年): Affymetrix 公司研制的基因表达谱芯片点阵密度为 400 000 个点。基因表达谱芯片通过

计算杂交信号比值并进行统计分析, 应用聚类分析算法研究功能或表达调控中有相关联的基因, 得到不同细胞或组织来源的 mRNA 转录丰度的差异, 获得差异表达基因, 为研究基因功能以及构建基因工作网络提供依据。

### 5 4种测序方法总结

第1代测序技术——该技术从固定的引物点开始合成 DNA, 在某一个特定的碱基处终止其随机合成, 即可得到一系列分别以 A、C、T 和 G 为结尾的不同长度的核苷酸, 最后应用 SDS-PAGE 进行检测, 即可获得 DNA 序列碱基组成的信息。

第2代测序技术——以焦磷酸测序法为例, 说明如下: 在由 ATP 硫酸化酶、DNA 聚合酶、腺苷三磷酸双磷酸酶和荧光素酶 4 种酶组成的同一催化反应体系中, 发生酶联发光反应, 以便于对已知短序列进行测序分析。第1代测序技术每次只能读取 1 条序列, 第2代测序技术每次读取 96 条序列<sup>[14]</sup>。

第3代测序技术——基于纳米孔级别的单分子读取平台, 每一次能读取几百万条序列, 因此, 在测序读长方面, 第3代测序技术较第1、第2代测序技术有了很大飞跃。此外, 在测序准确性方面, 第1、第2代技术过程均涉及 PCR 反应, 因此测序错误率较高, 从而对测序结果有一定程度的影响, 第3代测序技术属于单分子直接测序, 不涉及由 PCR 反应带来的错误率, 准确性高。

但是, 第2、第3代测序技术均需要进行大量后续的生物信息分析, 而生物信息平台搭建还处于起步阶段: 一方面, 如何充分挖掘隐藏在测序原始数据中的生物学意义, 以解释各种生物学现象, 将高通量测序真正服务于生产, 还是一个亟待解决的问题; 另一方面, 由于第2代测序存在不同的测序平台, 而每个平台的评估系统不同, 因此出现的误差以及如何高效对所得的数据进行统一、分类, 是解决后续数据处理的最大瓶颈, 而云计算平台的出现和发展为解决这些问题带来了曙光。

因此, 如果要将第2、第3代测序技术充分应用到对测序物种的分子生物学改造方面, 还需要科学家进行大量的努力。

### 主要参考文献

- 1 Sanger F., S. Nicklen, A., R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(12):5463—5467.



# “观察根尖分生组织细胞的有丝分裂”的教学组织

任文韬 (华南师范大学附属中学 广东广州 510630)

**摘要** 对人教版高中生物学必修1“观察根尖分生区组织细胞的有丝分裂”实验的基本原理、实验操作的关键步骤、实验过程中的常见问题、教学建议等方面做出了阐述。重点强调了实验操作中材料准备、解离、染色、制片等关键步骤的操作方法,对教学过程中学生容易出现的问题如找不到目标细胞、染色效果差、绘图不规范等方面做出了分析,最后提出了提高教学效果的若干建议。

**关键词** 根尖分生组织 有丝分裂 教学组织 生物学实验

中国图书分类号:G633.91 文献标识码:C

观察细胞的有丝分裂涉及到显微镜的使用、压片、染色等生物学实验基本操作技术,对学生识图、绘图与观察能力也有一定的要求,是一个综合性强、难度较大的实验。如何有效地组织落实该实验的教学,对于培养学生生物学实验操作能力、贯彻《高中生物课程标准》中实验与探究方面的要求具有重要意义。本文结合现行人教版教材,将该实验教学组织行文如下。

## 1 实验的基本原理

高等植物根尖、茎尖等分生区细胞能活跃地进行有丝分裂,且分生区不同的细胞的分裂进程不一致,所以在同一时间同一分生区组织中存在处于不同分裂时期的细胞,为观察细胞有丝分裂的完整过程提供了可能性;在有丝分裂过程中,染色体的规律性变化为判断细胞的分裂时期提供

了基础;染色体可被碱性染料着色,使其可在光学显微镜下被识别。

## 2 实验操作关键步骤

**2.1 材料准备** 用洋葱培养根尖材料。由于实验教学时间的限制,该步骤可由教师完成。根据教材内容的编排,该实验一般在冬季进行,低温使得洋葱生根较慢,故可在实验2~3周前购买实验材料,切除洋葱鳞茎盘上的老根及外层组织,放置十几天后,放在装有清水的烧杯口上,保持杯中清水刚好浸到鳞茎盘,定期换水,有条件可在温室中或空调房中培养,4 d左右幼根即能生长至2~4 cm长。

洋葱根尖分生区细胞分裂旺盛的时间为中午左右,而一般学校的实验课安排在上午或下午,现取现用可能导致细胞的分裂相太少。为解决时间

- Maxam A. M. W., Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977,74(2):560—564.
- Whitfield P. R.. A method for the determination of nucleotide sequence in polyribonucleotides. *Biochem J*, 1954, 58(3): 390—396.
- Todd D., Taylor, Hideki Noguchi, Yasushi Totoki *et al.* Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification. *Nature* 2006,440:497—500.
- Margulies M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005,437(7057):376—380.
- Fedoruk M. *et al.* BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*, 2006,34(3):22.
- Shendure J. *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*, 2005, 309 (5741):

1728—1732.

- Mardis E. R.. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 2008, 24(3):1331—41.
- Amy Coombs. The sequencing shakeup, *Nature Biotechnology*, 2008,26(10):1109—1112.
- 肖艺.基因测序:第3代和“新生代”.*生物技术世界*,2011:2.
- Elaine R.. MardisNext-Generation DNA Sequencing Methods *Annu. Rev. Genomics Hum, Genet*, 2008,9:387—402.
- Shah S. P., Kobel M., Senz J. *et al.* Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(26):2719—2729.
- 李涛等. 基因芯片在临床检验中的应用及进展.*海南医学*, 2010,(21):18.
- 孙海汐,王秀杰. DNA 测序技术发展及其展望. *e-Science*, 2009,6:19—29.

(E-mail:liuzhenbo12345@126.com)