

腫瘤染色體分析

(Cancer Cytogenetics)

曾慶誠

摘要

1 1960年首次發現慢性骨髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML) 患者，其骨髓液染色體中，常可見到一種短小G類染色體，並以發現地點命名為 Philadelphia 染色體；它的存在往往顯示，病患治療效果與其預後都較好。隨後在其它血球癌症中，也有類似與預後研判有關的報導。1973年在G-band染色下，知道正確的情形是t(9;22)(q34;q11.2)；十年後進一步證實，9q34斷裂處在ABL proto-oncogene，其尾段接到22q11.2的BCR後，形成BCR-ABL chimeric基因，同時釐清衍生CML的致癌機制。

近年來在許多類似染色體發現引導下，並結合分子生物學的深究，已陸續發展許多出專一性高、副作用低的「標的型治療 (target therapy)」，此一趨勢在未來的發展，勢必更為蓬勃。由於骨髓液染色體分析的發現，對病患的「診斷確立」、「預後研究」、「治療選擇」等方面，均扮演重要的角色，因此最新的WHO血球癌症診斷分類，也已將染色體分析及相關分生檢驗，與傳統的形態分析、免疫染色和臨床症狀等，併列為主要診斷依據項目。類似的演進亦可見於許多間質細胞腫瘤 (mesenchymal neoplasm)，然而在癌症主要成員「上皮細胞癌 (carcinoma)」方面，確罕有類似的發現，這與其細胞培養的困難度、染色體高度複雜等有密切關係；也因解決此瓶頸的殷切需求，才導致1992年成功發展出基因體競比雜合反應分析技術 (comparative genomic





hybridization; CGH)，藉以有效又客觀地分析癌症細胞，檢試其染色體各處是否有「量」的改變。

8.1 骨髓液染色體分析

8.1.1 相關溶液、試劑及常用步驟

- (1) 常用【離心】：1000-rpm 下離心 10 分鐘。
- (2) PHA-stimulated leukocyte-conditioned medium (PHA-LCM)
 - a. 自健康人 100-mL 全血中，以 Ficoll-Isopaque gradient 分離出淋巴球；經 PBS 清洗三次後，計算其細胞濃度；
 - b. 準備 T75 培養皿，其內含 50-mL RPMI-1640、20% FBS、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Wellcome PHA、100 U/mL PCN、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SM；
 - c. 每一 T75 培養皿加入 5×10^7 淋巴球，在 37°C 及 5% CO_2 之下，培養七天後；
 - d. 將培養液以 0.22 μm Millipore filter 過濾後，在 4°C 冷藏下有效期為三個月。
- (3) 常用藥品：

藥品	容量	品牌 / Cat.No.
RPMI 1640	1Lx10/包	GIBCO-BRL (31800-022)
FCS	500ml/瓶 (04-001-1A)	Biological- industries
10*TE	100ml/瓶	GIBCO-BRL (15400-054)
Colcemid	10ug/ml [10ml/瓶]	GIBCO-BRL (15212-012)
KCl	1kg/瓶	Merck (1.04936.1000)
Methanol	2.5L/瓶	Merck (1.06009.2500)
Acetic acid	2.5L/瓶	Merck (1.00063.2500)
Wright's stain	25g/瓶	Sigma (W-0625)



8.1.2 收受檢體

- (1) 宜先知會實驗室以利準備工作，並備告知臨床診斷及相關檢驗資料。
- (2) 骨髓或淋巴腺檢體之培養，一般以不加 Mitogen（如 PHA）為宜，以免分析到過多正常淋巴球。另外，依不同診斷其處理方式也略有如下之差別。

診斷	培養方式	培養液
AML, ALL	D, 24, 48	CR15
CML, MPD, MDS, Non-Hodgkin's Lymphoma	24, 48	CR15
CML, MPD, MDS, AML	24-48 MTX	CR15, 10% PHA-LCM
ALL, Non-Hodgkin's Lymphoma	24 MTX	CR15

※D, direct preparation; 24 (and 48), culture for 24 (or 48) hours; 24 MTX, 24-hour 合併 methotrexate 處理。

- (3) 依排定時間前往指定病床，帶著【A】【B】兩支 15 mL 試管。
 - A 管供 Direct Preparation 用，其內容為【9 mL 0.54% KCl 加 0.1 mL 秋水仙素 (Colcemid)】；
 - B 管供短期培養用，其內容為【9 mL RPMI 1640】。
- (4) 臨床醫師以 heparin（不含 preservative）充分浸濕針筒，且不將殘餘 heparin 擠掉，直接抽取骨髓液。
- (5) 先以【A管】接取骨髓液，並參考下表 CBC 之 WBC 數值，加入適當【滴數】：

CBC 之 WBC 數值	滴數	CBC 之 WBC 數值	滴數
< 500	30	5,000~7,500	3
500 ~1,000	20	7,500~15,000	2
1,000~2,500	10	15,000~45,000	2
2,500~5,000	6	> 45,000	1

- (6) 然後【B管】接取 10 mL 骨髓液（一般是 3~5 ml；若 WBC 太少則取 10 ml），隨即充分搖勻並速回實驗室。
- (7) 若患者周邊血液其 WBC 數 > 10,000，且含 > 10% Blasts，亦接受處理。
- (8) 若緊急或院外病例，則將 5 mL 骨髓液注入含【9 mL CR-15】，並儘速送至實驗室。





- (9) 淋巴腺 (Lymph node) 檢體在切取後，立即置入CR15並儘速送到實驗室。經初步清洗後，以刀片或剪刀將組織搗碎，以使其中淋巴球分離出來；清洗過後計算其細胞濃度；然後以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 濃度進行培養。
- (10) 固型腫瘤 (solid tumor) 染色體分析，相較於骨髓液和淋巴腺等檢體，其困難度會大得多。主要原因來自：
 - a. 整塊組織中細胞之分散 (disaggregate)；
 - b. 組織細胞活性 (viability) 難於維護；
 - c. 來自組織中非癌細胞的干擾；
 - d. 癌組織中細胞的高度多樣性 (heterogeneous)。

8.1.3 直接收取中期細胞 (Direct Preparation)

- (1) 將【A管】置於 37°C 下30分鐘。此時須配妥固定液【甲醇：醋酸=2：1】，並置於冰箱上層冷凍櫃。
- (2) 將上述低張溶液作用後的試管，先加入兩滴【2：1固定液】，【離心】，吸除上清液，將管底細胞打均勻。
- (3) 將試管置於震盪器上，緩慢加入約1-mL【2：1固定液】，並藉之助搖均勻，而後續加冰冷之【2：1固定液】至10-mL。
- (4) 置於 -20°C 下，作用約20分鐘。至此，若將試管置於 -20°C 下，則其下一步驟可於數小時，或隔夜後繼續進行。
- (5) 經【離心】後，吸除上清液後，將細胞打均勻；加入10 mL【2：1固定液】，置 -20°C 下20分鐘。重複兩次此固定及清洗步驟。
- (6) 如果細胞沉澱，仍呈暗棕色，應再重複上述固定液清洗步驟，直至細胞沉澱呈乳白色為止。

8.1.4 短期細胞培養法 (Short-term Culture Method)

- (1) 經【離心】後，吸除上清液後，將管底細胞打均勻。



- (2) 再加 10 mL CR15 將細胞混勻（清洗）。【離心】後吸除上清液，留下 1 mL 並將管底細胞打勻。
- (3) 拿實驗室用 T25（二盒）分別標示【B1】和【B2】，加 10 mL 已預溫至 37°C 的 CR15，各加 1×10^7 （因為濃度是 $1 \times 10^7/\text{ml}$ ）細胞量，搖勻。
- (4) 其中【B1】管：置 37°C 培養 24 小時後；離心，去除上清液，將管底細胞打勻，加入 14 ml 0.54% 低張溶液，且同時加入 0.1 ml 秋水仙素 (Colcemid)，置 37°C 下作用 25 分，逕行依上述（8.1.3 之 (2)）步驟固定及收取中期細胞。
- (5) 其中【B2】管：置 37°C 下培養至少 3 小時後，再依下述以 Methotrexate 匯集分裂中期細胞方式進行。

8.1.5 細胞同步培養法 (Synchronization Culture Method)

- (1) 在 37°C 下【B2】管經培養至少 3 小時後，加入 0.1 mL Methotrexate 貯存液【 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ；其作用濃度為 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 】，繼續在 37°C 下培養 17 小時（隔夜）。
- (2) 預溫 PBS 及培養液；【離心】吸除上清液後，將細胞打均勻。
- (3) 以 10 mL PBS 將細胞清洗一次；【離心】吸除上清液後，將細胞打均勻。
- (4) 再加入 10 mL 預溫的 CR15 後；再加 0.1 mL Thymidine 貯存液【 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ；其作用濃度為 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 】，在 37°C 下培養 4 小時 45 分。
- (5) 加 0.1 mL 秋水仙素 (Colcemid) 後，37°C 下培養約 20 分鐘。逕行依上述（8.1.3 之 (2)）步驟固定及收取中期細胞。

8.1.6 血液含 > 10% Blasts

- (1) 取四支 15 mL 試管，分別標示 24 H、24 M，並於每管各加 10 mL 已 37°C 預溫 CR15。





(2) 依 CBC 提供之 WBC 數目多寡見下表，加入適當血漿混合液至試管中，搖勻。

WBC #	WBC 血漿混合液
< 10000	0.5 mL
10000 ~ 30000	0.25 mL
> 30000	0.1 mL

(3) 不加 PHA 下。

(4) 置 37°C 下培養，並早晚搖勻一次。並分別在 24 小時、48 小時後，離心，去上清液，將管底細胞打散，同時加入 14 ml 0.54% 低張溶液及 0.1 ml Colcemid，37°C 下 25 分鐘後，再依上述（8.1.3 之 (2)）步驟固定及收取中期細胞。

8.2 基因體競比雜合反應分析 (CGH)

此技術於 1992 年發表，最初發展的用意，是針對不易培養的癌症組織，能藉此分析而知其染色體各處是否有「量」的改變。基本理論是先將未知檢體 DNA (test DNA)，與正常參考檢體 DNA (reference DNA)，分別標記綠色及紅色螢光物；再把等量的兩種已標記 DNA，一起加到載有正常細胞中間期的玻片上，進行競比性雜合反應；經清洗後，再於螢光顯微鏡下，就同一細胞中間期攝取其與綠色紅色螢光的影像；然後由電腦軟體分析染色體各處與綠光紅光的比值，從推算出所測檢體，其染色體某處有增加 (gain) 或減少 (deletion) 的現象。由於染色體交互轉位 (reciprocal translocation) 未涉「量」的改變，故無法用此分析測得其變化。其解析度約為 3~10 Mb (相當於 450-band 水平)，並不優於良好傳統 G-band 分析；但不久的未來，在高密度 array genomic chip 合理取代現行細胞中間期當作探針 (probes) 下，必然會大幅提升其解析度、分析時間與人力。



8.2.1 基因體競比雜合反應分析 (CGH)

1. 相關試劑

試劑	單位	品牌 / Cat.No.
Human Cot-1 DNA	1 mg/ml	Invitrogen (#15279-011)
Polymerase I	10 U/ul	Invitrogen (#18010-017)
Deoxyribonuclease I	140 U/ul	Invitrogen (#18047-019)
Formamide	1 L	Merck (9684)
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	500 g	Merck (6346)
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	500 g	Merck (6580)
NP-40	500 ml	Amresco (BE109)
Proteinase K	100 mg	Clontech (4031-1)
H-1000 (anti-fade)	10 ml	Vector (M0111)
H33258 (Hoechst dye)	100 mg	Amersham Pharmacia Biotech (80-6226-87)
Calf Thymus DNA	250 ug	Amersham Pharmacia Biotech (80-6227-06)
FITC	25 ul	Perkin-Elmer (NEL413)
Texas Red	25 ul	Perkin-Elmer (NEL417)
DAPI	10 mg	Sigma (D9542)
Ethanol Absolute	2.5 L	Scharlau (32221)
Formaldehyde 36.5%	1 L	Riedel-de Haen (15512)
Pepsin	250 mg	Sigma (P6887)
Dextrans Sulfate	100 g	Sigma (D6001)
BSA Acetylated	1.5 mg	Promega (R369D)



2. Nick Translation

(1) 將0.2 mL PCR的試管置於冰上，加入下列混合液後，補二次蒸餾水至25 μ l：

	Reference DNA	Test DNA
DNA (500ng)	μ l	μ l
10X A4	2.5 μ l	2.5 μ l
Texas Red (0.5 mM)	0.5 μ l	
FITC (0.5 mM)		0.5 μ l
DNase I (1 mU)	1.0 μ l	1.0 μ l
Polymerase I (1x)	1.0 μ l	1.0 μ l

- (2) 混合均勻後，以14000 rpm的轉速高速離心。
- (3) 之後放置於16°C PCR反應器中1.5~2.0小時（依DNase I之濃度調整作用時間）。
- (4) 14000 rpm轉速下離心後，取3 μ l跑電泳（1.5%電泳膠）。
- (5) Smear介於500~3000 bp較適合，若長度過大，可延長作用時間。
- (6) 加入2.2 μ l Stop Buffer (0.5M EDTA, pH7.5)，停止酵素作用。

3. 沈澱 (Precipitation)

- (1) 於新的1.5 mL離心管中避光加入：22.0 μ l Test DNA（標定FITC）、22.0 μ l Reference DNA（標定Texas Red）、46.0 μ l Human Cot-1 DNA (1 mg/ml)、24.0 μ l 10 M NH_4OAc 與190.0 μ l 100%冰酒精。
- (2) 混合均勻，14000 rpm轉速下離心；然後，置-80°C冰箱30分鐘或-20°C過夜。
- (3) 4°C下高速離心 (14000 rpm) 20分鐘後，把液體盡可能吸掉。再用真空乾燥機 (SAVANT's Speed Vac) 乾燥DNA（約30分鐘）。
- (4) 加入12 μ l雜合反應液 (Hybridization Solution)（若無繼續下列步驟，則放到4°C冰箱中保存）。

4. 探子變性反應 (Probe Denaturation (PCR program #0))

- (1) 37°C中培養60分鐘（使pellet完全溶解於Hybridization Solution）。
- (2) 76°C中培養10分鐘 (denaturing)。



- (3) 37°C 中培養 1.5 小時 (reannealing)。
- (4) 0°C 冰上 (blocking)，直到 slide denaturation 完成後。

5. Slide Denaturation

- (1) 取 50 ml Denaturing Solution 至塑膠染色壺之中，水浴中預熱至 73°C 備用。
- (2) 自 95% 酒精中取出玻片（平時保存於 -20°C 冰箱中），以鑽石筆在玻片背面圈畫出欲進行雜合反應的區域。
- (3) 於 120 rpm 之振盪器依序進行下列步驟：

Pepsin / 0.01N HCl	37 °C	30 秒
1X PBS	RT	5 分鐘
1X PBS	RT	5 分鐘
1X PBS / 1M MgCl ₂	RT	rinse
1% Formaldehyde	RT	1 分鐘
1X PBS	RT	5 分鐘

- (4) 室溫下，玻片依序行酒精脫水兩分鐘：70% → 85% → 100% → 風乾。
- (5) 而後將玻片置於 73°C 之 Denaturing Solution 中 3 分鐘。
- (6) 室溫下，玻片依序行酒精脫水兩分鐘：70% → 85% → 100% → 風乾。

6. 雜合反應 (Hybridization)

- (1) 將 12 µl 已標記的 DNA 加到玻片上欲進行雜合反應區域。
- (2) 蓋上蓋玻片（避免氣泡產生），再以 rubber cement 封片。
- (3) 將玻片放入潮濕之保鮮盒中，於 37°C 中避光培養 72 小時。

7. 雜合反應後洗濯 (Post-Hybridization Wash)

- (1) 兩個裝有 50-ml Washing Solution 塑膠染色壺，水浴中預熱至 45°C 備用。
- (2) 玻片依序於下列溶液中洗濯（100 rpm 之振盪器）：





Washing Solution I	45 °C	10分鐘
Washing Solution II	45 °C	10分鐘
2X SSC	RT	10分鐘
PN buffer	RT	10分鐘
PN buffer	RT	10分鐘
PN buffer	RT	10分鐘
ddH ₂ O	RT	rinse
DAPI (200ng/ml)/ 2X SSC	RT	10分鐘
2X SSC	RT	rinse
ddH ₂ O	RT	rinse

- (3) 玻片風乾後，滴 10 μ l 的 Antifade Solution 於玻片上。
- (4) 蓋上蓋玻片（避免氣泡產生）後，置於 4°C 中避光保存（隔天之後觀察，染色帶較清楚）。

8. Capture (Applied Imaging: CytoVision System)

- (1) 選擇 DAPI filter，在 10X 物鏡下，選擇散佈適中之細胞中間期，再轉至 100X 油鏡，並微調焦距，不選擇不超過兩個交叉（4 條染色體）之細胞中間期，進行拍攝。
- (2) 拍攝 20 個長度相近、散佈適中之細胞中間期。（目的：可挑選雜合反應 Hyb 較佳的細胞中間期分析）
- (3) 螢光之拍攝依序為：FITC \rightarrow Texas Red \rightarrow DAPI。

9. Analysis (Applied Imaging: CytoVision System)

- (1) 點選要分析之細胞中間期，相連的染色體以【Split】分割，交叉的染色體則不列入分析。
- (2) 選擇【Auto Karyotype】自動排列，再確認染色體是否都放置在正確的位置上。
- (3) 在【Customize】下點選【Draw Axes】與【Centromere】，選擇單一條染色體後，則可修正其中心軸與著絲點 (centromere) 之位置，而後點選【Save】。
- (4) 重複上述步驟，直到每支染色體分析的數目 \geq 15 支。



- (5) 一般CGH分析：在【CGH profile image】下點選【Profile Display】，而後勾選【Slide average】、【Confidence (99%)】與【Thresholds (Fixed limits: Low 0.80, High 1.20)】。染色體各部分之綜合分析數值：若低於0.80會顯示紅色，表示該處有缺失 (deletion)；若高於1.20則呈現綠色，表示該處有增加 / 放大 (gain/amplification)。
- (6) 高解析度CGH分析：在【CGH profile image】下點選【Profile Display】，而後勾選【Slide average】、【Confidence (99.5%)】與【Thresholds: Std. Reference Intervals 與 Fit automatically】。此法分析之解析度較佳，同時可排除染色體著絲點或終端處，未被 Human Cot-1 DNA 完全 block 之重複序列所造成的假陽性現象。理想狀況下，各實驗室應先以本身操作方式，分析正常男、女檢體各10例，並建立自己的SRI (Standard Reference Interval)。



