

鱼类 HGPRT 缺陷型细胞的诱变和筛选*

甘新生 陆仁后

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

草鱼卵巢细胞 GCG 经乙基甲磺酸(EMS)诱变, 稳定表达 3 代以后, 采取逐步提高培养基中 6-巯基嘌呤(6-MP)的方法, 获得对 6-MP 稳定抗性的细胞, 暂定名 FMR-1。

本文比较了 GCG 细胞及 FMR-1 细胞在含 6-MP(20 μ g / ml)和不含 6-MP 的培养基中生长曲线的特点, 并对上述两种细胞的染色体数目和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶电泳图谱进行了比较分析。最后对两种细胞在 HAT 培养基中的生长特点进行了平行对照实验, 根据实验结果, 可以判定 FMR-1 细胞为草鱼 HGPRT 缺陷型细胞。

本文还讨论了进一步研究草鱼 HGPRT 缺陷型细胞的途径及草鱼 HGPRT 缺陷型细胞在鱼类细胞遗传学上的应用前景。

关键词 鱼类、诱变和筛选、6-巯基嘌呤、HGPRT 缺陷型细胞

HGPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)是核酸代谢的补救途径中的一个嘌呤补救途径酶, 可为核苷酸的合成提供一条应急通路^[1]。

对嘌呤类似物 6-巯基嘌呤(6-MP)、6-巯基鸟嘌呤(6-TG)以及 8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)抗性的细胞一般都涉及到 HGPRT 的缺失^[2]。由于上述嘌呤类似物在缺乏此酶的细胞中不被利用合成毒性核苷酸, 因而能够成活, 而正常的含有 HGPRT 的细胞, 由于合成了毒性核苷酸而死亡。

50 年代末, Szybalski 和 Smith 率先用 8-AG 筛选了人类抗性细胞^[3]; Littlefield 利用上述原理发展了一种分离 HGPRT 缺陷型细胞的通用方法^[4]。

以哺乳类动物细胞为材料, 用自发和诱变方法获得 HGPRT 缺陷型细胞的有关报道很多^[5-13]。本文试图用哺乳类 HGPRT 缺陷型细胞的诱变和筛选方法, 对鱼类 HGPRT 缺陷型细胞的诱变和筛选做一些尝试。期望通过上述研究, 得到鱼类 HGPRT 缺陷型细胞, 并将其作为以后进行鱼类遗传学研究的材料。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

草鱼卵巢细胞 GCG 由本所陈燕燊建立(未发表), 本室体细胞遗传学研究组转赠。

* 淡水生态与生物技术国家重点实验室课题的部分工作。

1992 年 1 月 4 日收到。

工作培养基为含 15% 小牛血清的 TC-199, 其中无枝原体小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所, 使用前在 56℃ 水浴箱中处理 1h(灭活), 未经透析; TC-199 为美国 GIBCO 实验室产品(Life Technologies, Inc.); 培养温度为 27℃, pH 为 7.4 至 7.6; 细胞消化液为 ET(含 0.25% 胰蛋白酶和 0.03% EDTA 缺钙镁离子的磷酸缓冲液 PBS)。

1.2 生化药品

6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 简写为 6-MP)为 Fluka 公司产品, 用 0.5% Na_2CO_3 配成 1.0mg / ml 的溶液, 过滤除菌, -20℃ 保存。

次黄嘌呤(hypoxanthine)及胸腺嘧啶核苷(thymidine)分别是 Fluka 和 Sigma 公司产品, 双蒸水配成浓度为 1.36mg / ml 和 0.39mg / ml 的 HT 母液, 过滤除菌, -20℃ 保存。

氨基喋呤(aminopterin)为 Fluka 公司产品, 双蒸水配成 1.76×10^{-2} mg / ml 的 A 母液, 过滤除菌, -20℃ 保存。

乙基甲磺酸(ethyl methane sulfonate, 简称 EMS)为 Sigma 公司产品, 用 PBS 配成 12.5mg / ml 的母液, 过滤除菌, 4℃ 保存。

1.3 抗性细胞的诱变与筛选

对数生长期的 GCG 细胞经 ET 消化, 用含 300 μg / ml 乙基甲磺酸(EMS)的 TC-199 培养基将细胞分散成 3.0×10^5 cells / ml 的细胞悬液, 接种于培养瓶中, 每瓶 3.5ml, 于 27℃ 培养 72h, 细胞长成单层。再以 ET 消化、传代; 并用普通培养基(不含 EMS)传代 3 次, 使其突变得到稳定表达^[14]。

经诱变处理的细胞用 ET 消化后, 制成 3.0×10^5 cells / ml 的细胞悬液, 吸入培养瓶, 加入 6-巯基嘌呤(6-MP)溶液, 使其在培养瓶中的最终浓度为 4 μg / ml, 按上述同样步骤传代 3 次, 再将培养基中 6-MP 的浓度提高到 8 μg / ml, 传代 4 次; 转入普通培养基(不含 6-MP)中培养, 并传代 2 次, 然后将培养基中 6-MP 的浓度提高到 20 μg / ml, 传代 5 次, 又在普通培养基(不含 6-MP)中传代 3 次, 培养基中 6-MP 的浓度提高到 40 μg / ml, 传代 3 次; 最终将培养基中 6-MP 的浓度提高到 100 μg / ml, 传代 1 次, 转入含 30 μg / ml 6-MP 的培养基中传代培养。

筛选过程如图 1 所示:

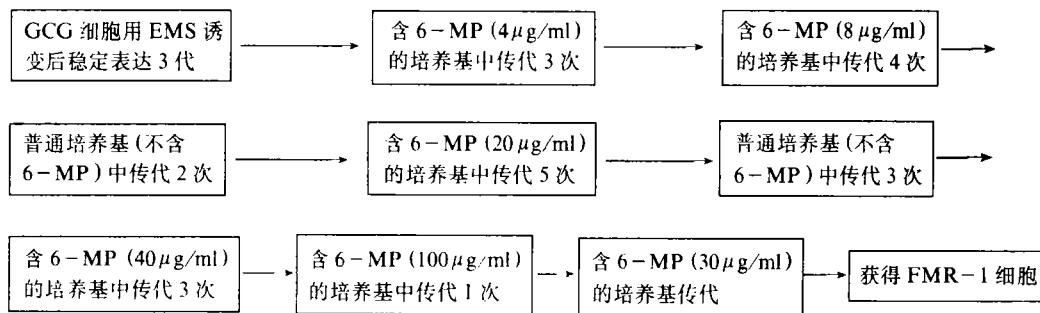


图 1 FMR-1 细胞的筛选程序

Fig.1 Procedures of Selecting FMR-1 cells

1.4 GCG 细胞在含 6-MP(20 μg / ml)与不含 6-MP 的培养基中生长曲线的比较

将 GCG 细胞用 ET 消化,用培养基将其制成 $2.8 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 的细胞悬液,分别在加 6-MP ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基和不含 6-MP 的培养基中培养,培养温度为 27°C ,于第 2、4、6、9 天各任取 3 瓶细胞,经 ET 消化后分别用血球计数板计数每 ml 所含的细胞数,取平均值。

1.5 筛选细胞在含 6-MP ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) 与不含 6-MP 的培养基中生长曲线的比较

将筛选细胞用 ET 消化后,用培养基将其制成 $1.8 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 的细胞悬液,分别在加 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基和不加 6-MP 的培养基中培养,培养温度为 27°C ,于第 2、4、6、9 天各取 3 瓶细胞,分别经 ET 消化后用血球计数板计数每毫升所含的细胞数,取平均值。

1.6 GCG 细胞和筛选细胞在 HAT 培养基中的生长情况

将 GCG 细胞和筛选细胞分别用 ET 消化,用培养基重悬细胞,按 1 瓶传 3 瓶传代,在加 HAT 的培养基中 (10^{-4}M hypoxanthine, $5 \times 10^{-6}\text{M}$ aminopterin, $4 \times 10^{-5}\text{M}$ thymidine) 培养,培养温度为 27°C ,同时有意识地将部分培养瓶中的“A”(aminopterin) 的浓度提高到原配方的 5 倍和 10 倍(各为 2 瓶细胞),“H”和“T”的浓度维持不变,逐日观察它们的生长情况,并选择在接种后第二天和第五天的各类细胞于倒置显微镜下拍照。

1.7 GCG 细胞及筛选细胞的染色体数观察

GCG 细胞和筛选细胞传代后 36h,加秋水仙胺(最终浓度为 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$)作用 4h,ET 消化,离心,1% 柠檬酸钠溶液低渗 20min,用 3:1 甲醇醋酸固定液固定 2 次,每次 15min,滴片,自然干燥后用 Giemsa 染色 20min,用自来水冲洗,干燥后镜检并拍照。

1.8 GCG 细胞与筛选细胞的同工酶比较

将 GCG 细胞和筛选细胞用 ET 消化,制成细胞悬液,血球计数板计数,使 GCG 细胞和筛选细胞的数量均为 5.0×10^6 ,1000rpm 离心 5min,用 0.85% NaCl 溶液重悬细胞,再离心,重悬细胞;重复 3 次,最后一次留 0.1ml 溶液,重悬细胞,在液氮中冻存 2min,取出使其融化,重复 3 次,最后用 10000rpm 离心,取上清 30μl 点样,按鄂征^[15]等的方法进行葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)的电泳分析,染色后拍照。

2 结果

2.1 抗 6-MP 细胞筛选过程中细胞形态及生长情况的显微镜观察

GCG 细胞经 EMS 诱变处理,突变稳定表达 3 代后,在低浓度(4 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$)的 6-MP 培养基中,细胞增长速度降低,细胞界限比较模糊,有时又有形态拉长的特征,培养基 pH 值变化也较慢,GCG 细胞在普通培养基中生长 4 天,其 pH 值从 7.6 变为 6.5,而在含 6-MP 的培养基中生长 4 天,pH 值则仅从 7.6 变为 7.3。

细胞在含 6-MP ($8\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基稳定培养 3 代后,将细胞按 1 瓶传 6 瓶传代,在含 6-MP ($8\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中生长,逐日观察,由于细胞密度较低,可以看到贴壁细胞由零散的细胞逐渐繁殖成许多小块的细胞,最后各小块细胞逐步扩大连成单层的过程。

每次提高培养基中 6-MP 的浓度时,均可观察到细胞大量死亡,少量细胞贴壁并逐渐长成单层。

当筛选细胞在普通培养基中生长时,可见细胞增长较快,1 瓶传 3 瓶,细胞一般 4—5 天即可长成单层,形态如常。

筛选细胞经过 1 次培养基中 6-MP 的浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的强力筛选, 可观察到细胞死亡较多, 增长更慢, 经过 12 天才长成单层, 然后将此细胞恢复到含 6-MP 为 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基中生长, 生长情况正常, 一般情况下 1 瓶细胞传 3 瓶, 5—7 天即可长成单层, 暂将此细胞定名为 FMR-1。

2.2 GCG 细胞在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 和不含 6-MP 的培养基中的生长曲线比较(图 2)。

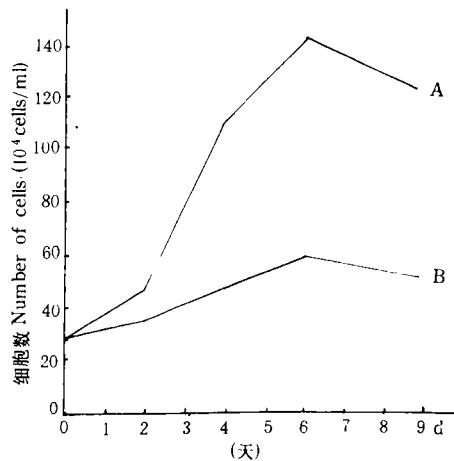


图 2 GCG 细胞的生长曲线

- A. GCG 细胞在普通培养基中的生长曲线
- B. GCG 细胞在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中的生长曲线

Fig.2 The growth curves of GCG.

- A. The growth curves of GCG in medium containing no 6-MP.
- B. The growth curves of GCG in medium containing 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$).

从图 2 看出, 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 对 GCG 细胞的增长具有明显的抑制作用。

GCG 细胞在普通培养基中生长, 一般 4 天即可长成单层, 6 天以后细胞开始老化、脱落。

GCG 细胞在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中, 部分细胞贴壁, 生长缓慢, 不能形成致密单层, 6 天以后细胞开始缓慢脱落、死亡。

2.3 FMR-1 细胞(即筛选细胞)在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 和不含 6-MP 的培养基中的生长曲线比较(图 3)。

从图 3 看出, FMR-1 细胞在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中的生长曲线与在普通培养基中的生长曲线基本相似, 能正常生长(图版 I:1), 但仍有差异, 6-MP 对 FMR-1 细胞的生长仍有一定程度的抑制, FMR-1 细胞一般 6 天可长成致密单层, 第 7 天细胞开始老化, 脱落。

2.4 GCG 细胞和 FMR-1 细胞在 HAT 培养基中的生长情况

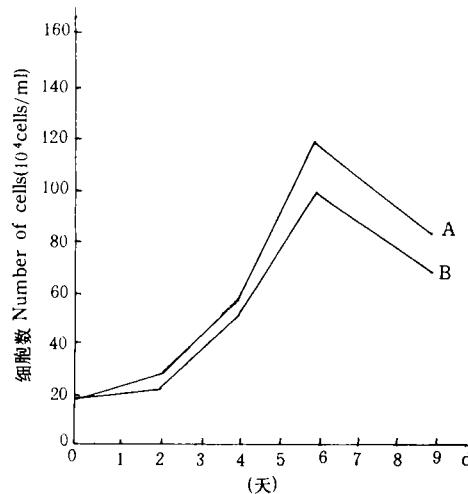


图 3 FMR-1 细胞的生长曲线比较

- A. FMR-1 细胞在普通培养基中的生长曲线
- B. FMR-1 细胞在含 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中的生长曲线

Fig.3 The growth curves of FMR-1.

- A. The growth curves of FMR-1 in medium containing no 6-MP.
- B. The growth curves of FMR-1 in medium containing 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$).

GCG 细胞在 HAT 培养基中生长如常,于接种后第二天、第五天拍照并计数(接种时细胞密度为 2.5×10^5 cells / ml) (图版 I: 2),计数细胞的结果分别为 3.26×10^5 cells / ml 和 10.7×10^5 cells / ml,在氨基喋呤(A)的浓度为原配方的 5 倍和 10 倍的培养基中,GCG 的生长情况与上述情况基本一致(图版 I: 3, 4)。

FMR-1 细胞在 HAT 培养基中的生长情况,接种后第一天有部分细胞贴壁,第二天即有细胞脱落(图版 I: 5);第五天细胞成一团团形状,形态不佳,但仍有少量细胞生长(图版 I: 6)。

在 5 倍氨基喋呤的培养基中,FMR-1 细胞的生长情况与上述情况基本相似,只是第五天成活的细胞更少。

在 10 倍氨基喋呤的培养基中,接种后第一天有少量细胞贴壁,到第五天 FMR-1 细胞全部脱落,死亡(图版 I: 7, 8)。

2.5 GCG 细胞与 FMR-1 细胞的染色体比较

GCG 细胞染色体数目的变化范围是 38—56 条,其中最多是 54 条,占统计数目的 34.5%,50 条以上(含 50 条)的占总数的 62.0%;FMR-1 细胞的染色体数目的变化范围是 24—54 条,其中最多的是 48 条,占统计总数的 43.5%,50 条以下(不含 50 条)的占总数 87.0%(表 1)。

表 1 GCG 和 FMR-1 的细胞及染色体数

Tab.1 Cell and chromosome numbers of GCG and FMR-1

染色体数目 number of chromosomes	26	36	38	40	44	46	48	50	52	54	56	细胞总数 total number of cells
细胞数 number of cells(GCG)			2	7	5	2	4	9	7	20	2	58
细胞数 number of cells (FMR-1)	4	2	3	1	7	3	20	2	3	1		46

从上表可以看出,FMR-1 细胞的染色体数目较 GCG 细胞的染色体数目有减少的趋势,这两种细胞的染色体见(图版 I: 10, 11)。

2.6 GCG 细胞与 FMR-1 细胞的同工酶比较

GCG 细胞与 FMR-1 细胞的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)的电泳图谱基本相似(图版 I: 9)G-6-PD 图谱均为一条区带,只是 FMR-1 细胞的 G-6-PD 区带染色略淡。

3 讨论

3.1 一般来说,HGPRT 缺陷型细胞应具下列特征:

3.1.1 能在含一定浓度的嘌呤类似物的培养基中正常生长;

3.1.2 不能在 HAT 培养基中生长。

符合上述两个条件的细胞系即可确定为 HGPRT 缺陷型细胞系^[16],但并不说明该细胞系绝对不含 HGPRT^[12],所以若要确定其缺陷程度,尚需对 HGPRT 进行电泳分析。

满足上述第一个条件,即表明该细胞系对嘌呤类似物具抗性,不利用嘌呤类似物合成

毒性核苷酸, 细胞得以生长; 满足上述第二个条件, 说该细胞系的嘌呤合成途径被氨基喋呤阻断后, 由于该细胞系缺乏 HGPRT 而不能合成或不能将足量的次黄嘌呤合成次黄苷酸, 所以细胞死亡^[17]。

本文报道的草鱼筛选细胞 FMR-1 符合上述两个条件, 故可以证实为草鱼 HGPRT 缺陷型细胞, 并可用于杂种细胞的筛选。为了确定其 HGPRT 的缺陷程度, 作者还将进一步对 FMR-1 细胞系进行 HGPRT 电泳分析。

3.2 三十年来大量关于筛选 HGPRT 缺陷型细胞的报道表明, HGPRT 缺陷型细胞的缺陷程度与其所耐受培养基中的嘌呤类似物的浓度相关。首先, 不同的细胞系对嘌呤类似物的敏感性各不相同, 以第四天 50% 生长被抑制时的氮杂鸟嘌呤(8-AG)的含量为标准, 对中华仓鼠不同敏感细胞系进行检测, 所得的结果从 33—60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不等^[18], 说明各种来源的细胞系对嘌呤类似物的敏感性存在着相当大的差异; 其次, 同一细胞系在不同浓度的嘌呤类似物的培养基中生长, 所获得的抗嘌呤类似物细胞, 其 HGPRT 活性程度亦存在着差别。Carla M.Wood 等用色素沉积干燥病患者的成纤维细胞经乙基甲磺酸(EMS)和博莱霉素(Bleomycin)诱变, 在不同浓度(10—100 μm)的 6-巯基鸟嘌呤(6-TG)培养基中筛选 HGPRT 缺陷型细胞, 对所获得的 6-TG 抗性细胞分别进行 HGPRT 酶活性测定, 结果发现随着培养基中的 6-TG 浓度从 10 μm 提高到 100 μm , 其 HGPRT 活性从相当于正常细胞 HGPRT 活性的 51.0% 下降至 0.9%^[19], 从中可以看出 HGPRT 活性的降低(表明 HGPRT 缺陷程度)与其抗 6-TG 的浓度具有一定的相关性。

从本文的实验结果来看, 当培养基中 6-MP 的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 接种后第四天细胞计数的结果表明, GCG 细胞在含 6-MP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的培养基中生长的细胞数量仅为在普通培养基生长的细胞数量的 43.9%, 说明 GCG 细胞的 6-MP 半数抑制量低于 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 筛选细胞的培养基中 6-MP 的浓度升至 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 并经多次传代后, 所获得细胞对 6-MP 的抗性明显增强; 经过 6-MP 的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基的强力筛选后, 所获得的细胞在 6-MP 为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基中生长如常, 即可认为该细胞为 6-MP 抗性细胞, 而对照的 GCG 细胞在含 6-MP 为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基中生长 6 天后再经 6-MP 为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基传代 1 次, 细胞即全部死亡, 说明 GCG 细胞对 6-MP 敏感。

另外, 采取逐步提高培养基中 6-MP 浓度的筛选方法, 可以避免“一步法”(single-step)筛选导致细胞因不适应环境而引起的大量死亡¹⁾, 从而获得稳定抗性的细胞。

3.3 获得 6-MP 抗性细胞仅仅是筛选 HGPRT 缺陷型细胞的第一步, 据资料表明, 该细胞存在着既对嘌呤类似物抗性, 又对 HAT 抗性的双重性^[20], 这样的细胞往往只是部分 HGPRT 缺陷型^[9], 所以对 6-MP 抗性细胞必须进行 HAT 培养基的培养试验, 观察其对 HAT 培养基是否敏感, 从而可以进一步确定其是否为 HGPRT 缺陷型细胞。由本实验结果表明, GCG 细胞对常规的 HAT 培养基不敏感, 而 FMR-1 细胞则很敏感, 在 HAT 培养基中仅有少量细胞幸存; 当加大“A”的浓度至原配方的 5 倍时, 幸存的细胞更少; 当

1) 张锡元编, 1987. 体细胞遗传学(武汉大学讲义), 第 151 页。

“A”的浓度加大至原配方的 10 倍时,细胞全部死亡,说明 FMR-1 细胞对“A”的耐受性不完全一致,造成不一致的原因可能有两个方面:**<1>**FMR-1 细胞群体内 HGPRT 的缺陷程度有差异;**<2>**细胞来源不同,对“A”的敏感性有异,因为卵巢组织并非由单一类型的细胞组成。为获得单一类型的细胞,作者正在进行 FMR-1 细胞的克隆筛选工作。

3.4 随机检查 GCG 细胞及 FMR-1 细胞的染色体, FMR-1 细胞染色体数目与 GCG 染色体数目的变化范围差异不大,与 Cox 等有关人类 HGPRT 缺陷型细胞及其母本细胞的染色体数比较的结果类似^[21]。但 FMR-1 细胞的染色体数总的的趋势是少一些,这是否与 6-MP 抗性相关尚待进一步研究。

3.5 检测 GCG 细胞和 FMR-1 细胞的 G-6-PD 同工酶,两种细胞的实验结果类似。Wood 等^[22]在检测小鼠 HGPRT 缺陷型细胞的其它酶类活性时,亦发现野生型细胞与 HGPRT 缺陷型细胞的其它酶类活性水平无明显差异。在人类细胞中 HGPRT 基因与 G-6-PD 基因连锁^[23],从本文的实验结果来看,草鱼细胞存在着下列两种可能:

3.5.1 HGPRT 基因与 G-6-PD 基因并非连锁的两个基因,故前者的突变不影响后者;

3.5.2 HGPRT 基因与 G-6-PD 基因连锁,但由于 EMS 诱导的突变主要为点突变^[24],所以不引起 G-6-PD 基因的突变。

3.6 七十年代以来,人们开始注意到小牛血清的内含物次黄嘌呤和鸟苷酸酶干扰实验结果的问题^[25-27].

3.6.1 一般来说, HGPRT 对次黄嘌呤、6-巯基嘌呤的亲和力(affinity)相等,对鸟嘌呤的亲和力则低一些^[22];据此可认为 HGPRT 对次黄嘌呤和 6-巯基嘌呤可以均等作用,同时将两者掺入核苷酸,如果 6-巯基嘌呤在培养基中的浓度超过次黄嘌呤,则核苷酸中掺入的 6-巯基嘌呤多一些;只要有一定量的 6-巯基嘌呤掺入核苷酸,野生型细胞即死亡,而 HGPRT 缺陷型细胞则可以生存;

3.6.2 血清中的鸟嘌呤酶主要对 8-氮杂鸟嘌呤有活力,而对 6-巯基嘌呤(6-MP)无活力^[28],所以不会对本实验有干扰。

3.7 在鱼类中筛选 HGPRT 缺陷型细胞,是一个探索性的尝试。鱼类 HGPRT 缺陷型细胞将作为一种标记细胞在鱼类细胞遗传学研究中大有可为。首先,在鱼类基因转移实验中将是一个良好的材料。日本学者小岛吉雄已经成功地利用微细胞转移技术将鱼类 HGPRT 基因导入鼠类 HGPRT 缺陷型细胞,并得到表达^[29],说明 HGPRT 缺陷型细胞作为受体细胞在基因转移的实验中有所作为;其次,鱼类 HGPRT 缺陷型细胞可以作为细胞杂交的材料,应用于基因定位以及鱼类细胞遗传学的筛选系统等方面;再次,鱼类 HGPRT 缺陷型细胞还是探索基因突变的良好材料。HGPRT 基因不仅存在于高等脊椎动物,甚至在细菌中也存在着类似的基因。

总之,HGPRT 及其基因的研究对诱发细胞突变型、发展基因转移技术、研究嘌呤代谢的调节和细胞遗传的发展中都起着重要作用。为鱼类 HGPRT 缺陷型细胞的筛选将更加丰富 HGPRT 及其基因的研究成果,为鱼类细胞遗传学的发展做出新贡献。

参 考 文 献

- [1] Ringertz N R, Savage R E. Cell hybrids. Academic Press, New York, 1976, 150—151.
- [2] Brockman R W, Anderson E P. Biochemistry of cancer. *Ann. Rev. Biochem.*, 1963, **32**: 463—472.
- [3] Szybalski W, Smith M J. Genetics of human cell lines I. 8-azaguanine resistance, a selective "single step" marker. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, **101**: 662—666.
- [4] Littlefield J W. The inosinic acid pyrophosphorylase activity of mouse fibroblasts partially resistant to 8-azaguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1963, **50**: 568—576.
- [5] Brockman R W, Kelley G G, Stutts P, Copeland V. Biochemical aspects of resistance to 6-mercaptopurine in human epidermoid carcinoma cells in culture. *Nature*, 1961, **191**: 469—471.
- [6] Fujimoto W Y, Seegmiller J E. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: activity in normal, mutant, and heterozygote-cultured human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, **65**: 577—584.
- [7] Fujimoto W Y, Subak-sharpe J H, Seegmiller J E. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: chemical agents selective for mutant or normal cultured fibroblasts in mixed and heterozygote cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**: 1516—1519.
- [8] Isamat M, Macleod K F, King A, et al. Characterization, evolutionary relationships, and chromosome location of processed mouse HPRT pseudogene. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1988, **14**: 359—369.
- [9] Jones I M, Burkhardt-Schultz K, Crippen T L. Cloned mouse lymphocytes permit analysis of somatic mutations that occur in vivo. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1987, **13**: 325—333.
- [10] Klebe R J, Chen T R, Ruddle F H. Controlled production of proliferating somatic cell hybrids. *J. Cell Biol.*, 1970, **45**: 74—82.
- [11] Littlefield J W. Three degree of guanylic acid-inosinic acid pyrophosphorylase deficiency in mouse fibroblasts. *Nature*, 1964, **203**: 1142—1144.
- [12] Skaper S D, Seegmiller J E. Purine metabolism in thioguanine-resistant glioma cells. *Exptl. Cell Res.*, 1976, **100**: 415—417.
- [13] Yang T P, Stout J T, Konechi D S, et al. Spontaneous reversion of Novel Lesch-Nyhan mutation by HGPRT gene rearrangement. *Somatic Cell*, 1988, **14**(3): 293—303.
- [14] O'neill J P, Hsie A W, Phenotypic expression time of mutagen-induced 6-thioguanine resistance in chinese hamster ovary cells (CHO / HGPRT system). *Mutat. Res.*, 1979, **59**: 109—118.
- [15] 鄂征. 组织培养技术. 1988, 160—162页. 人民卫生出版社.
- [16] Shay J W. Techniques in Somatic Cell Genetics, Plenum Press, New York and London, 1982, 12—13.
- [17] Szybalski W, Szybalska E H, Ragni G. Genetics studies with human cell lines. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1962, **7**: 75—89.
- [18] Morrow J, Colofiore J, Rintoul D. Azaguanine resistant hamster cell lines not deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *J. Cell Physiol.*, 1978, **81**: 97—100.
- [19] Wood A W, Becker M A, Minna J D, et al. Purine metabolism in normal and thioguanine-resistant neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**(12): 3880—3883.
- [20] Moiseenko E V, Luss E V, Petrova O N, Shapiro N I. Studies of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) mutants exhibiting anomalous behaviour under selective conditions. *Genetika (USSR)*, 1978, **14**: 829—836.
- [21] Cox R, Masson W K. The isolation and preliminary characterization of 6-thioguanine-resistant mutants of human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.*, 1976, **36**: 93—104.
- [22] Wood C M, Moses R E. Ethyl methane sulfonate and bleomycin-generated deletion mutation at HGPRT locus in xeroderma pigmentosum complementation group D fibroblasts. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1989, **15**: 345—357.
- [23] Ruddle F H, Creagan R P. Parasexual approaches to the genetics of man. *Ann. Rev. Genet.*, 1975, **9**: 407—486.
- [24] Fuscoe J C, Fenwick R G, Jr., D H, et al. Deletion and amplification of the HGPRT locus in Chinese hamster

- cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1983, **3**: 1086—1096.
- [25] Peterson A R, Peterson H, Heidelberger C. The influence of serum components on the growth and mutation of Chinese hamster cells in medium containing aminopterin. *Mutat. Res.*, 1974, **24**: 25—33.
- [26] Peterson A R, Krahn D F, Peterson H, et al. The influence of serum components on the growth and mutation of Chinese hamster cells in medium containing 8-azaguanine. *Mutat. Res.*, 1976, **36**: 345—356.
- [27] Vaughan M H, Steele M W. Differential sensitivity of human normal and malignant cells to 8-azahypoxanthine in vitro. *Exptl. Cell. Res.*, 1971, **69**(1): 92—96.
- [28] Willems G J, van der Horst, J., Bootsma D. Transfer of the human X chromosome to human-Chinese hamster cell hybrids via isolated HeLa metaphase chromosomes. *Somat. Cell Genet.*, 1976, **2**: 359—371.
- [29] Ojima Y, Takarada Y, Takai A. Microcell-mediated transfer of fish chromosomes into mouse cells. *Proc. Japan Acad.*, 1986, **62**, ser., B (3): 91—94.

THE INDUCTION AND SELECTION OF HGPRT-DEFICIENT CELL MUTANTS IN FISH

Gan Xinsheng and Lu Renhou

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The cell line GCG originating from the ovary of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* cur. et val) was treated with ethyl methane sulfonate (EMS) for 72 hours. After stable expression of mutation for 3 passages, the cells were treated with 6-mercaptopurine (6-MP) from $4\mu\text{g}/\text{ml}$ to $100\mu\text{g}/\text{ml}$ by stepwise procedures. The isolates did not grow in HAT mediums. Mutants, which have been named FMR-1, and which are deficient in hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) were obtained.

Identification of biological characteristics of FMR-1 cells showed that chromosomes decreased in number compared with those of the parental GCG cells. The growth curves of FMR-1 cells and GCG cells in TC-199 mediums which contained 6-MP ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) and no 6-MP were also illustrated and compared. The electrophoretogram of G-6-PD isoenzyme of FMR-1 cells displayed almost the same patterns as that of GCG cells.

Further measures to study on the fish HGPRT-deficient cells and possible application of these cells are discussed.

Key words Fish, Induction and Selection, 6-mercaptopurine, HGPRT-deficient cell mutants