

溶液中,在 20℃ 160000g 条件下离心 72 小时。

收集含有 DNA 区带的部分,装入透析袋里,用 10mM EDTA 和 100mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液透析。

(四) 冷酚法

将离心收集的细胞悬浮于 pH7.4 的 0.15M 氯化钠和 0.1M EDTA 中。加 1 毫克/毫升的蛋白酶 K (pronaseK),再加 20% 的 SDS,使最终浓度为 0.3%,在 37℃ 保温 16 小时。加等体积的重蒸酚,抽提三次。用十分之一浓度的 SSC 透析水相三到五次。

(五) 折叠染色体的提取法

大肠杆菌细胞在 4℃ 下离心收集之后。0℃ 下悬浮于 0.5 毫升 pH 8.2 缓冲液 (10mM Tris-HCl、0.1 M NaCl 和 20% 蔗糖溶液)中。

加入溶菌酶 (0.1 毫升含有 4 毫克/毫升溶菌酶、0.12M Tris-HCl, pH7.2 和 0.05M EDTA),在冰上放置 40 秒。紧接着加入 0.5 毫升 1% Brij-58、0.4% 脱氧胆酸盐、0.01 M EDTA 和 10mM 精胺 HCl 溶液。细胞在 10℃ 下处理三

分钟被溶解。

溶解的细胞用 12—60% 蔗糖梯度 (含有 0.01M Tris-HCl、pH 8.2、1mM 二巯基乙醇、1mM EDTA 和 5 mM MgCl₂),在 4℃ 下以 9000g 离心 17 分钟,离心管中出现三条带(上、中、下),用吸管吸出离心管中间出现一条乳白色的带,这部份就是折叠的染色体 DNA。需要立即进行实验,否则大约 30 分钟后它就会失去折叠的特性。

上述几个方法是分离制备 DNA 比较常用的方法。除此之外,还有酸酚提取法,碱变性制备法等都是根据 DNA 的性质分离制备的。因此,在应用上可以依据实验本身客观条件不同选择使用。

参 考 文 献

- [1] Clowes, R. C., 1972. *Bacteriological Reviews*, **36**: 361—405.
- [2] Chlsson, R., Hentschel, C. C., Williams, J. G., 1978. *Nucleic Acid Research*, **5**: 383—590.
- [3] Ueintraub, H. and Holtzer, H., 1972. *Journal of Molecular Biology*, **66**: 13—35.

一种识别人类迟复制的中期 X 染色体的简易方法

李麓芸

戴和平 夏家辉

(湖南医学院第一附属医院妇产科) (湖南医学院医学遗传研究室)

正常人体细胞的染色体为 46 条, 23 对, 其中 22 对是男女共同的, 称为常染色体, 另一对男女有别, 称为性染色体, 男性是 XY, 女性是 XX。Y 染色体上有男性决定因子, 一般来说, 有 Y 就能形成睾丸。女性有两个 X, 1961 年 Lyon 提出“单个 X 活动假说”, 认为女性的两条 X 染色体, 在代谢型细胞中, 一条有活性; 另一条活性低。这条活性低的 X 染色体, 在间期核中呈异固缩状态而形成 X 小体。如果某一个体缺少一个 X 染色体, 则核型为 45 XO, 其卵巢不

发育而呈条索状, 并表现出多种的临床症状。有的个体中, X 也可增多, 可多到 3—5 个, 但也只有一条 X 具有活性, 其它各条活性低, 故可形成 2—4 个 X 小体, 这种人常伴有智力发育障碍等一系列临床表现, 但并没有女性化更强的表现。因此, 我们检查这种活性低的 X 染色体就可帮助临床确诊。

1963 年 Schmid 用氚标记胸腺嘧啶放射自显影的方法, 观察中期染色体的 DNA 复制情况, 发现在正常女性的两条 X 染色体中, 有一条

X 染色体 DNA 复制较迟,而被大量标记,在正常男性中的 X 染色体没有这种迟复制的现象,因此认为,这条迟复制的 X 染色体就是在间期中形成 X 小体的那条呈异固缩状态的 X 染色体。此后,在医学遗传学中应用这一方法来研究迟复制的中期 X 染色体,但由于放射自显影方法复杂,且需防护设备,难于推广应用。现在,我们参照 Kim.Mya^[1,2]的方法,采用 BUDR-Giemsa 技术识别迟复制的中期 X 染色体,方法简便,效果满意,现将操作方法及基本原理介绍如下。

一、操作技术

1. 用常规方法配制含 20% 小牛血清或 AB 型人血清 RPMI 1640 培养基,每 100 毫升培养基中加 2% 的 PHA 溶液 3—5 毫升,用 20 毫升的容量培养瓶分装 5 毫升培养基,置冰箱中保存。

2. 用万分之一分析天平称取 BUDR 粉末(瑞士 Fluk 产品)一毫克,置无菌青霉素瓶中,在无菌室中加入无菌生理盐水 2 毫升,用黑布避光置冰箱中保存。

3. 抽取待检者静脉血 2 毫升,分别加入培养瓶中,用 8 号针头每瓶滴 8—12 滴,轻轻摇匀置 37℃ 温箱中培养。

4. 收获细胞前 10 小时左右,每瓶加入 BUDR 溶液 0.1 毫升(即 10 μ g/ml),继续培养 6 小时左右后,加入秋水仙素 0.8 微克/毫升,继续培养 4 小时左右。

5. 收集细胞,按常规方法作细胞学处理,用冷玻片滴片,立即置 75—80℃ 烤箱中干燥,3 小时左右关闭烤箱,令其自然冷却。

6. 将玻片标本浸入已在水浴中升温至 88℃ 的 1 M NaH₂PO₄ (临用前用 NaOH 粉末调整 pH 至 8.0) 溶液中 20 分钟,取出后稍冷,用已加温至 37℃ 的蒸馏水漂洗两次,置 37℃ 晾干,用蒸馏水稀释的 Giemsa 染色液(每 40 毫升蒸馏水中加 Giemsa 原液 5 毫升)染色 20 分钟左

右,用自来水冲洗,置室温待干。

7. 在普通光学显微镜下观察可见迟复制的 X 染色体呈现明显的浅着色,如图 1 箭头所指。图 1 是一个外周血细胞的中期染色体图。表示一个具有 47 条染色体,其核型为 47, XXY 的个体的染色体图。

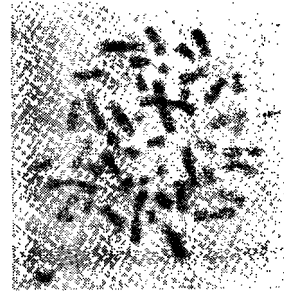


图 1 一个 47, XXY 个体的染色体核型,箭头所指为迟复制的 X 染色体

二、迟复制 X 染色体浅染色的机理

中期染色体的两条姊妹染色单体各由一条 DNA 链所组成,而 DNA 是由四种单核苷酸(其中包括胸腺嘧啶核苷酸)以不同的排列组合形成联结而成的两条互补的多核苷酸链形成的一种双螺旋结构。当细胞在加有 BUDR 培养液中进行分裂时, BUDR 能取代胸腺嘧啶核苷酸,渗入到新复制的 DNA 核苷酸链中。这样,当在细胞终止培养前 10 小时加入 BUDR 后,由于组成迟复制的那条 X 染色体的两条染色单体的 DNA 链的一条核苷酸链的胸腺嘧啶大部分被 BUDR 取代,而使该中期染色体出现了螺旋化降低的倾向,从而影响了与 Giemsa 染料的亲和力,因而着色浅。这样根据这条染色体与其它染色体所呈现的鲜明不同的颜色,就可以鉴定它为迟复制的 X 染色体。

参 考 文 献

- [1] Kim. Mya, et al., 1975. *Cytogenet. Cell Genet.* 15: 363—371.
- [2] Seabright, M. et al., 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 20: 150—154.