

• 研究报告 •

限制性内切酶缓冲液诱导人和家兔染色体显带的研究

毛 新^①

(华西医科大学精神科遗传室, 成都 610041)

李 虹

(华西医科大学医学生物学教研室, 成都 610041)

陈文元

(四川大学生物系, 成都 610064)

摘要 用限制性内切酶 *Alu*I、缓冲液或空白处理人染色体标本, 发现 *Alu*I 及缓冲液均能诱导出类 C 和 G 带, 其中缓冲液诱导的类 C 带频率虽低于酶原液, 但明显高于空白对照; 而 G 带的诱导率无明显差异。此外, 用限制性内切酶 *Hae*III 和 *Hinf*I 及其缓冲液处理中国小型白兔外周血染色体标本, 也诱导出了相应的类 C 和 G 带。

关键词 限制性内切酶, 缓冲液, 人, 家兔, 染色体, 显带

Study on Human and Rabbit Chromosome Banding by Restriction Endonucleases and Their Buffers

Mao Xin^②

(Division of Medical Genetics, Department of Psychiatry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

Li Hong

(Department of Medical Biology, West China University of Medical Science, Chengdu 610041)

Chen Wenyuan

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract C- and G-bands were induced in human chromosome by both *Alu*I and its buffer after treating the samples with *Alu*I, buffer and blank control. The frequency of C-band induced by buffer was lower than that by *Alu*I ($P < 0.05$), but much higher than that by blank control ($P < 0.001$). There was no significant difference among the frequencies of G-band induced by *Alu*I, buffer and blank control ($P > 0.05$). Also *Hae*III, and their buffers were capable of inducing C- and G-bands on chromosome of China small-sized domestic rabbits.

①现工作地址: 英国帝国癌症研究基金会人类细胞遗传学实验室, 伦敦, P. O. Box 123, WC2A 3PX.

②Present Address: Human Cytogenetics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, P. O. Box 123, Lincoln's Inn Fields 44, London WC 2A 3PX, U. K.

Key words Restriction endonuclease, Buffer, Human, Rabbit, Chromosome, Band

染色体的限制性内切酶 (restriction endonuclease, RE) 显带是近年发展起来的一种新的显带技术, 目前已广泛用于人及肿瘤染色体、类人猿、猩猩、小鼠、赤鹿、猪、两栖类等动物染色体的研究^[1, 3-5, 7, 8, 11, 12]。然而, 在上述研究中, 缓冲液一直被用作阴性对照。作者曾发现 RE 中的 *Alu* I、*Hae* III 和 *Sau* 3A I 缓冲液能诱导人染色体显出类 G 和 C 带^[9, 10]。为了进一步探讨 RE 缓冲液染色体显带的普遍性, 我们特进行了本研究。现报告如下。

1 材 料 和 方 法

1.1 人染色体标本制备、*Alu* I 及缓冲液显带

用常规方法从 3 个人淋巴母细胞样细胞株, 2 例正常人外周血中制备人染色体标本。将每例不同片龄的人染色体标本分 5 组, 分别用 10×、5×、1× *Alu* I 缓冲液, *Alu* I 酶原液及空白(未加任何处理)于 37℃ 作用 4 小时, 2% Giemsa 染色 10 分钟, 气干, 油镜下观察, 每例计数 50 个以上中期分裂细胞。χ² 检验, 显著性水平 $P=0.05$ 。

1.2 家兔染色体标本制备、RE 及缓冲液显带

取中国小型白兔(China small-sized domestic rabbit), 雌雄各 4 只, 采兔心脏血 0.3-0.4ml, 接种于含 199 40ml、小牛血清 10ml、ConA 0.4mg、肝素 0.4ml、青链霉素各 5000 单位、pH7.4-7.6 的培养液中, 于 38℃ 培养 67-72 小时, 加入终浓度为 0.06μg/ml 的秋水仙素作用 2 小时, 常规收获细胞, 气干法制片, 将每只家兔染色体标本分 4 组, 分别用 20μl *Hae* III 缓冲液、20μl *Hae* III 酶液, 20μl *Hinf* I 缓冲液和 20μl *Hinf* I 酶液于 37℃ 作用 18 小时, 5% Giemsa 染色 10 分钟。油镜下观察及摄影。

3 种 RE 及其缓冲液的特性见表 1。

表 1 限制性内切酶及其缓冲液的特征

内 切 酶	识 别 序 列	缓 冲 液 成 分	诱 导 的 染 色 体 带 纹
<i>Alu</i> I	AG'CT(GC)	20mmol/L NaCl 7mmol/L MgCl ₂ 7mmol/L 2-mercaptoethanol 10mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)	C G
<i>Hae</i> III	GG'CC(GC)	50mmol/L NaCl 60mmol/L MgCl ₂ 6mmol/L α-mercaptoethanol 100μg/ml BSA 6mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)	C G
<i>Hinf</i> I	G ANTC(N)	10mmol/L NaCl 6mmol/L MgCl ₂ 6mmol/L α-mercaptoethanol 100μg/ml BSA 6mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)	G

2 结果与讨论

2.1 *Alu* I 及其缓冲液显带

在 5 例人染色体标本中,共计数 *Alu* I 缓冲液处理的中期分裂细胞 313 个,诱导出类 C 带细胞 104 个,类 G 带细胞 101 个;共计数 *Alu* I 酶处理细胞 320 个,诱导出类 C 带细胞 159 个,类 G 带细胞 91 个;共计数空白对照细胞 318 个,诱导类 C 带细胞 15 个,类 G 带细胞 107 个。*Alu* I 缓冲液、*Alu* I 酶液和空白处理诱导的类 G 带频率的差异无显著性($P > 0.05$)。*Alu* I 缓冲液诱导的类 C 带频率低于酶液($P < 0.05$),但明显高于空白对照($P < 0.001$)。同时诱导出类 C 和类 G 带的细胞也只见于 *Alu* I 酶液(图版 I, 1)和缓冲液(图版 I, 2)处理的标本。此外,缓冲液浓度和染色体标本片龄(老化程度)对显带无影响。但细胞株染色体标本较外周血标本更易诱导出带纹。

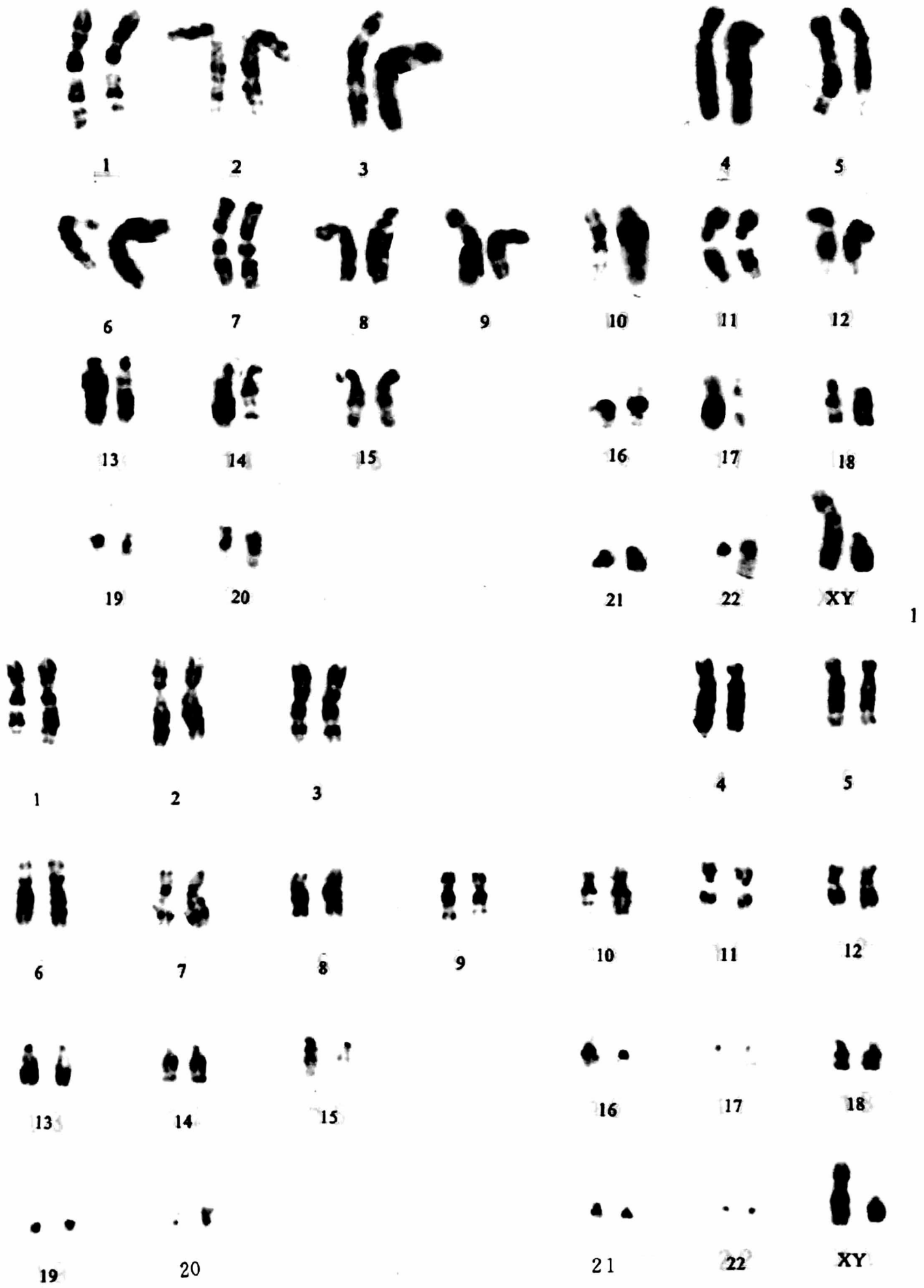
2.2 *Hae* III 和 *Hinf* I 及缓冲液显带

8 只中国小型白兔的染色体数目为 $2n = 44$,组型为 $12m + 12sm + 12st + 8t$,与文献一致⁽⁶⁾。*Hae* III 酶液在中国小型白兔染色体中诱导出类 G 和类 C 带,后者主要分布于 1、2、4、5、6、11、16、18、20、21 号和 Y 染色体(图版 II, 3)。与 *Hae* III 在人染色体中诱导出的类 C 带主要分布于 1、9、16 号及 Y 染色体不尽相同⁽¹⁰⁾。*Hae* III 缓冲液在中国小型白兔染色体中诱导出清晰的类 G 带(图版 II, 4)。而 *Hae* III 缓冲液在人染色体中既诱导出类 G 带,也诱导出类 C 带⁽¹⁰⁾,提示人和家兔在结构异染色质上存在差异,这是否与进化有关尚有待进一步研究。*Hinf* I 酶(图版 II, 5)和缓冲液(图版 II, 6)均能在中国小型白兔染色体中诱导出类 G 带,而缓冲液诱导出的带纹较酶液清晰。最近,陈文元实验室用 *Alu* I 和 *Hae* III 酶及缓冲液在黄牛染色体上诱导出类 C 和 G 带,其中缓冲液诱导出的带纹更清晰(尚未发表)。

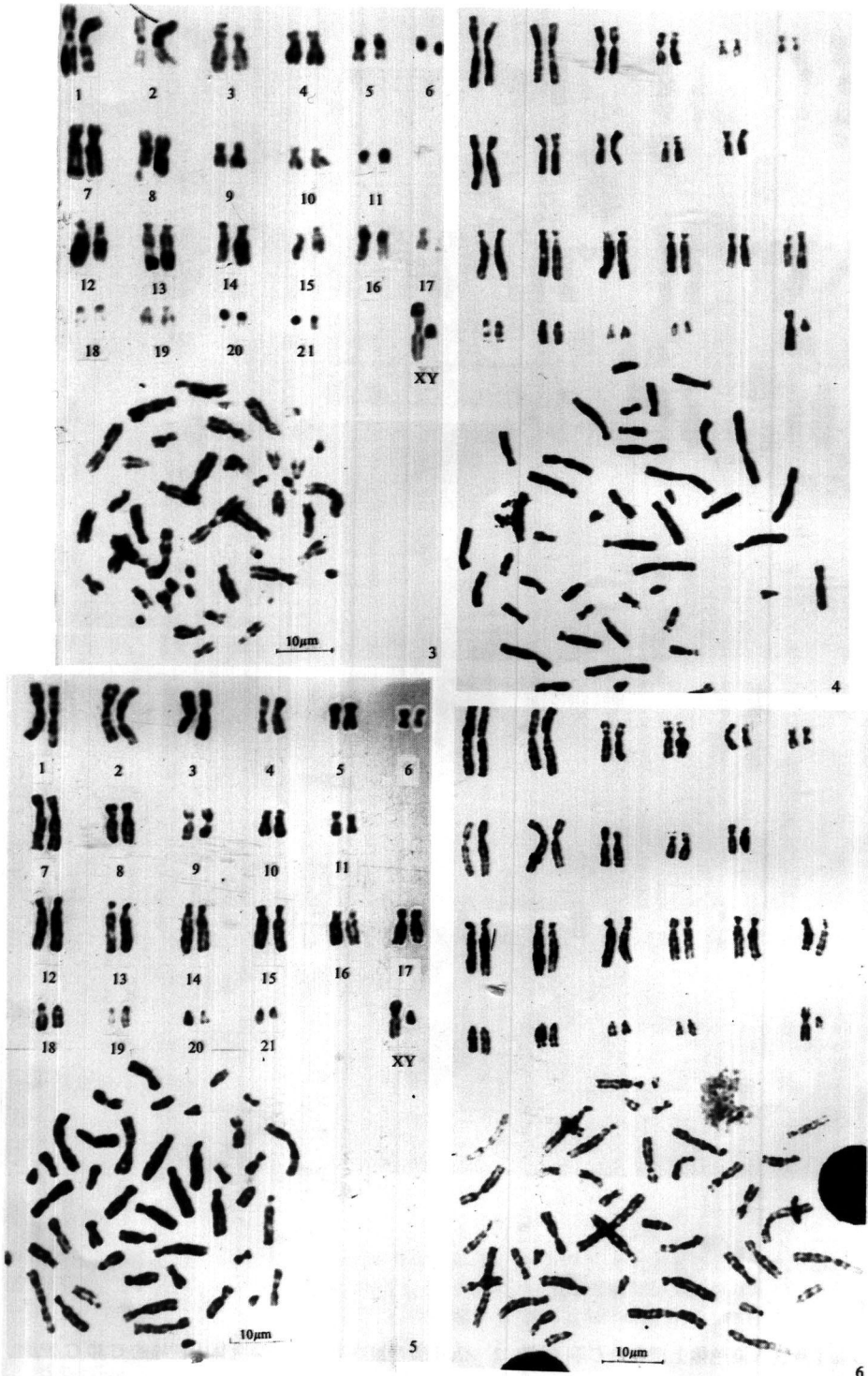
本研究及其它新近研究结果表明,部分 RE 缓冲液能在人、家兔及黄牛染色体上诱导出带纹,提示 RE 缓冲液诱导染色体显带具有普遍性。过去认为,RE 显带机理可能与其特异性 DNA 序列的识别或蛋白质抽提影响 DNA 高级结构的构象有关⁽²⁾,而 RE 缓冲液的基本作用是促进 RE 对 DNA 的特异性酶切。由表 1 可见,*Alu* I、*Hae* III 和 *Hinf* I 的缓冲液的基本成分相同,仅含量不同。这些成分是否与 RE 缓冲液诱导染色体显带有关,尚需进一步研究。另一方面,作者还发现,RE 缓冲液本身就有降解纯化不全的质粒和基因组 DNA 的作用(毛新,未发表)。因此,在 RE 染色体显带研究中,将 RE 缓冲液作为阴性对照是不完全的,必须设空白对照才能说明问题。

参 考 文 献

- (1) 赵亚力等, 1990. 遗传学报, 18(2): 120-126.
- (2) 董伟峰, 张思仲, 1986. 遗传与疾病, 3(4): 236-239.
- (3) Babu A, et al, 1987. Cancer Gene Cytogenet., 24: 367.
- (4) Bianchi N O, et al, 1985. J. Mol. Evol., 22: 323-333.
- (5) Fewucci L, et al, 1987. Cytogenet, Cell Genet., 44: 53-57.
- (6) Ford C E, et al, 1980. Hereditas., 92: 145-162.
- (7) Kaebling M, et al, 1984. Chromosoma., 90: 128-132.
- (8) Lima-de-Farid A, et al, 1980. Hereditas., 92: 267-273.
- (9) Mao X, et al, 1991. Chromosome Information Service., 50: 15-16.
- (10) Mao X, et al, 1991. Cancer Genet, Cytogenet., 56: 102.
- (11) Mezzanotte R L, et al, 1983. Cytogenet, Cell Genet., 36: 362.
- (12) Schmid M, et al, 1988. Chromosoma., 96: 283-290.



1. *Alu* I 酶在人染色体上诱导的 C 和 G 带; 2. *Alu* I 缓冲液在同一个体染色体上诱导的 C 和 G 带.



3. *Hae*Ⅲ酶在中国小型白兔染色体上诱导出的 C 和 G 带；4. *Hae*Ⅲ缓冲液在同一兔染色体上诱导出的 G 带；
5. *Hinf*Ⅰ酶在同一兔染色体上诱导出的 G 带；6. *Hinf*Ⅰ缓冲液在同一兔染色体上诱导出的 G 带。