遗传 HEREDITAS (Beijing) 15(5): 39-42 1993

·综 述·

用限制性内切酶诱导染色体显带的分析

刘 林

(北京农业大学畜牧系, 100094)

Analysis of the Chromosome Banding with Restriction Endonucleases

Liu Lin

(*Department of Animal Science, Beijing Agricultural University, Beijing* 100094)

用某些 Res 消化原位固定的中期染色体, 染色体染色深度总体降低, 对于某一种酶显示出特征性带型[23]. 这一新发现, 为更精细地分析染色体结构和功能等提供了新的方法. 虽然有人对 Res 诱导显带的机制已作了一些假设[6, 22, 24], 但对于固定的染色体, 很难从本质上分析酶诱导其显带发生的生化变化, 并很难确定这些带是如何与染色体区域的组成相关联. 近年来又发现 Res 也能诱导体外分离的、未固定的染色体显带[10, 11]. 体外消化适合于生化研究, 可了解引起染色体显带的分子组成和构象. 本文将对 Res 显带带型种类、显带方法、显带机制及电镜下 Res 显带观察作一概述.

一、Res 显带类型

Res 可诱导 C、G、NOR、R 显带及某种酶特异带型. 有些 Res 还可诱导出现染色体间隙. 一般将限制性内切酶显带记为 Re 显带[9], 诱导显带的带型写在符号"Re"后的括号内, 带型名称后在括号内写上显带酶的名称. 例如, *Alu*I 诱导 C 显带, 可记为: Re(C)(*Alu*I)显带.

二、Res 显带方法

1. 原位固定的染色体 Res 显带法[9]

先用空气干燥法制备染色体玻片标本; 将反应液(30 活力单位 Res 溶于 20 μl 特定缓冲液中)滴加到染色体标本玻片上, 小心地用盖玻片覆盖, 防止气泡产生, 然后将玻片置于湿润空气温箱中, 37℃ 温育 2 小时或更长时间, 移去盖玻片, Giemsa 染色, 镜检. 用特定缓冲液作空白对照(不显带). 应了解 Res 活性, 以确定酶消化适宜的浓度和时间.

2. 分离的染色体体外 Res 显带法[10, 11]

(1) 细胞培养 在 5:3:2 的 Hanks:199:马血清的混合培养液中, 细胞长成单层; 用过量的脱氧胸苷(终浓度 10mmol / L)处理 24 小时, 可获得对数生长的同步化细胞; 用 Hanks 液冲洗后, 换新鲜培养液培养; 8 小时后, 加入秋水仙胺(0.075μg / ml)继续过夜培养. (2) 染色体的分离 从培养单层上收集积累的有丝分裂细胞, 用 Hanks 液冲洗后, 离心(480g)5 分钟, 再在 1:1 Hanks:蒸馏水中悬浮 20 分钟(冰中), 同上离心, 然后用冷的 PMH(0.1mmol / L Pipes 缓冲液, 1mmol / L $MgCl_2$, 1mol / L 己糖, pH6.5)冲洗, 离心(1000g)5 分钟, 再在 10ml PMH 中悬浮, 37℃ 温育 10 分钟; 接着用 22 号针头注射器灌洗, 以释放出染色体, 可用相差显微镜观察. 未破裂细胞以 300g 离心 10 分钟使细胞团沉淀, 将悬浮液再离心(1500g)30 分钟, 收集染色体团. 用少量 PMH 重浮染色体, 4℃ 贮存. (3) 内切酶消化 贮存在 PMH 中的染色体以 1500g 离心 30 分钟, 向沉淀物中加入特定酶消化缓冲

液使之重新悬浮，使染色体 DNA 终浓度达 300μg／ml．然后加入适当浓度的内切酶，置 37℃温育；不同时间取出染色体悬液，每一样品中加 EDTA（终浓度为 10mmol／L），置冰上冷却，冰箱中过夜，以便染色质游离出来；1500g 离心 30 分钟，小心地将含有游离出的染色质悬液取出，贮存；再用含 10mmol／L EDTA 的消化缓冲液重新悬浮留下的染色体团块．反复多次后，在相差显微镜下观察，以确保在悬液中无染色体．（4）将经消化的染色体部分及游离出的染色体部分离心(1500g，15 分钟)到一盖玻片上，然后用 1:3 的冰乙酸:甲醇固定，Giemsa 染色．

三、Res 显带机理

1.Res 限制性位点出现的频率

用微球菌核酸酶和 DNaseI 处理中期染色体，使染色体染色程度明显降低，同时，伴随出现带纹[25]．用 *Alu*I 或 *Eco*RI 处理小鼠中期染色体，染色体中 85%的 DNA 被降解释放，仅定位在着丝粒区域的随体 DNA 保留在染色体上[19]．Miller 等(1983)[23] 提出，富含某一 Res 识别位点的 DNA 区域被切割产生缺口，释放出来的 DNA 片段长为 100–200bp，而大于 1000bp 的片段仍保留在固定的染色体上．因而设想，Res 诱导显带表示染色体该区域酶限制性位点数目较少，或根本没有．*Hae*Ⅲ使人染色体出现 C 带或 G 带[5, 23]．由于该酶限制性位点由 GG↓CC 序列组成，又由于 G 带间染色体区域富含鸟嘌呤，因而认为 *Hae*Ⅲ优先消化带间区域，诱导 G 显带．*Hind*Ⅲ和 *Eco*RI 诱导人染色体呈现 G 带[21]．然而，这些酶的限制性位点并不富含鸟嘌呤(分别为 A↓AGCTT 和 G↓AATTC)．因而提出 Res 诱导显带的主要原因是染色质结构组成而不是限制性位点出现的频率．有实验表明，家猪 1–12 号染色体以及 X 染色体的中和亚中着丝粒区的结构异染色质处，*Au*I 显带阴性．这类着丝粒结构异染色质为富含 G–C 的 DNA 组成，同时含有 *Alu*I 识别位点及切割区．而 13–18 号染色体的端着丝粒区结构异染色质处 *Alu*I 显带阳性，该处富含 A–T 碱基组成，同时因缺少 *Alu*I 识别位点而耐消化[1]．

Bianchi 等(1987)[9] 应用连续酶消化(SED)技术研究 Res 显带机制，结果提示，Res 在 DNA 分子中诱导产生多个缺口，在温育期间，从染色体上脱落的 DNA 量取决于染色体缺口数目多少以及染色体蛋白对 DNA 脱落的阻碍作用．DNA 上具有高频率识别序列的 Res 会从 DNA 上切割产生大量的短 DNA 片段，该短片段从染色体上释放出来，使得染色体局部性着色变浅．另一方面，染色体蛋白可阻止 DNA 长片段从染色体中脱落下来．当这些蛋白受到蛋白酶 K 消化时，DNA 长片段也释放出来，染色体上仅保留缺乏 Res 识别序列的 DNA 区域，这些区域可用 DNaseI 消化．上述观点可直接通过测定 Res 处理后脱下的 DNA 片段大小得到验证．*Mbo*I 消化后释放出的 DNA 片段小于 1000bp，而蛋白酶释放染色质蛋白所阻留的 DNA 片段大于 1000bp．因而得出结论，某些 Res 从固定的染色体不同区域去除不同长度 DNA，导致染色体染色程度改变，从而显带．某一特定 Res 所脱去 DNA 的量与该酶限制性位点数目成比例，用 Res 处理时，DNA 短片段从染色体上释放出来．而长片段被染色质蛋白所阻留，因而，染色体浓染区域表明该处限制性位点数目较少，DNA 释放很少；而低染色或极低染色能力区域(间隙)反映一种 Res 切割位点数很多，大量 DNA 片段被释放．对昆虫的研究也表明，Res 作用是基于对 DNA 的切割和脱去，且本质上是由 DNA 碱基组成所决定，而不是由染色质结构所决定[26]．Res 诱导分离的未固定的染色体显带机制也包括染色质 DNA 的释放，且释放的 DNA 片段大小不等(从 200bp 至大于 4kb)．这与 Miller 等[23] 和 Bianchi 等[9] 结果不一致．也有人认为，Rc–(G)显带是由于 DNA 形态发生改变，而不是 DNA 的释放[22]．

2. Res 与限制性位点亲近能力的大小

DNA 片段大小是由相邻限制性位点间的碱基数所决定，保留在染色体上的片段大小可能与染色体其它成份有稳固的相互作用[7, 24]．如，紫外线诱导的 DNA–蛋白质交联阻止以后的 Res 诱导显带．说明了 DNA–蛋白质正常的相互作用对于诱导显带的重要性[5]．

由于通常的乙酸–甲醇固定液除去染色体蛋白，并引起染色体内分子相互作用发生改变，在相对来说是生理盐离子条件下对未固定的染色体用 Res 在体外消化所得的结果更能反映染色体的本来组成．对释放出来的及保留的染色质部分可方便地进行 DNA 和蛋白质分析．体外 Res 诱导的带形一般与固定的染色体用传统显带法诱导的

带型相同．一些酶在染色体特异区域显带上有微小变化，与限制性位点分布的局部变化或与酶亲近能力有关．

*Bst*NI 可切割小鼠随体 DNA，重复形成特征性的 245bp 单体．但不切割染色体内的随体[11]．在未固定的染色体内，着丝粒处结构异染色质按一定方式构成，使得随体 DNA 免受 *Bst*NI 切割．这可能与结构异染色质高度浓缩的特点或与 DNA-蛋白质特异的相互作用阻止酶亲近随体 DNA 上的酶切点有关．这意味着，一些酶诱导显带与其亲近在染色体上分布的限制性位点的能力局部差异有关．至今，*Taq*I 尚未能成功地消化人染色体中具有高度重复 DNA 序列的结构异染色质，这可能与染色体 DNA 对于 *Taq*I 消化亲近的能力有关[12]．*Bst*NI 诱导分离的染色体产生 G 带，许多染色体的着丝粒区域也适度地以致显著地着色．这意味着，在消化过程中随体 DNA 释放很少．该结果与以前所用小鼠固定的染色体所得结果不同．*Bst*NI 消化后，由于随体 DNA 释放的直接效应，使得结构异染色质淡染[18, 24]．这种不一致性可能是与固定过程中蛋白质从染色体上脱去，从而增强了酶与随体 DNA 的亲近能力有关．该酶诱导 G 带可能反映了非随体 DNA 区域 *Bst*NI 限制性位点的区域性差异．

如同 *Bst*NI 一样，*Ava*Ⅱ和 *Sau*96I 在随体 DNA 处也有许多限制性位点，并诱导未固定的染色体显 G 带．与 *Bst*NI 不同，这些酶处理后在结构异染色质处淡染．意味着随体 DNA 被切割释放，染色体内随体 DNA 对 *Ava*Ⅱ和 *Sau*96I 的亲近力不受限制．据报道，*Bst*NI 的分子量比其它一些 Res 分子量大．因而决定 Res 与结构异染色质中随体 DNA 亲近能力的因素还可能与 Res 分子大小有关．染色质致密构象是决定限制酶消化染色体显带，尤其是限制大分子酶消化染色体的重要因素[27]．就 *Hae*Ⅲ和 *Eco*RⅡ而言，当处理时间较短时，仅在染色体 R 带处降解，而形成了 G 带带型．随处理时间延长，G 带处也被降解，呈浅染，而呈现出 C 带带型．当把 *Alu*I 和 *Mbo*I 处理的时间缩得很短时，也能使人和小鼠中期染色体产生 G 带[18]．这些结果表明，染色体上呈现 R 带区段的 DNA 比 G 带区段 DNA 更容易、更快或完全地被 Res 所切割和降解．这可能是染色体上碱基组成的差异所致，因而 Res 很难诱发 R 带．目前只有 *Mse*I(切割序列为 TTAA) 使人中期染色体直接呈现 R 带[20]．其它许多 AT 特异性酶都未能呈现 R 带，可能是由于染色体内这些酶的限制性位点较少或 G 带区域采取某一特定组成方式使得酶不能与 DNA 亲近．

微球菌核酸酶起初诱导体外染色体 C 显带[11]；而该酶诱导固定的小鼠染色体 G 显带[25]．这种结果不一致可能与酶浓度不同和 / 或与固定的与未固定的染色体对该酶消化的敏感性不同有关．酶对核小体 DNA 相对地难以亲近．结构异染色质中独特的分子相互作用，形成了短暂抵抗酶切割的特性．结构异染色质对其它多种因素，包括 DNaseI[4]、胰蛋白酶及电镜标本制备过程中产生的扩散力等，也具有相对的抵抗力．用 *Alu*I 选择性地消化固定的染色质，在蚱蜢和小鼠细胞常染色质内产生特异的、重复的带型(潜隐带，Cryptic bands)，用其它显带技术如 C 显带，特异荧光染料及其它 Res 不能观察到这种带型[13]．结果提示，在常染色质中隐藏着一特殊种类的重复 DNA，其含有的 *Alu*I 限制性位点数目、分布、以及对酶的亲近力与基因组其余部分常染色质不同，程度较低些，与异染色质 C 带无关．最近，Gosalvez 等(1991) 用 X-射线 *Hae*Ⅲ处理的小鼠中期染色体进行显微分析(XRMA)，发现染色体臂及着丝粒由于 Has 消化的结果不同，并不是简单地由于 DNA 不同程度丢失有关，但还与电镜下观察到的染色质结构重组有关．这种重组与蛋白质丢失无关，但可能与染色质凝集时无机离子数量变化相关[16]．因而，Res 诱导显带的过程是复杂的，不仅仅是将 DNA 从染色体特定性区域抽提除去的结果．

四、电镜下的染色体 Re 显带

Gosalvez 等(1990)[14] 用 *Hin*fI 和 *Alu*I 消化置于格栅上的小鼠染色体，电镜下观察到，在一标记染色体(具有 7 个常染色质区和 6 个异染色质区)中的带型与以前[13] 用同样酶处理在光镜下观察到的带型不同．提示染色体上限制性位点的可亲近性可能由于染色体制备过程而发生改变．用 *Alu*I 消化染色体，常染色质和异染色质受到的影响程度不同．很明显，在光镜下观察到的两条质间带在电镜下未观察到，所有常染色质区表现出等电子密度．然而，*Hin*fI 在常染色质区和异染色质区均产生高电子密度，在光镜下产生同样效果的 Res(*Alu*I 和 *Hin*fI)在电镜下产生不同的效果．电镜下染色体形态与 Res 作用于分离的 DNA 有关，DNA 被酶切割得越多，染色体超微结构变化越

大[15]．光镜和电镜制备染色体的方法不同，可改变 Res 对限制性位点的切割或消化后产生的片段的溶解度．用于电镜观察的染色体不在 Carnoy 氏固定液中固定，而在酸性分离缓冲液(含 1%柠檬酸，1%Triton−×100,6mmol／L $MgCl_2$)中温育．当用 *Hae*Ⅲ以下列两种不同方式消化染色体时，电镜下观察的带型也明显不同：染色体在涂有 Formvar 的格栅上消化后，电镜下观察到类似于 C 带带型；当染色体在悬溶液中消化，电镜下观察可见架子样结构，带消失．上述实验也提示，一些 Res 诱导显带与沿染色体分布的限制性位点及与 Res 的亲近力区域性差异有关．这种亲近力可能与 DNA−蛋白质相互作用有关，因而受到制备染色体所用的不同试剂的作用而发生改变．进而可能出现在光镜下观察到的 *Alu*I 带在电镜下未观察到；而用 *Hin*fI 消化，在电镜下可观察到该带．另外，虽然可设想特殊带含有串联排列的长的重复 DNA，但它们不具有异染色质区域处的结构，也不同于常染色质区的组成结构．*Eco*RI 将随体 DNA 切割成 142bp 单体的亚单位，而 *Alu*I 不能消化这个高度重复序列[17]．这些酶原位消化可定位高度重复序列的随体 DNA 及 DNA 主要带．

用 Res 诱导染色体显带，无疑为研究染色体的组成与功能及基因定位等提供了细胞生物学与分子生物学相结合的新手段，进一步完善该技术有着重要意义．用 Res 显带既可对原位固定的染色体诱导显带，既可在光镜下研究，也可在电镜下研究．从而可从多个角度对染色体结构和组成进行分析．由于各种方法上所用试剂及制备技术不一致，所得结果可能不一致．因而要求我们用 Res 进行染色体显带研究时，要建立一种可靠的、稳定的、统一的方法．另外，对某种 Res 要先测试其活性，对于某一带型，摸索适宜的消化条件，这样就可得到重复性较好的实验结果．

参 考 文 献

〔1〕 赵亚力等：1990．遗传学报，17(5)：360−364．
〔2〕 刘国章等：1988．生物化学与生物物理进展，15(3)：237．
〔3〕 董伟峰、张思仲：1986．遗传与疾病，3(4)：236−239．
〔4〕 Adolph, S.: 1988. *Chromosoma*, 96: 102−106.
〔5〕 Bianchi, N. O. et al.: 1984. *Chromosoma*, 90: 133−138.
〔6〕 Bianchi, M. S. et al.: 1985. *Chromosoma*, 91: 131−136.
〔7〕 Bianchi, N. O. et al.: 1985. *J.Mol.Evol.*, 22: 323−333.
〔8〕 Bianchi, N. O. et al.: 1986. *Chromosoma*, 94: 362−366.
〔9〕 Bianchi, N. O. et al.: 1987. *In*: Cytogenetics, Etd. by G. Obe and A.Basler, Springer−Verlag, Berlin, pp. 280−290.
〔10〕 Burkholder, G. D. et al.: 1986. *Exp.Cell Res.*, 164: 379−387.
〔11〕 Burkholder, G. D. et al.: 1989. *Chromosoma*, 97: 147−355.
〔12〕 Fernandez, J. P. et al.: 1991. *Cytogenet. Cell Genet.*, 57: 78−81.
〔13〕 Gosalvez, J. et al.: 1989.*Genome*, 32: 672−675.
〔14〕 Gosalvez, J. et al.: 1990. *Genome*, 33: 155−157.
〔15〕 Gosalvez, J. et al.: 1990. *Chromosoma*, 99: 36−43.
〔16〕 Gosalvez, J. et al.: 1991. *Cytogenet. Cell Genet.*, 56: 82−86.
〔17〕 Juan, C.et al.: 1991. *Chromosoma*, 100: 432−438.
〔18〕 Kaelbling, M. et al.: 1984. *Chromosoma*, 90: 128−132.
〔19〕 Lica, L. et al.: 1983. *Chromosoma*, 88: 42−49.
〔20〕 Ludena, P. et al.: 1991. *Cytogenet. Cell Genet.*, 57:82−86.
〔21〕 Mezzanotte, R. et al.: 1983. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36: 562−566.
〔22〕 Mezzanotte, R.et al.: 1985. *Exp. Cell Res.*, 161: 247−253.
〔23〕 Miller, D. A. et al.: 1983. *Science*, 219: 395−397.
〔24〕 Miller, D. A. et al.: 1984. *Exp. Cell Res.*, 155: 294−298.
〔25〕 Sahasrabuddhe, C. G. et al.: 1978. *Chromosoma*, 69: 331−338.
〔26〕 Sentis, C.: 1989. *Genome*, 32: 208−215.
〔27〕 Torre, J. de la et al.: 1991. *Chromosoma*, 100: 203−211.

本文于 1991 年 9 月 20 日收到．