

人与小鼠染色体的免疫化学的差异

许良中¹⁾ 彭汪家康²⁾ 高润松²⁾ 许世明³⁾

自从 1972 年 Dev 等^[1]报告了荧光标记的抗-腺嘌呤的抗体结合至用热与甲酰胺变性过的人的中期染色体以后,用抗-腺嘌呤与抗-胞嘧啶的抗体进行研究已日趋广泛^[2,3]。其结果提示人们,利用抗核苷酸血清的免疫学技术可获得很多关于染色体结构的知识并可能找到一种新的免疫化学的染色体分带。本文就是应用一种新的 ABC (Avidin-Biotin-peroxidase-Complex) 免疫化学的方法^[4,5],用抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗血清标记人与小鼠的染色体,观察二者的区别,从而提供一种新方法,即能在杂交瘤细胞中区分人与小鼠的染色体。

材料与 方法

外周血淋巴细胞培养

人淋巴细胞的培养与染色体的制备均按常规方法进行。一般在 5 毫升培养液中加入植物血凝素 0.2 毫升,然后加全血 0.3 毫升,培养 72 小时。

骨髓培养

用 15—20 克正常瑞士系小鼠,取出小鼠的股骨,将骨髓冲洗至磷酸缓冲液中(内含 0.5 微克秋水酰胺/毫升),室温培育 1 小时,用低渗溶液(1% 枸橼酸钠与 0.075M KCl 1:1)处理 20 分钟。固定液(乙醇与冰醋酸 3:1)固定 2 次,然后滴片,空气干燥。

杂交瘤细胞培养

杂交瘤细胞株 2 F 7 由美国国立过敏性与感染性疾病研究所免疫调节实验室 Lane 医师所提供。这种细胞含有人与小鼠的染色体。传代后 3 天的杂交瘤细胞,按常规方法制备染色体标本。

胰蛋白酶变性处理

用老化过 3 天的染色体玻片浸于 0.025% 胰蛋白酶 (Difco 1:250) 溶液中,2 秒钟后,用三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBS) 清洗。

免疫化学的处理

将胰蛋白酶变性处理过的人、小鼠与杂交瘤的染色体玻片,用正常山羊血清处理 5 分钟, TBS 清洗, 1:2 浓度抗-胸腺嘧啶脱氧核苷血清 (Research Plus Inc. N. J.) 覆盖染色体,室温培育 1 小时, TBS 清洗 2 次,用生物素标记的山羊抗兔 IgG (1:100) 覆盖染色体 30 分钟, TBS 清洗二次。ABC 溶液处理玻片 1 小时, TBS 清洗 2 次,玻片浸于 DAB (50 毫克 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Monohydrate 溶于 100 毫升 TBS 中内含 4 毫升 1% NiCl₂) 溶液中 10 分钟后,用 100% 乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。对照组玻片不加抗-胸腺嘧啶脱氧核苷血清或不用胰蛋白酶变性处理。

结 果

对照组

未处理过的玻片没有看到抗体结合至染色体上,在细胞质中染色体仅看到淡淡的轮廓。

人的染色体

抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体可将人染色体染成很深的棕黑色,但在着丝粒的部位不着色或着色很淡(图版 1, 1)。特别是 1 号、9 号和 16 号染色体的着丝粒不着色,仅能在染色体的长臂与短臂之间看到一个很宽的裂隙。

小鼠染色体

Xu Liangzhong et al.: The Immunochemical Difference of Chromosome Between Human and Mouse

- 1) 上海第一医学院肿瘤医院病理研究室。
- 2) 美国国立癌症研究所肿瘤细胞遗传学实验室。
- 3) 美国国立癌症研究所病理研究室。

与人的染色体相反,小鼠染色体的着丝粒部位被抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体深染(图版 I, 2)。小鼠染色体臂的染色比着丝粒淡,有时可看到不能识别的染色体分带。

杂交瘤的染色体

杂交瘤细胞含有人与小鼠的染色体,根据着丝粒染色的不同,我们可以区别人与小鼠的中部着丝粒染色体与近端着丝粒染色体。人的中部着丝粒染色体在着丝粒部位具有一段不着色的裂隙。但来自小鼠染色体易位而成的小鼠,它的中部着丝粒染色体具有很强烈的着丝粒部位染色(图版 I, 3)。在杂交瘤中的人的近端着丝粒染色体,在着丝粒部位显示很淡的染色。这些区别与在分别培养的人与小鼠的标本中一样。

讨 论

抗核苷抗体仅与单链 DNA 区域的碱基起反应。因此,可应用选择性的变性技术在 DNA 的某些核苷酸顺序上产生单链的区域。许多因素可以引起 DNA 的变性(表 1), Schreck 等^[2,6]报道人的中期染色体可被光氧化而变性。Freeman 等^[7]认为抗体不能附着到中期染色体上,除非它们已被热或碱变性过。我们应用的胰蛋白酶变性的方法目前国际上尚未见报道,这种方法简便省时,对富含腺嘌呤-胸腺嘧啶顺序的变性是比较有效的。

表 1 引起 DNA 变性的因素

变性因素	作 者
1. NaOH	Freeman 等, 1971
2. 紫外线照射	Wallace 等, 1971
3. 加热	Dev 等, 1972
4. 甲酰胺	Dev 等, 1972
5. 光氧化	Schreck 等, 1973
6. 胰蛋白酶	许良中等, 1982

人与小鼠染色体间的某些差异是明显的,每条染色体的人染色体的着丝粒具有一个大的较明显的不着色的区域,但每个小鼠染色体的着丝粒存在非常深的染色区域。用抗-胸腺嘧啶脱氧核苷

抗体处理后出现非常深的染色区域,这表明这深色的区域含有胸腺嘧啶脱氧核苷。在小鼠的染色体制片中,抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体使含有着丝粒异染色质的区域产生很深的染色,它显示出这种种族的富含腺嘌呤-胸腺嘧啶的卫星 DNA 的部位^[2]。从而表明人与小鼠间染色体着丝粒区域存在着某些免疫化学的差异,这种差异在人与小鼠的 G 分带上并不能显示(图版 I, 4, 5)。在杂交瘤细胞 2F7 中,借助这种方法可以清楚地区分人与小鼠的染色体,它比 Giemsa 11 的方法准确可靠。

我们应用的 ABC 方法是目前国际上最新的免疫组织化学方法,比过去应用的过氧化酶抗过氧化酶(PAP)复合物的方法敏感 40 倍。它利用卵白蛋白与生物素的特殊亲和力,增加与抗原抗体的结合能力,最后借助于 DAB 而显色。由于 ABC 法抗血清用量少,背景清楚,时间节省,目前已广泛应用于免疫学、细胞学和病理学等方面,但应用于染色体的免疫化学的研究尚未见报道。由于杂交瘤细胞能产生单克隆抗体和作基因定位的研究,目前的应用十分广泛。我们应用这种方法比较容易的区别在杂交瘤细胞中的人和小鼠的染色体。也有人报道过抗-核苷抗体临床上可应用于测定癌细胞的标记指数^[8]。应用 ³H-胸腺嘧啶作类似的测定结果也相符。然而免疫学的步骤比较简单,可能便于推广应用。

参 考 文 献

- [1] Dev, V. G., D. Warburton, O. J. Miller, D. A. Miller, B. F. Erlanger and S. M. Beiser: 1972. *Exp. Cell Res.*, 74: 288—293.
- [2] Schreck, R. R. et al.: 1974. *ibid.*, 88: 31—39.
- [3] Miller O. J., W. Schnedl, J. Allen and B. F. Erlanger: 1974. *Nature*, 251: 636—637.
- [4] Hsu, S. M., L. Raine and H. Fanger: 1981. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75: 816—821.
- [5] Hsu, S. M., L. Raine and H. Fanger: 1981. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577—580.
- [6] Schreck R. R. et al.: 1973. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 804—807.
- [7] Freeman, M. V. R., et al.: 1971. *Exp. Cell Res.*, 69: 345—355.
- [8] Leibeskind, D. et al.: 1977. *Cancer Res.*, 37: 323—325.



1. 用抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体处理后的人的染色体,显示着丝粒部位不着色或着色很淡。 2. 小鼠染色体的着丝粒部位被抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体处理后显示强烈的着色。 3. 一个用抗-胸腺嘧啶脱氧核苷抗体处理后的 2F7 细胞,显示人(箭头所示)与小鼠(三角所示)之间中部着丝粒染色的不同。 4. 一个人的雌性细胞染色体G分带的组型。 5. 一个小鼠的雄性细胞染色体G分带的组型。