

限制性内切酶 *EcoRI* 诱发 CHO 细胞染色体畸变的细胞动力学研究

董伟峰 张思仲

(华西医科大学医学遗传研究室, 成都)

一些限制性内切酶能够诱发 CHO 细胞染色体畸变已经不同实验所证实^[1,4,5,7]。有作者提出限制性内切酶的致染色体畸变作用类似于电离辐射, 即这种作用是非 S 期依赖性的^[4]。最近, 又有作者详细研究了 *AluI* 对处于细胞周期各个时相的染色体的作用^[1]。*AluI* 识别序列为 4 个碱基对, 产生平切末端, 而对另一大类识别序列为 6 个碱基对, 产生粘性末端的限制酶则尚无研究。为此, 我们以 CHO 细胞为材料, 观察了 *EcoRI* 对处于细胞周期不同时相染色体的效应。现将结果报告如下。

材料和方法

EcoRI, 购自中国科学院生物物理所生化试剂厂。酶的缓冲液配制如下: Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 50 mM; MgCl₂, 10 mM; pH 7.5。抽滤除菌后备用。酶的使用液用前新鲜配制。

1. CHO 细胞培养 37°C 密闭培养于含 15% 新生小牛血清(华西牌, 成都)的 Eagle-MEM 营养液 (Nissui, 日本) 内, 补充 0.03% L-谷氨酰胺。每 ml 营养液还加有青霉素 100IU、链霉素 100 μ g。细胞每隔 2 天传代 1 次, 传代时以 0.25% 胰酶消化 2—3 分钟。

2. *EcoRI* 处理和细胞再培养 取传代后第二天处于对数生长期的 CHO 细胞, 以 0.25% 胰酶消化制成悬液, 离心后弃上清液, 用磷酸缓冲液洗涤细胞 1 次, 将细胞转移至塑料小离心管 (Eppendorf) 内, 每管含细胞 1—3 $\times 10^6$ 个。分为 1—6 组, 每组每次 1 管。再离心弃上清液, 向 1—5 管各加入 50u (20 μ l) 新鲜配制的 *EcoRI* 使用液至团块上, 第 6 管加入等体积的 *EcoRI* 缓冲液作为对照。立即用旋涡震荡器充分震荡混匀后, 置 37°C 水浴内孵育 30 分钟。孵育结束后, 离心弃上清液, 将细胞再接种于含 10ml 营养液的培养方瓶内, 37°C 密闭培养。

3. 细胞收获和染色体标本制备 细胞收获前 2 小时, 加入终浓度为 0.05 μ g/ml 秋水酰胺。1—5 管的收获时间分别在再培养后的 4、8、12、18 和 24 小时。对照组的收获时间在两次实验中分别在再培养后的 12 和 18 小时。收获时, 以 0.25% 胰酶消化 CHO 细胞制成悬液, 以后步骤与人体外周血染色体标本制备^[6]相似, 如 0.075M KCl 液低渗 8 分钟, 3:1 甲醇-冰醋酸固定 3 次, 气干法制片。标本以 20:1 Giemsa 液染色 15 分钟。

4. 染色体畸变分析 每次每个时间组随机选取分散较好的中期分裂相 100 个, 其中 5% 为近四倍体细胞, 油镜下观察, 统计各种类型不稳定畸变, 即单体断裂、染色体断裂、无着丝粒片段、非染色间隙、染色体环、微小体、单体间互换、双着丝粒 (包括多着丝粒) 染色体及多射体。断裂次数按以下标准估计: 前 4 种各记为 1 次, 后 5 种各记为 2 次, 遇有多着丝粒按 (着丝粒数 - 1) \times

Dong Weifeng et al.: A Study of Cell Kinetics of CHO Chromosomal Aberrations Induced by Restriction Endonuclease *EcoRI*

国家自然科学基金资助课题。

本文于 1986 年 11 月 13 日收到。

2 计数断裂次数。

结 果

我们先前的实验^[7]表明,仅缓冲液并不能诱发染色体畸变。本实验中对照组(表1,组6)畸变细胞率、平均细胞染色体断裂次及平均染色体断裂次分别为7.0%、0.07、0.0035,与先前实验结果相近。表1列出了实验组1—5不同恢复培养时间的畸变细胞率、平均细胞断裂次数及平均染色体断裂次数。与对照组相应的三项参数检验差异具有高度显著性($P < 0.01$)。从表1可以看出,在实验组1—5组中,第2、3组的畸变细胞率、平均细胞断裂次数和平均染色体断裂次数明显高于其它组别。

表1 限制酶 *EcoRI* 对不同细胞周期 CHO 细胞染色体的作用

组 别	酶处理后 培养时间(小时)	试 验 次 数	计 数 细 胞	畸 变 细 胞	畸变细 胞率(%)	总 断 裂 数	断裂/细胞	计数 染色体	断裂/染色体
1	4	2	170	47	27.6	91	0.535	3844	0.0261
2	8	2	200	57	28.5	183	0.915	3857	0.0474
3	12	2	200	64	32.0	195	0.975	3964	0.0492
4	18	2	200	48	24.0	84	0.420	4019	0.0209
5	24	2	200	31	15.5	133	0.665	4070	0.0327
6	12.18	2	200	14	7.0	14	0.07	4052	0.0035

分析实验组各种类型染色体畸变构成比时发现,1—3组单体型畸变(单体断裂 B' + 单体裂隙 Gap* + 单体环 R** + 微小体 MIN + 单体间互换 RB' + 多射体 RB'B'') 大大多于染色体型畸变(染色体断裂 B'' + 无着丝粒片段 ACE + 染色体环 R + 非染色间隙 Gap + 双着丝粒体 DIC), 分别累计达69.6%、72.8%、69.9%, 而4、5组染色体型畸变则稍多于单体型畸变, 分别为54.7%、53.5% (表2, 图1)。第2、3组的单体交换型畸变(单体间互换 RB' + 多射体 RB'B'') 高于其它组别, 分别高达20.8%和33.8%, 而染色体型交换(双着丝粒体 DIC) 则以第4、5组较多(图2)。

根据文献[6]及我们液体闪烁法测定的 CHO 细胞周期, 绘制了 CHO 细胞周期和各时相时间图(图3)。根据此图, 在第1组(恢复培养4小时)中观察到的M期细胞在酶处理时多数处于G2期, 第2、3组的细胞处于S期, 而第4、5组的细胞则相当于G1期。应当补充的是, 在较短的恢复培养时间(即G2、S期)所统计的部分染色体断裂实际上仍为等单体断裂, 因为标本上可见典型

表2 限制酶 *EcoRI* 诱发的各种类型染色体畸变

组别	酶处理后 培养 时间 (小时)	试验 次 数	计数 细 胞	畸 变 类 型 计 数 (%)								合 计	
				B'	B''	ACE	Gap	R	MIN	RB'	RB'B''		DIC
1	4	2	170	24(30.4)	7(8.9)	11(13.9)	25(31.6)*	1(1.3)**	6(7.6)	3(3.8)	2(2.5)	0(0)	79(100)
2	8	2	200	39(31.2)	2(1.6)	14(11.2)	12(9.6)	5(4)	26(20.8)	11(8.8)	15(12)	1(0.8)	125(100)
3	12	2	200	28(22.0)	6(4.7)	15(11.8)	10(7.8)	4(3.1)	18(14.1)	15(11.8)	28(22.0)	3(2.4)	127(100)
4	18	2	200	16(25)	6(9.4)	15(23.4)	7(10.9)	1(1.6)	10(15.6)	3(4.7)	0(0)	6(9.4)	64(100)
5	24	2	200	14(15.2)	4(4.3)	25(27.2)	8(8.7)	3(3.3)	24(26.1)	1(1.1)	3(3.3)	10(10.9)	92(100)
6	12.18	2	200	6(42.8)	2(14.3)	6(42.8)	0	0	0	0	0	0	14(100)

B' = 单体断裂; B'' = 染色体断裂; ACE = 无着丝粒片段; Gap = 非染色间隙; R = 染色体环; MIN = 微小体; RB' = 单体间互换; RB'B'' = 多射体; DIC = 双着丝粒体和到着丝粒体。

* 25个非染色间隙中有19个为单体型, 占总畸变的24%。

** 单体环。

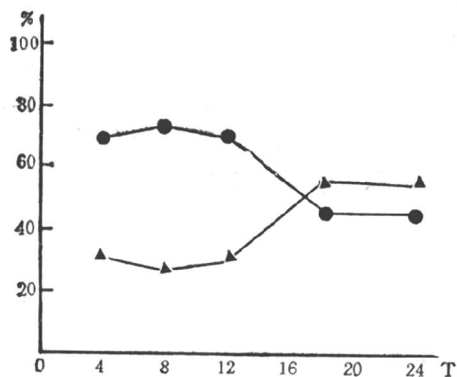


图1 不同收获时间的染色单体型(●-●)和染色体型(▲-▲)畸变

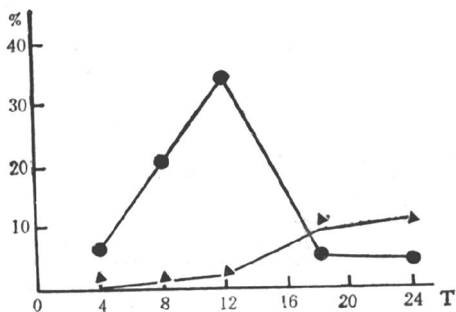


图2 不同收获时间的单体型交换(●-●)与染色体型(▲-▲)交换畸变

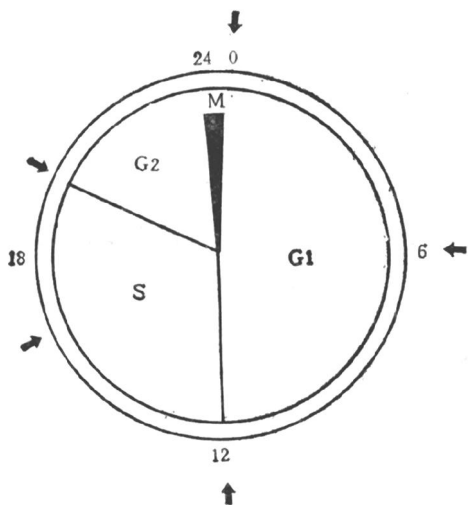


图3 CHO 细胞周期和 *EcoRI* 处理时间(←)

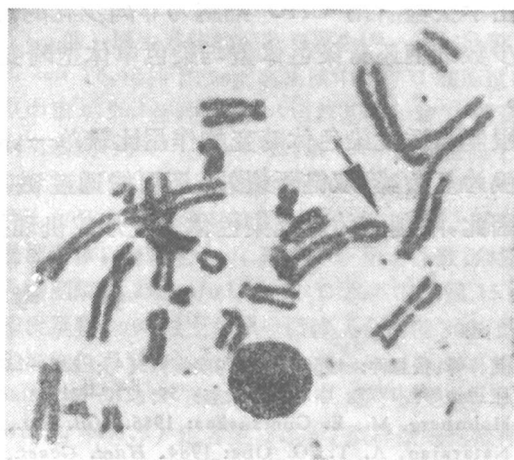


图4 CHO 细胞的染色体畸变 (*EcoRI* 50u, 恢复培养 18 小时) 箭头示姊妹染色单体连接。

的姊妹单体连接(图4),故单体断裂数实际更高。由此可清楚看出细胞周期中各种类型畸变的变化规律,即限制酶 *EcoRI* 处理 G2 和 S 期细胞产生的染色体畸变以单体型为主,而 G1 期处理则以染色体型畸变占优势。

讨 论

实验结果表明, *EcoRI* 能够诱发 CHO 细胞染色体畸变,其作用类似与电离辐射,即处于细胞周期任何相的细胞均可受其作用发生染色体畸变。从畸变类型分析可见,处于 G1 期的细胞主要产生染色体型畸变,而 G2 和 S 期细胞主要产生单体型畸变。但在单体畸变类型方面 G2 与 S 期又各具特点。G2 期的单体型畸变主要为单体断裂、单体裂隙,而 S 期主要为交换型单体畸变,即 S 期的单体断裂极易错接形成多射体、单体间互换等图象。

最近,有作者研究了限制酶 *AluI* 的诱变动力学,其结果与本文相近^[6]。*AluI* 的识别序列为 AG↓CT,产生平切末端,而 *EcoRI* 的识别序列为 G↓AATTC,产生粘性末端。尽管两种酶的识

别序列、断端的性质不同,但其结果相似。这提示由上述两种限制酶得出的细胞动力学规律似可外延到其它限制酶。因此可以认为,限制酶的诱发染色体畸变作用是非S期依赖性的,但诱发的畸变类型在各期还具有上述一些特点。较小剂量 *AluI* 即可引起明显的染色体畸变,为获得相应的畸变率则需较大剂量的 *EcoRI*。其原因可能在于,与电离辐射相似,*AluI* 产生平齐 DNA 双链断裂,其修复过程亦比较困难,一般认为须通过重组修复^[5]。而 *EcoRI* 产生粘性 DNA 双链断裂,后者可能比较容易地通过连接酶作用而原位修复。当然,还可能是由于两种酶在 CHO 基因组中识别位点的差异所致。

虽然限制酶的作用是非S期依赖的,但S期的细胞对限制酶的作用敏感性高。这是由于随着细胞周期进程,高度凝缩的M期染色体,在间期逐渐解旋,至S期达最大程度的伸展。这样,许多原来被包扎遮挡的限制酶作用位点得以暴露,受到限制酶的充分作用,产生广泛的DNA双链断裂。当然,不排除细胞膜及核膜在细胞周期不同时相对酶的通透性不同,导致敏感性的差异,但后者尚无实验依据。S期出现较多的单体交换型畸变,可能是由于染色质高度解旋,许多DNA双链断裂在空间上非常靠近,而后者恰是形成交换型畸变的前提^[6]。这样,两个位于不同染色体上的DNA断裂部位便可侧向连接至分裂中期形成交换型图形。

由于实验所用CHO细胞为非同步化的群体,故在各实验组仍可见到各种类型的染色体畸变。少数细胞还有染色体型与染色单体型畸变共存,它们在酶处理时当处于G1—S交界处或S早期。

限制酶诱发染色体畸变的作用比较单一,即仅通过切割双链DNA引起畸变。而电离辐射的作用极为复杂,除双链断裂外,还可能通过碱基损伤、单链断裂、DNA-蛋白质交联等方式引起畸变。因此,限制酶为研究染色体畸变形成机理提供了一个较为理想的模型。

参 考 文 献

- [1] 董伟峰,张思仲: 1986. 遗传与疾病, 3(4): 236—239.
- [2] 张思仲等: 1979. 中华医学杂志, 59: 210—213.
- [3] Holmberg, M., E. Gumauskas: 1986. *Mut. Res.*, 160:221—229.
- [4] Natarajan, A. T., G. Obe: 1984. *Hum. Genet.*, 90:120—127.
- [5] Obe, G. et al.: 1985. *Mut. Res.*, 150: 359—368.
- [6] Obe G, E. U. Winkel: 1985. *Mut. Res.*, 152: 25—29.
- [7] Zhang S. W. Dong: 1987. *Mut. Res.*, In. publication.

书刊介绍

遗传学国外 新书简介选目

《行为遗传学概要》(Essentials of Behaviour Genetics, D. A. Hay 著, 英国 Black Well 1985 年版, 366 页)

本书为行为遗传教科书。其内容特点: (1) 书中既包括心理学教育中所需要的行为遗传的数量性状分析方面内容, 又具有遗传学专业需要的心理学遗传分析方面的知识; (2) 书中列举了具有代表性的人类及动物遗传的实例, 以加深理解; (3) 概念叙述简明扼要, 并附有图表说明。目次: (1) 行为遗传学的发展及其范围; (2) 神经的延滞发育及其原理; (3) 正常的个体发育变异及其分析; (4) 无脊椎动物的多样性; (5) 啮齿类和

其他脊椎动物遗传学; (6) 人类行为及遗传的分析方法; (7) 遗传学和人的行为; (8) 科学和社会的行为遗传学。

《遗传学》(Genetics, U. Goodenough 著, 英国 CBS College 1984 年版, 908 页)

本书初版是 1974 年, 现为第 3 版。新版补充了许多最新进展方面的内容, 如: 体细胞遗传, 可转移的因子, 基础突变、重组、染色体结构, 群体遗传和数量遗传等。目次: (1) 染色体中的遗传物质 (DNA, RNA); (2) 细胞周期, 染色体复制和有丝分裂; (3) 染色体的分子结构; (4) 染色体 DNA 的分子分析和遗传工程; (5) 染色体减数分裂传递; (6) 常染色体和性染色体所携带基因的孟德尔式遗传等共 28 章。

(浙江农业大学图书馆 韩扬云)