

用 FISH 技术对人、恒河猴、食蟹猴染色体的研究^①

潘淑娟 张锡然 黄浩杰 陈宜峰

黄恭情

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

(江苏省苏州动物园, 苏州 215000)

摘要 用人类 5 号、9 号、13 号、15 号、17 号、20 号整条染色体探针分别对人、恒河猴和食蟹猴的中期细胞进行荧光原位杂交, 结果表明: 人的 5 号、13 号、17 号探针分别杂交到恒河猴的 5 号、16 号、17 号染色体上; 9 号探针杂交到恒河猴 14 号染色体的长臂及部分短臂上; 15 号探针杂交到恒河猴 7 号染色体短臂及部分长臂上; 20 号探针杂交到恒河猴的 13 号染色体长臂上。食蟹猴的杂交结果与恒河猴完全一致。结合 G 带型分析, 对人与猕猴的染色体同源性及其进化进行了讨论。

关键词 荧光原位杂交, 染色体同源性, 恒河猴, 食蟹猴

Study of Human, *Mucaca mulatta*, *Macaca fascicularis* Chromosome Using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Pan Shujuan Zhang Xiran Huang Haojie Chen Yifeng

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Huang Gongqing

(Suzhou Zoo, Jiangsu Province, Suzhou 215000)

Abstract Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used on the metaphase chromosome of *Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis* with human chromosome specific DNA libraries for chromosome 5, 9, 13, 15, 17 and 20. In *Macaca mulatta*, the result showed that chromosome 5, 16 and 17 was entirely painted by human chromosome 5, 13 and 17 specific libraries respectively. The long arm and the partial short arm of chromosome 14 and the short arm and the partial long arm of chromosome 7 were painted by human chromosome 9 and 15 specific libraries respectively. And the long arm of chromosome 13 was painted by human chromosome 20 library. The result was the same in *Macaca fascicularis*. Combined with the comparative analysis of G-banding, the evolutionary relationship of these chromosomes between human and macaques was discussed.

Key words FISH, Chromosome homology, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*

有关灵长类的进化及人与灵长类的同源性的研究, 早在 60 年代就有报道^[4,5], 70 年代后, 这一领域的研究逐渐变得系统化, 研究方法除了染色体分带外^[2,9], 还有基因定位方法^[7,8]。染色体分带固然可以提供大量的信息, 但当染色体出现微小的浅带易位或对同源性较低的物种进行比较时, 其准确程度则大大降低。基因定位方法虽比较精确, 但这种方法只能对个别基因或小片段进行定位, 对于大段染色体则不适用。80 年代后期出现的荧光原位杂交(FISH)技术, 为染色体研究注入了新的活力。它具有简便、灵敏、精确等特点, 可以清楚地显

^①本文为国家自然科学基金资助项目。

示同源染色体在不同物种中的分布状况。该技术已被用于灵长类的染色体进化研究^(3,14)。

本文用人类 5 号、9 号、13 号、15 号、17 号、20 号整条染色体探针分别对恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 进行了染色体原位杂交, 并结合 G 带分析, 对灵长类的染色体进化进行了探讨。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

1.1.1 血样 取正常人、恒河猴、食蟹猴的静脉血。

1.1.2 探针 生物素标记的 5 号、13 号、15 号、20 号探针及 FITC 标记的 9 号、17 号人类整条染色体探针均购于英国 Cambio 公司。

1.1.3 检测系统 avidin-FITC、anti-avidin、PI 购于美国 Oncor 公司, F1(anti-FITC)、F2(FITC-anti-F1) 购于英国 Cambio 公司。

1.2 方 法

1.2.1 外周血培养及染色体标本制备 人和猕猴的外周血培养按照陈宜峰等⁽¹⁾报道的方法进行, 中期染色体标本的制备采用常规滴片法, 室温干燥, 镜检, 划定杂交范围, 系列乙醇脱水, 42℃ 老化过夜。

1.2.2 杂交 标本于丙酮中固定 10 分钟, 气干, 于 70% 甲酰胺 / 2×SSC 中 65℃ 变性 2 分钟, 取出后迅速置于 -20℃ 70% 冷乙醇中, 然后经系列乙醇脱水, 气干待用。探针从 -26℃ 取出, 预温后吹打均匀, 65℃ 变性 11 分钟, 转入 37℃ 水浴中预杂交 20 分钟, 加 3~4μl 探针杂交液于标本的划定区域, 封片, 置湿皿中, 42℃ 杂交约 16 小时。

1.2.3 检测 杂交后的标本除去封胶, 置 2×SSC 中洗去盖片, 然后于 50% 甲酰胺 / 0.5×SSC 中漂洗 5 分钟, 再于 2×SSC 中换洗 2 次, 每次 5 分钟, 取出后置 1×PBD 中洗 2 分钟, 生物素标记的探针杂交样品依次在 avidin-FITC、anti-avidin 和 avidin-FITC 中各孵育 20 分钟, 其间及其后各用 1×PBD 洗 3 次, 每次 2 分钟。FITC 标记的探针杂交样品则在 F1 及 F2 中各孵育 40 分钟, 其间及其后均用 washing solution 洗 3 次, 每次 5 分钟, 然后系列乙醇脱水, 气干, PI 复染, 封片。

1.2.4 显微观察及照相 BH-2X 型 OLYMPUS 荧光显微镜观察(B 滤光片组合), 用 Kodak ppc 1600 彩色胶卷照相。

1.2.5 两种猕猴的染色体命名 采用陈宜峰等⁽¹⁾的标准进行。

2 结 果 与 讨 论

人的中期分裂相中, 各个探针都能特异地杂交到相应的染色体上。对恒河猴、食蟹猴的杂交结果见表 1。

表 1 各探针的杂交结果

探 针	被 杂 交 的 染 色 体		
	人	恒 河 猴	食 蟹 猴
5B	5	5	5
9F	9	14q+p*	14q+p*
13B	13	16	16
15B	15	7q*+p	7q*+p
17F	17	17	17
20B	20	13q	13q

* 表示染色体臂的一部分; B. 生物素标记探针; F. FITC 标记探针。

由于两种猴子的杂交信号相同, 以下讨论中统称猕猴。

从表 1 及图版 I(A-a、B-b、C-c)可以看出: 人的 5 号、13 号、17 号染色体(HSA5、HSA13、HSA17)分别与猕猴的 5 号、16 号、17 号染色体(M5、M16、M17)同源, 杂交信号均匀地分布于整条染色体。分别对其 G 带型进行比较, 发现两者的 5 号染色体带型十分相似(图 1, a), 表明 5 号染色体在进化过程中具有高度的保守性。Dutrillaux 认为⁽¹⁰⁾, HSA5 目前的形态早在灵长类的狭鼻类祖先中就已存在, 进化过程中, 其形态改变不大。HSA13 和 M16 G 带带型差别较大(图 1, c), 从着丝粒位置来看, 二者的差别是由臂间倒位引起的; 人与猕猴的 17 号染色体长臂带型极为相似(图 1, e), 而短臂带型稍有差异, 可能是由于短臂发生了小范围的臂内倒位。

根据实验结果, 人的 9 号染色体(HSA9)与猕猴的 14 号染色体(M14)长臂及部分短臂同源(图版 I, B-b), 但比较二者的带型(图 1, b), 仍存在一些差异, 可能是进化过程中 M14 的长臂发生了臂内倒位。M14 短臂端部未出现杂交信号, 提示该部位可能与 HSA9 的任何部位都不同源, 或者该部位在进化过程中出现高度重复序列, 杂交时被抑制。

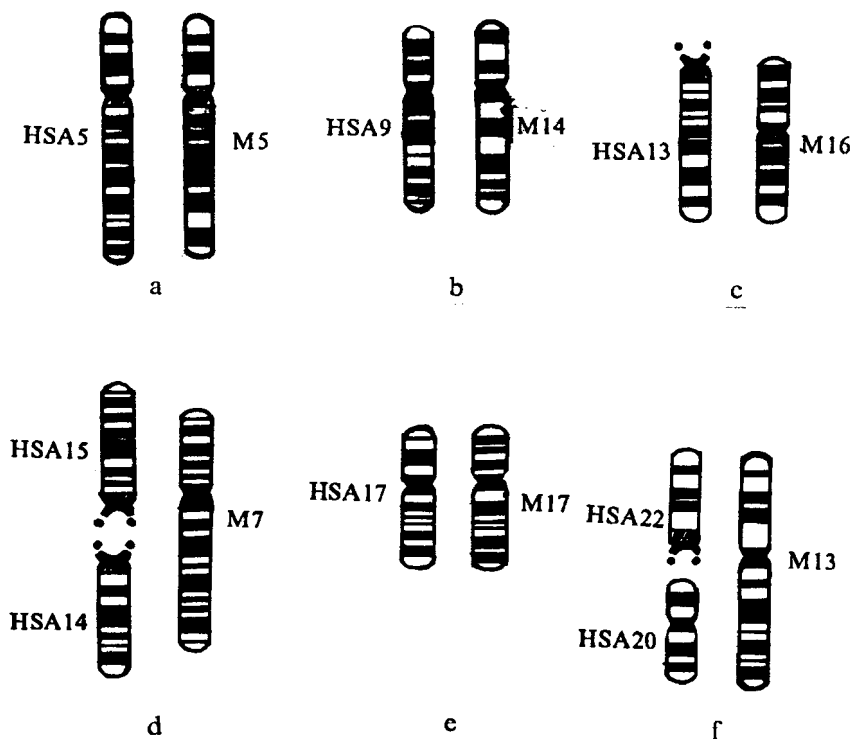


图 1 人类(HSA)和猕猴(M)的染色体 G 带模式图比较

(参考 ISCN, 1981 和 Wienbery, 1992)

人的 15 号染色体(HSA15)与猕猴的 7 号染色体(M7)短臂及部分长臂同源(图版 I, D-d), G 带比较结果显示(图 1d), 同源部位的带型相似, 但仍有少许差异, 可能存在一次臂内倒位和一次臂间倒位的差别。由于与 HSA15 同源的部分仅占 M7 的一半左右, 提示在 HSA15 的进化过程中, 可能存在断裂或融合机制。HSA15 的出现是在猴科动物分化以后⁽¹¹⁾, 由此我们认为: 人和猕猴的共同祖先中, 可能存在一条原始的染色体, 在猕猴的进化过程中, 该染色体仅经历了一系列内部的变化而演变为猕猴的 7 号染色体; 在向人类进化的过程中, 该染色体在近着丝粒部位发生断裂, 其短臂部分演变为人类的 15 号染色体。有资料表明⁽⁶⁾, M7 的长臂部分可能与

人类 14 号染色体同源。从 G 带比较来看, 二者的确存在相似之处, 但事实是否如此, 还需用人类 14 号染色体探针进一步加以验证。

人的 20 号染色体 (HSA20) 探针与猕猴的 13 号染色体 (M13) 长臂同源 (图版 I, F-f), 比较其 G 带带型 (图 1, f), 可以很容易地看出二者具有相似带型。M13 为标记染色体, 具有 NOR, 位于着丝粒近短臂区^[14], 该区域富含高度重复序列, 在预杂交过程中被抑制, 不呈现杂交信号。Clemente^[6]曾报道, 人的 20 号染色体起源较早, 在卷尾猴分化时就已具备了目前的形态, 猕猴分化较晚。由此可以推测: 人与猕猴的共同祖先中存在类似 HSA20 的染色体, 后来演化为 HSA20, 在向 M13 演化的过程中, 这条染色体可能与其它染色体发生了融合。有资料表明^[13], M13 的短臂与人类 22 号染色体同源, 因为二者的 G 带带型极为相似。这一推论是否正确, 也需用人类 22 号探针进一步加以验证。

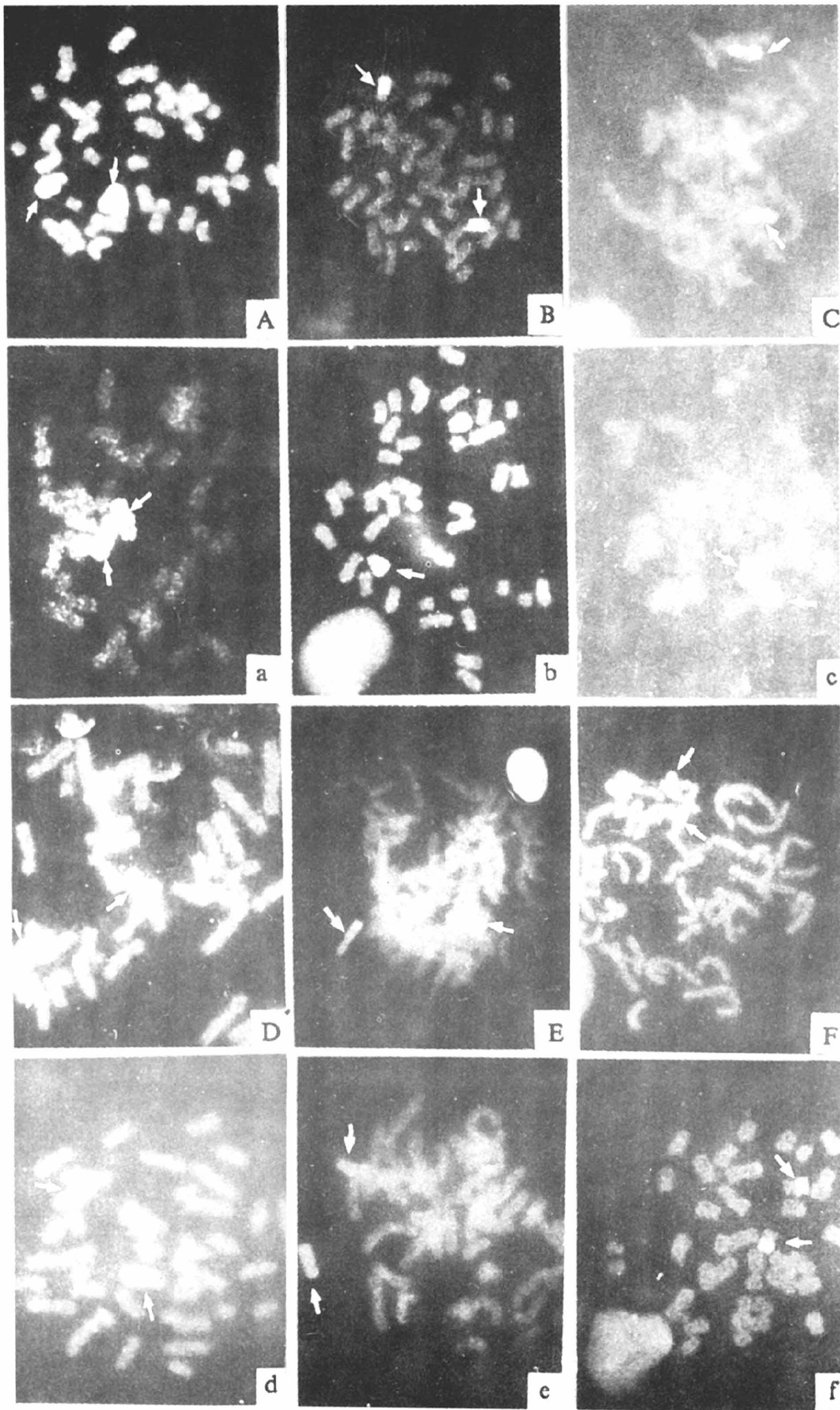
如图版 I 所示: 两种猴子的杂交结果相同, 这进一步证实了 G 带比较的结果^[2], 说明两种猴子的染色体在内容和结构上均无明显差别, 提示这两种猴子在分类地位上可能不是不同的种, 而是同一种的不同亚种。

由于采用了原位抑制杂交方法, 位于染色体着丝粒部位的高度重复序列在预杂交过程中被抑制, 因此, 不显示杂交信号, 但这并不排除这些部位也存在同源性的可能, 这种可能性可以用着丝粒探针来加以证实。

本文将 FISH 技术与染色体分带技术相结合, 通过 FISH 技术先将染色体同源部分进行定位, 然后再通过带型分析来对染色体的变化作出判断, 能够从 DNA 水平上对染色体同源性提供精确信息, 不失为生物进化领域中一种较为可靠的方法。但对于同源部位内部存在的倒位, 还需要用更为先进的双色 FISH 方法加以判断。

参 考 文 献

- 1 陈宜峰、罗丽华等. 猕猴 (*Macaca mulatta*) 染色体的 Giemsa 带型分析. 遗传学报, 1976, 3(4): 309~312
- 2 陈宜峰等. 猕猴属四种猴子的染色体比较研究. 动物学研究, 1980, 1(1): 91~99
- 3 黄浩杰、张锡然、陈宜峰. 用染色体原位抑制杂交法研究人和猕猴染色体同源性. 遗传学报, 1993, 20(3): 193~200
- 4 Chu E H Y, Bender M A. Cytogenetics and evolution of primates. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, 102: 253~266
- 5 Chiarelli B, Egozcue J. The meiotic chromosomes of two *Macaca*. Caryologia, 1967, 20: 339~346
- 6 Clemente I C, et al. Evolution of the simiiformes and the phylogeny of human chromosomes. (review article). Human Genetics, 1990, 84: 493~506
- 7 Creau-Goldberg N, et al. Comparative gene mapping of man and *Cebus capucinus*: a study of 23 enzymatic markers. Cytogene. Cell Genet., 1981, 31: 228~239
- 8 Cronin J E, et al. Molecular evidence for dual origin of mangabeys among old monkeys. Nature, 1976, 260: 700~702
- 9 Dutrillaux B, et al. Identity of euchromatic bands from man to Cercopithecidae (*Cercopithecus aethiops*, *Cercopithecus sabaeus*, *Erythrocebus patas* and *Miopithecus talapoin*). Hum. Genet., 1978, 45: 283~296
- 10 Dutrillaux B, et al. Comparison of the karyotypes of four Cercopithecidae *Papio papio*, *P. anubis*, *Macaca mulatta* and *M. fascicularis*. Cytogenet. Cell Genet., 1979, 23: 77~83
- 11 Dutrillaux B, et al. Chromosomal evolution of 19 species or sub-species of Cercopithecidae. Ann. Genet. (Paris), 1980, 23: 133~143
- 12 Lengauer C, et al. Comparative chromosome bandization of band mapping in primates by *in situ* suppression hybridization of band specific DNA microlibraries. Hum. Evol., 1991, 6: 67~71
- 13 Stanyon R, et al. Chromosomal painting shows that "marked chromosomes" in lesser apes and Old World monkeys are not homologous and evolved by convergence. Cytogenet. Cell Genet., 1995, 68: 74~78
- 14 Wienberg J, et al. Homologies in human and *Macaca fuscata* chromosomes revealed by *in situ* suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. Chromosoma, 1992, 101: 265~270



A——E. 表示食蟹猴的杂交结果；a——e. 表示恒河猴的杂交结果。两种猴子统称猕猴。

A、a. 用人类 5 号染色体探针进行杂交，呈现杂交信号的为猕猴 5 号染色体；B、b. 人类 9 号染色体探针的杂交结果，箭头示猕猴的 14 号染色体。其末端未出现杂交信号；C、c. 人类 13 号染色体探针的杂交结果，箭头示猕猴的 16 号染色体；D、d. 人类 15 号染色体探针的杂交结果，仅在猕猴 7 号染色体的短臂及长臂的近着丝粒区呈现信号；E、e. 人类 17 号染色体探针的杂交结果，箭头示猕猴的 17 号染色体；F、f. 人类 20 号探针的杂交结果，呈现杂交信号的为猕猴 13 号染色体的长臂。