

的绵羊乳腺细胞的核移入去核的卵细胞中,让卵细胞质中的因子与移入的核作用,使重组细胞分裂,分化成胚胎,进而发育成个体。用 DNA 微卫星分析(micosatellite analysis)对 4 个多态性基因位点检测表明,多利羊的电泳图谱与供核品种绵羊“Finn Dorset”相同^[18]。因此,多利羊确属体细胞克隆羊。但是,上述卵细胞质和移入的细胞核之间的相互作用必须配合得恰到好处,稍有差错便不能发育成胚胎^[8]。这或许是 Wilmut 等试验中,247 个被试重组细胞中只有 1 个发育成克隆羊的重要原因。

Wilmut 等^[18]的工作的重要生物学意义是证明了哺乳动物的已高度分化的体细胞也具有全能性。他们的动物克隆技术也具有很大的、潜在的经济意义。人类能利用这种技术繁殖优良品种哺乳动物和珍稀哺乳动物。还可以用已转入外源基因的成体动物的体细胞克隆该动物。一旦有了一群性别不同,又确定已转入所需要基因的动物后,即可通过它们的有性生殖繁衍大群后代,并用它们生产具有药用和保健价值的药物和食品,造福于人类。最近有报道,Wilmut 等已使用转基因动物的胚胎细胞克隆出“波利”羊。有理由相信,在不久的将来,哺乳动物体细胞克隆技术的潜在经济价值一定会得到实现。

参 考 文 献

[1] Wilmut 1,1997,文汇报,1997 年 3 月 7 日,钟

仁译。

- [2] Jaeger EC,1955,生物名称和生物学术语的词源,科学出版社,1979,p.122.
- [3] Webber HJ,1903,*Science*,**18**:501.
- [4] Kenneth JH,1953,*Dictionary of Scientific Terms*,Henderson (ed.),5th edition.
- [5] McGraw-Hill,1976,*Dictionary of the life Sciences*,Deniel N. Lapecles (ed.),McGrow-Hill,Inc.
- [6] Rieger R, Machaelis A, Green MM,1976,*Glossary of Genetics and Cttigebetucus*,4th edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg N. Y.
- [7] Maclean N,1987,*Dictionary of Genetics and Cell Biology*,New York University Press.
- [8] 丁小燕,1997,科学(上海),**49**(5):52-54.
- [9] Muir WH, Hildebradt AC, Riker AJ,1954,*Science*,**119**:877-879.
- [10] Steward FC,1958,*Am J Bot*,**45**:709-713.
- [11] 陈冀胜,1992,英汉生命科学辞典,科学技术文献出版社,P.122.
- [12] Command J. de Fonbrune F,1939,*CR Soc Biol (paris)*,**130**:744-748.
- [13] Tung TC, Wu SC, Tung YF et al.,1963,*Sci Sinica*,**14**:1244-1245.
- [14] Tung TC,1980,*Sci Sinica*,**23**(4):517-523.
- [15] Gurdon JB, Uehlinger V,1966,*Nature*,**210**:1240-1241.
- [16] Willadsen SM,1986,*Nature*,**320**:63-65.
- [17] 刘林,安民,1993,动物学杂志,**28**:55-60.
- [18] Wilmut 1, Schnieke AE, McWhir J, et al.,1997,*Nature*,**385**:810-813.
- [19] Prather RS,First NL,1990,*J Reprod Fert*,**40**:227-243.
- [20] 陈建华,洪黎民,1997,自然,**19**(3):170-172.

研究工作

玉米(*Zea mays L.*)中凋亡相关基因 c-myc 同源序列的检出及其染色体原位杂交定位*

宁顺斌 宋运淳** 王玲 杨征 刘立华

(武汉大学发育生物学研究中心 武汉 430072)

细胞凋亡(apoptosis)是细胞一种有步骤有活性的生理性自行消亡过程。正在凋亡的细胞形态上发生明显的变化,如胞质和核浓缩(condensation)、胞膜和核膜变皱(shrinkage)并起泡(blebbling)、核 DNA 断裂(fragmentation)

并降解(degradation)。不管是内源性因素还是

*国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目。

**通信联系人。

外源性因素诱导的凋亡,都受特定基因的控制。

c-myc 是一个多功能的核内原癌基因,普遍存在于高等动物细胞中,在人类位于染色体 8q24,由三个外显子和两个内含子组成,编码两个全长蛋白 MYC-1、MYC-2 和一个缺乏 N-末端转录激活区但含有 C-末端二聚体形成区和 DNA 结合区的蛋白 MYC-S^[1]。c-myc 在细胞凋亡、细胞周期、细胞增殖与分化以及肿瘤的发生和转移等众多的生病理过程中具有关键性作用,决定着动物体内多种细胞的凋亡。它可加速细胞增殖和细胞凋亡两种截然不同过程,充当一把双刃剑:不仅能激活细胞增殖,也能激活细胞凋亡。一旦细胞增殖发生障碍,c-myc 便可启动凋亡程序。

对于植物细胞凋亡的研究和动物相比还远远滞后,迄今尚未发现与植物细胞凋亡直接相关的基因。由于进化过程中选择负压力的存在,高等生物中重要功能基因的结构和功能一般是很保守的,许多在动物中存在的具有重要功能的基因在植物中同样也存在,并且动物凋亡基因 Dad-1 在几种植物如水稻、拟南芥中已发现了它的同源序列^[2]。因此利用动物凋亡基因或其 cDNA 寻找植物凋亡相关基因,应当是一个合理而有效的途径。Georgieva 等利用人 c-myc 基因的 cDNA 探针及此基因编码蛋白的相应抗体在玉米中检出了其同源的 mRNA 和相应的同源蛋白,并表明同源蛋白的功能与动物中的具有高度同源性^[3]。但迄今还没有对相应的同源 DNA 序列进行研究的报道。本研究首次采用生物素 Bio-11-dUTP 标记的探针和原生质体涂片的染色体原位杂交技术对玉米进行了研究,检出了动物 c-myc 基因的同源 DNA 序列,同时确定了这些序列在染色体上的具体位置。

材料和方法

一、材料

1. 供试玉米材料 供试玉米材料为自交系黄早四,种子由山东农业大学宋建成教授提供。

2. c-myc 基因探针 人的 c-myc 基因探针基因

组 DNA 克隆由武汉大学李文鑫教授赠送,相应的插入片段长 8.2kb,载体为 pBR322,酶切位点为 EcoRI/HindIII。

二、方法

1. 原生质体染色体制片 取生长旺盛的玉米根尖 1-2mm,饱和 α -溴萘 25℃下处理 2.5 小时,甲醇:冰乙酸(3:1)固定过夜,充分水洗后加 2%果胶酶和 2%纤维素酶(中科院上海生化所东风生物技术公司)等量混合液于 28℃下酶解 3 小时左右。固定后火焰干燥法制片^[4]。

2. 探针标记 采用“切口平移法(nick translation)”标记探针(切口平移试剂盒购自华美生物工程公司)。10 μ l dNTP(dATP,dCTP,dGTP 等量混合),5 μ l 10 \times Buffer, 5 μ l 质粒 DNA(约 1 μ g),4 μ l Bio-11-dUTP,5 μ l DNaseI/DNA polymerase I 混合酶液,加 ddH₂O 至终体积 50 μ l,混匀后于 15℃下反应 2.5 小时,0.5mol/L Na₂EDTA 终止液终止。Sepharose CL-6B(Sigma)凝胶柱离心纯化,点印渍检测标记效果。

3. 原位杂交 制片用 RNaseA(Sigma)37℃处理 1h,70%的甲酰胺 70℃处理 3.5min,梯度乙醇(70%、95%、100%)脱水,室温干燥后加杂交混合液[探针 25 μ l,去离子甲酰胺(Sigma)62.5 μ l,硫酸葡聚糖 25 μ l,20 \times SSC 12.5 μ l,ssDNA(华美生物工程公司)1.25 μ l]于 37℃杂交过夜^[5]。

4. 杂交结果的检测 杂交后浸洗,羊抗生物素抗体(Sigma)37℃温育 30min。等量兔抗羊生物素抗体偶联物(Sigma)37℃温育 30min。浸洗后链亲和素-辣根过氧化物酶(SA-HRP Sigma)37℃下温育 30min。DAB(Fluka)显色约 5min。25℃下 2%Giemsa 复染 25 分钟左右,干燥后二甲苯透明,封片。

5. 信号观察及统计分析 使用 Olympus BH-2 显微镜(日本)观察杂交结果并进行统计,选择染色体形态好、背景干净、信号点清晰的分裂相进行显微摄影,通过转化装置在显示屏上测量相关数据,并计算其标准差。

结果与分析

在玉米有丝分裂 5L(第 5 染色体长臂)近末端、4L 近着丝粒以及 1S(第 1 染色体短臂)近着丝粒处均镜检到 c-myc 基因探针的杂交信号。观察并统计了 243 个细胞早中期、晚前期及中期的有丝分裂染色体相,102 个细胞分裂相

在 5L 近末端处具有杂交信号,检出率为 41.97%(图版,a,b;表 1);87 个细胞分裂相在 4L 近着丝粒处具有杂交信号,检出率为 35.80%(图版,b,d,e;表 1);71 个分裂相在 1S 近着丝粒处有杂交信号,检出率为 29.21%(图版,c;表 1)。信号与着丝粒的百分距离分别为 96.21 ± 4.46 、 24.11 ± 0.47 和 10.02 ± 1.04 (表 1)。每位点检出率均在 29% 以上,说明不存在随机污染的非特异性信号。由于 Bio-11-dUTP 标记和 DAB 检测系统灵敏度等因素的限制,中期分裂相两条染色体单体或一对同源染色体上同时检测到杂交信号的几率很小,约 5%(图版,b,e)。同时出现两个以上杂交信号点的检出率约为 20%(图版,b,e)。同时对间期核也进行了观察统计,观察结果表明,间期核杂交信号的检出率比前几种情况高得多,约为 60%。可能是由于间期细胞染色质浓缩程度较低,因而容易杂交。在显微镜下,杂交信号为小圆点,而染色中心较大且形状不规则(图版,f),加之信号为鲜红色,染色中心为深红色,因此二者很容易区别。

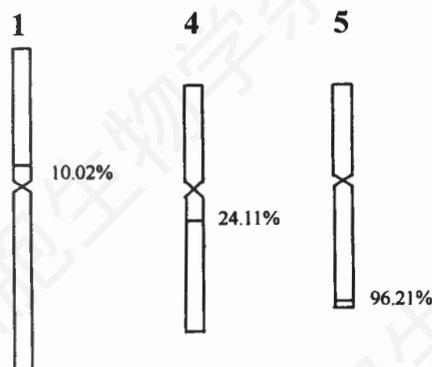


图 1 杂交信号在玉米染色体模式图上的位置
(以信号点距着丝粒的百分距离表示)

表 1 c-myc 基因的基因组 DNA 探针杂交信号位置及出现信号的染色体臂比

染色体	臂比	出现信号的细胞数	检出率(%)	信号距着丝粒的百分距离(%)
5	$1.21 \pm 0.034^*$	102	41.97	$96.21 \pm 4.46^*$
4	$1.77 \pm 0.142^*$	87	35.80	$24.11 \pm 0.47^*$
1	$1.10 \pm 0.075^*$	71	29.21	$10.02 \pm 1.04^*$

* 标准差。

讨 论

细胞凋亡是生命过程中的一个重要环节,同新陈代谢一样,是生物体生命活动基本特征之一。近 20 多年来,动物细胞凋亡的分子生物学理论和研究方法不断成熟,因此进展十分迅速,细胞凋亡逐渐成为生命科学最活跃的研究领域之一。而对于植物细胞凋亡的研究,目前国内尚处于起步阶段。植物的细胞凋亡对植物体的生长和发育有着重要的生物学意义和生理意义,植物胚的发育、导管和通气组织的形成以及花的败育等都离不开细胞凋亡。现在的研究表明,衰老(senescence)与凋亡也密切相关。当前,我国水稻、小麦、玉米、大豆、棉花和油菜等主要农作物生育期后期均有不同程度的早衰现象。除了这些正常生理条件下的细胞凋亡外,许多外界因素如理化因子、病原体等生物因子等都可诱导植物细胞产生不正常的凋亡现象。研究发现,病原体浸染植物细胞引起的“过敏反应(hypersensitive response)”中具有典型的凋亡特征^[6]。因此探寻植物中的凋亡相关基因并对其进行定位具有重要的意义,它有助于弄清楚植物生长发育过程中各种器官形成和发育的分子机制;为研究植物衰老的基因调控提供基础;也是植物抗病研究一个很重要的方面;对农产品的产量、贮存、果实和鲜花的保鲜等也都具有重要的实践意义,具有不可低估的作用;并可为通过转基因等途径利用这些基因资源培育抗衰老、抗病和抗逆境植物提供有用的线索。例如在一种烟草转基因植株中,细胞分裂素是正常细胞的七倍。高浓度的细胞分裂素除引起根、茎、叶的过度生长及顶端优势外,还延缓了叶片衰老。利用转基因途径可获得大量细胞分裂素

应用于延缓叶片衰老^[7]。我们的实验结果进一步表明,玉米中确实存在着与人 c-myc 同源的序列,在这方面迈出了重要的一步。Georgieva 认为,c-myc 的同源序列及相应的蛋白产物不仅在玉米中存在,在其他的植物和低等真核生物中也应当存在,表明 c-myc 在其进化中是相当保守的^[3]。

既然植物中存在 c-myc 的保守同源序列及相关蛋白,那么它们的结构和功能是否也是保守的呢? Georgieva 的研究表明,MYC 与其玉米中的同源蛋白分子量及相应的编码 mRNA 长度都是一致的,且蛋白的功能具有高度的同源性,即 MYC 同源蛋白也作为一种转录因子,对玉米胚的发育和分化及相关基因的表达进行调控。并认为两者的调控途径是一致的,即通过控制细胞周期来调节细胞增殖和细胞凋亡之间的平衡^[3]。

Dowty 和 Helentjaris 提出玉米双重顺序遵循 5-1-9 的规律,即第 1 染色体 DNA 顺序常与第 5 和第 9 染色体的重复,而第 5 与第 9 染色体的 DNA 顺序则很少重复^[8]。Helentjaris 进一步提出,4L 与 5L 具有较广泛的相似性^[9]。我们的实验结果表明,人的 c-myc 基因同源序列分布在玉米第 4、5 染色体长臂和第 1 染色体短臂上(图版及表 1),这正与他们报道的资料相符。并说明玉米中 c-myc 的同源序列是多位点分布的。

探针长度是影响检出率的重要因素之一。对单拷贝或重复拷贝(如基因组 DNA)探针来说,一般探针越长,检出率越高。我们以往的研究结果表明,小于 1kb 的探针杂交信号检出率一般在 10%—20%。Jiang 等指出,当探针长度达 3.5kb 时,利用非放射性标记的原位杂交检出率可达 90%以上^[10]。我们的结果表明,人的 c-myc 基因组 DNA 探针对于玉米染色体的杂交检出率均达 29%以上(表 1),超过 20%,但还远不及 90%。可能是由于动植物亲缘关系相当

远,功能基因虽然外显子高度同源,但内含子无选择压力或选择压力小,因而变动较大所致。人的 c-myc 基因三个外显子长度之和只占整个基因总长的 1/4 左右,而两个内含子和其他序列约占总长的 3/4。

摘 要

原癌基因 c-myc 是普遍存在于动物组织中的一个高度保守的细胞凋亡相关基因,决定着多种动物细胞的凋亡。我们首次以人 c-myc 的基因组 DNA 为探针,用生物素标记的原位杂交和酶联级联放大检测系统在玉米中检出了 c-myc 基因的同源序列,并对其进行了染色体物理定位。在第 5 染色体长臂近末端、第 4 染色体长臂近着丝粒及第 1 染色体短臂近着丝粒处检测到杂交信号,信号与着丝粒的百分距离分别为 96.21 ± 4.46 、 24.11 ± 0.47 和 10.02 ± 1.04 ,本结果为寻找和研究植物细胞凋亡基因提供了重要线索。

关键词: c-myc 基因 同源序列 细胞凋亡
玉米 染色体原位杂交

参 考 文 献

- [1] Spotts, G. D. et al., 1997, *Mol. Cell. Biol.*, **17**(3), 1459—1468.
- [2] Apte, S. S. et al., 1995, *FEBS Lett.*, **363**, 304—306.
- [3] Georgieva, E. I. et al., 1994, *Planta*, **192**, 125—129.
- [4] 宋运淳等, 1987, *遗传学报*, **14**, 424—427.
- [5] Gustafson, J. P. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 8646—8650.
- [6] Mittler, R. et al., 1995, *Plant Cell*, **7** (11), 1951—1962.
- [7] Hewelt, A. et al., 1994, *Plant J.*, **6**(6): 879—891.
- [8] Dowty, J. et al., 1992, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, **66**: 106.
- [9] Helentjaris, T. et al., 1996, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, **70**: 67.
- [10] Jiang, J. et al., 1994, *Genome*, **37**: 717—725.

DETECTION OF THE SEQUENCES HOMOLOGOUS TO C-MYC IN MAIZE AND THEIR CHROMOSOME LOCATIONS VIA *IN SITU* HYBRIDIZATION

NING Shun Bin SONG Yun Chun WANG Ling YANG Zheng LIU Li Hua

(Center for Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

ABSTRACT

The highly conserved proto-oncogene *c-myc* in animals has been shown to play a central role in regulating multiple developmental processes including growth, proliferation, differentiation and apoptosis. Since *c-myc* is highly conserved, investigation of it in plants is warranted. In this paper, we detected and localized the sequences homologous to *c-myc* in maize (*Zea mays L.*) via chromosome in situ hybridization for the first time. It showed that the signals of the probe corresponding to *c-myc* from human were detected in the long arms of the fifth and the fourth chromosomes and in the short arm of the first one repeatedly. The average percentage distances from centromere to signal site were 96.21 ± 4.46 , 24.11 ± 0.47 and 10.02 ± 1.04 respectively. The results provided a valuable insight into searching for genes associated with apoptosis in plants.

Key words: Gene *c-myc* Homologous sequence Apoptosis Maize Chromosome in situ hybridization

人卵黄囊造血的探讨

邢佩霓 韩秀蕊 杨娣娣 魏续仓 李梅生

(陕西省人民医院血液病研究室 西安 710068)

近年来,人们为骨髓移植和基因治疗获得理想的细胞来源已对骨髓,外周血及脐带血中的干/祖细胞进行了深入的研究。而对胚胎造血的发源地——卵黄囊造血的干/祖细胞研究,迄今仅有关于小鼠的报道。本文就人卵黄囊造血及造血干/祖细胞进行初步探讨。

材料与方 法

取胎龄4周—5周的药物流产胚胎,经消毒后置洁净工作台中解剖分离卵黄囊。

1. 卵黄囊结构观察

用10%福尔马林固定卵黄囊,石蜡包埋后做成 $4\mu\text{m}$ 组织切片,进行苏木素-伊红染色(HE)后在光学显微镜下观察。

2. 卵黄囊细胞印片观察

将卵黄囊切开,在玻片上直接印片,置4℃冷丙酮

中固定半小时,彻底晾干后做瑞氏-姬姆萨染色及血红蛋白等细胞化学染色观察。

3. 卵黄囊细胞悬液制备

将卵黄囊置于无菌培养皿中,用机械方法切碎,毛玻璃研磨后经5号针头反复抽吸3次或加入胶原酶(sigma),终浓度 1mg/ml ,置4℃过夜,经RPMI 1640洗涤2次后用Hypaque-Ficoll分离液(比重:1.077,上海)分离,取界面层细胞,加入IMDM培养液(pH:7.2—7.4, Sigma)制备非贴壁细胞悬液。

(1) 造血祖细胞体外培养 半固体培养体系为本室常规培养体系^[1]。

(2) 细胞涂片观察 细胞经离心涂片机(cytospin 2 Shandon. Co)进行离心 800rpm/分 (57.2g) $\times 10\text{min}$,涂片经冷丙酮固定后瑞氏-姬姆萨染色。

本课题系人事部留学回国人员科技资助项目及省卫生厅科研基金项目。