

核酸原位杂交及其应用于哺乳动物基因定位的进展

叶秀珍 陈瑞铭

(中国科学院细胞生物学研究所)

核酸原位杂交应用于基因定位的研究是在七十年代发展起来的。这一技术的基本原理是利用核酸分子的碱基顺序配对的互补性 (A:T, G:C), 将已知的有同位素标记的外源核酸与细胞标本的染色体上经过变性解聚后的单链DNA, 通过二者特定碱基顺序的互补, 结合成专一性的核酸杂交分子, 经放射自显影方法显示其在染色体上的位置, 也就是把各种具有特定碱基顺序的基因在染色体上原位地确定下来。

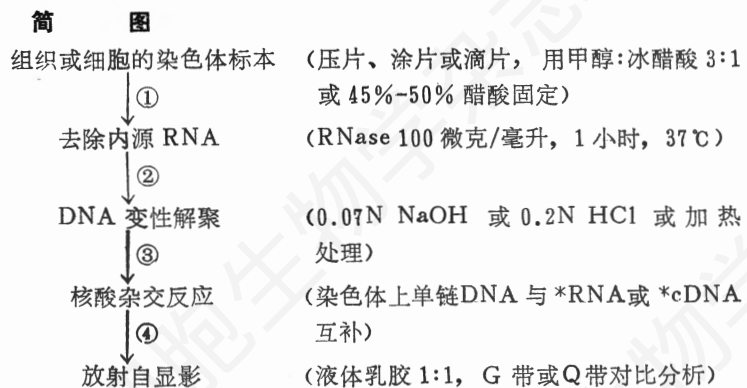
所使用的标记核酸, 有直接从细胞内提纯的RNA, 有以基因的DNA片段为模板, 通过需DNA模板的RNA聚合酶在体外转录的RNA (cRNA)。也可以用提纯的专一信息RNA (mRNA) 及经反转录酶在体外合成的互补性DNA (cDNA)。这些都是细胞基因的直接或间接转录产物, 与相应特定基因的碱基顺序具有互补性。

核酸原位杂交技术自French和Kitzmilller (1969)^[1]在果蝇唾液腺的巨染色体开始试用, 继由Gall和Pardue^[2]在爪蟾作了比较系统的工作以来, 已被广泛应用于多种具有重复拷贝的基因在染色体上的定位研究。近年随着技术的不断改进, 又应用于探索单拷贝基因的定位。与细胞杂交和染色体分带技术的结合亦提供新的成果。显然这种技术在研究细胞遗传学, 绘制高等生物和人类细胞的基因图以及基因表达的调控等问题中将会起着重要的作用。

一、核酸原位杂交技术的进展

原位杂交技术的操作程序, 详见Gall和

Pardue^[3]或其他工作者的工作。基本步骤如图图所示:



在这些步骤中核酸杂交反应应是比较关键的。要求标记的核酸化学纯度高, 比放射性强, 与染色体DNA的杂交率高或达到杂交饱和, 才能用放射自显影方法准确地原位探测到染色体上基因分子的定位。

在核酸样品的化学纯度方面, 近年已能够提纯各种类型的核酸, 特别值得指出的是已能够提纯十多种特定蛋白质的mRNA, 并进行着提纯真核细胞基因DNA分子。

制备有放射性同位素的核酸, 通常有三种方法: (1) 体内标记, (2) 体外标记, (3) 化学标记。后两种近年采用较多, 除方法简便外, 可以获得稳定的、比放射性高的标记核酸。体外标记是用大肠杆菌的DNA聚合酶、反转录酶或依赖DNA的RNA聚合酶等在体外含有³H标记的核酸前身物的温育系统中合成³H-DNA, ³H-cDNA 或 ³H-cRNA。一般的比放射性强度在10⁸cpm/微克。例如最近Yunis等^[4]提取人淋巴细胞株WIL₂的胞质Poly(A)-mRNA, 在体外用反转录酶合成cDNA, 成功

地示范人的大部分染色体上分布有专一的胞质 mRNA 的顺序。化学标记即用化学方法将放射性原子加到核酸结构内。用 ^{125}I 标记核酸是近来发展的便于获得标记核酸的技术之一。 ^{125}I 标记核酸的放射性水平与用 ^3H 前身物在体外标记所得大致相同,即 $10^8\text{cpm}/\text{微克}$ 。 ^{125}I 的放射能比 ^3H 强得多,而 Altenberg 等^[5]的工作表明, ^{125}I 标记核酸得到的原位杂交自显影图象如 ^3H 标记的一样清晰。这对于确定染色体上某些结构基因位置所需要的比强度来说,直接用 ^{125}I 标记 mRNA 分子要比体内标记再提取 ^3H -mRNA 高得多。原位杂交的比放射性强度一般要求不少于 $10^6\text{cpm}/\text{微克}$ 。

核酸的杂交率决定于核酸特定顺序的浓度和杂交反应的时间。一般进行原位杂交是在细胞标本上给以过量的标记核酸和充足的杂交时间以使染色体上特定顺序的 DNA 达到杂交饱和程度。能否通过放射自显影显示基因的定位,既依赖于染色体上核酸特定顺序的浓度,又决定于杂交分子的放射性强度。正因为这种原因,多拷贝的基因定位,如 rRNA 基因,5sRNA 基因,组蛋白基因等用原位杂交技术取得较成功的结果。要探测染色体上只有少数几个拷贝或单一拷贝的基因就相当困难。因为这些基因的大小只有染色体核酸含量的百万分之一。这是杂交方法正在进行探索和遇到的最大难关。至于标记核酸的放射性强度,关系到它作为探针用的效力问题,尤其是对于只有几个拷贝或单一拷贝的基因,要通过提高放射性探针的比强度才能确保自显影的效率。最近 Malcolm 等^[6]通过制备含异种基因的质粒(重组体)及纯系繁殖方法,大大提高了放射性探针的比强度。他们用三种不同探针:(1)含 rRNA 基因的细菌质粒,(2) rRNA 的 cDNA,(3)从含 rRNA 基因的质粒转录得到的 cRNA,比较它们探测染色体上 rRNA 基因的效率。结果表明,与 rRNA 基因重组的细菌质粒以比较低的放射性(只有 cDNA 比放射性的 $1/5$),在更短的曝光时间内(10天)得到满意的结果。说明应用含有

异种基因的质粒能把原位杂交的探测效率提高 10 倍。为什么这种质粒重组体能够明显提高原位杂交的敏感性呢?作者认为带有 rRNA 基因的质粒 DNA 双链可能与染色体内两条 DNA 链同时杂交,还附加非杂交的质粒部分,因而使杂交部位的放射性显著增强,这对于单一顺序的基因定位是很有利的。最近,小鼠血红蛋白的基因定位,就是应用这种技术上的改进取得了良好的结果。

根据 Evans 和 Atwood^[7]的分析,将细菌一载体系统中 DNA 重组体纯系繁殖然后用于原位杂交,能够大大提高杂交和探测的效率。它有几好处:(1)从扩增的重组体中纯化到一定量的特定 DNA 顺序。(2)杂交分子的放射性强度可以增幅几百倍,因为如前所述,标记的重组体 DNA 的双链可与染色体上相应的 DNA 双链同时杂交,而又把重组质粒非杂交顺序部分都一起连结到一个染色体基因位置上。(3)纯系繁殖的探针可以成为储存人类染色体专一基因的探针库。遗传工程技术与原位杂交技术的结合无疑地将推动原位杂交技术的应用,特别是对结构基因的定位方面,会有重大的发展。

细胞学技术的发展亦有力地提高杂交技术的精确度。最近, Yunis 等^[8]用同步化细胞制备前期末、中期前和早中期染色体 G 带标本,分析原位杂交后标记核酸的精确定位。他们发现 HeLa 细胞 Poly (A)-mRNA 和 HnRNA 的放射性银粒绝大部分分布在 G 带染色体的淡区。作者分析这些染色体标本分带的数目,比一般中期染色体提高 25—300%,总带数为 395,比巴黎会议(1975)的分带数目 338 明显提高。从染色体的长度看,前期末染色体是中期染色体的两倍,而早中期染色体比中期染色体长 33%。因此,应用这种高分辨率的染色体标本结合使用上述质粒系统提高放射性强度的原位杂交方法,有可能为人类染色体单一拷贝的基因绘图提供更有效的技术手段。

二、核酸原位杂交技术应用于基因定位研究的进展

核酸原位杂交技术可以用来多方面研究真核细胞基因的结构和功能：(1) 绘制染色体的基因定位分布图；(2) 通过染色体上已知的基因位置，判明所给予的未知核酸的特性；(3) 通过间期染色质的原位杂交，对不同类型细胞进行染色质组分的比较分析；(4) 由于对单一细胞能够进行分析，可对组织内各种细胞类型的基因增幅或复制不全进行研究，也可以对不同时相的细胞作对比研究；(5) 用 cDNA 进行原位杂交，可以研究一个细胞或一混合细胞群体各类 RNA 的定位分布。

但目前，这项技术主要应用于基因定位研究，是家谱分析和细胞融合方法绘制基因图以外的又一种直接绘图手段。

原位杂交技术建立后的最初 3—4 年间，已被广泛应用于五种天然 RNA 的基因定位研究，这五种 RNA 是：rRNA、5sRNA、tRNA、组蛋白 mRNA 和从多线染色体 Balbiani 环分离的巨大 RNA 分子。它们都是多拷贝的基因，在真核细胞的单倍体中含有几十至几百个基因拷贝。此外，重复顺序的卫星 DNA 基因定位也早已开展研究。在早期，多数的实验对象以双翅目和两栖类为主。近年迅速发展至哺乳类和人类染色体。真核细胞 mRNA 的提纯及其互补 DNA 的合成，结合其他技术的不断改进，不但对中度重复顺序的基因，而且对只有少数几个拷贝的基因，甚至单一拷贝的基因定位研究正在进行。

rRNA 的基因位于两栖类卵母细胞和双翅目多线染色体的核仁组织者区，已有证明。但在哺乳类，如小鼠的 rRNA 却杂交于 10 号染色体着丝点远端和 12 号、18 号染色体的次隘痕^[9]。近年来对猴、猿猴和人的 rRNA 的研究结果表明，前二者的 rRNA 基因只在一条染色体上，而人和黑猩猩的却在多条染色体上。rRNA 基因位置的变异，Hsu 等^[10]对六种

哺乳类的研究已有报导，他们指出：基因数量与着丝点的相关位置都是不恒定的。

5sRNA 虽是核糖体的固定组分，但其基因位置与核仁组织者区没有直接的联系。如爪蟾的 5sRNA 基因在几乎全部染色体长臂的末端，但相反，果蝇的只定位在 2 号染色体右臂 56E-F 带区。人的 5sRNA 基因定位在 1 号染色体 1q₄₁₋₄₃。最近，Szaba 等^[11]用人 HeLa 细胞的 ¹²⁵I-5sRNA 与小鼠骨髓细胞进行杂交，发现 5sRNA 定位在 12 号染色体，部分标本还见 9 号染色体有银粒分布。

至于 18s + 28sRNA 的基因位置，在多数哺乳类细胞是和染色体核仁组织者区连系的。18s + 28sRNA 的基因数目变异很大，如小鼠、袋鼠、猫以及长臂猿只有一个重复基因群位点，印度黄鹿有两个基因群位点，而人、黑猩猩、实验小鼠、野生小鼠、中国仓鼠和挪威大鼠等都有三个以上的基因群位点。人的 18s + 28sRNA 已被确定在 13, 14, 15, 21 和 22 号染色体上^[12]，荧光分带染色显示 21 号染色较强，14 号染色较弱，说明不是所有在 D 组和 G 组的染色体上的重复基因数目都相同。

tRNA 的定位至今未得满意的结果。虽然它是多拷贝的，但相当短，基因重复性低，而且不易从 rRNA 和 5sRNA 的污染中提纯。1974 年以来，用 ¹²⁵I-tRNA^{Lys} 或 tRNA^{Phe} 等数种单一 tRNA 已成功地果蝇染色体上进行定位^[13]。但对于哺乳动物的研究尚未见报导。

卫星 DNA 的研究方面，已知小鼠卫星 DNA 转录的 ³H-cRNA 定位在全部染色体着丝点异染色质区和 x 染色体上。人的四种卫星 DNA，其顺序主要在 9 号染色体着丝点和 Y 染色体长臂远端的异染色质区，其他染色体内（如 1 号染色体和 D 组 G 组）则含量很少。1978 年，Kurnit^[14]在牛、羊和山羊进行种间的原位杂交，发现卫星 DNA 全部定位在染色体着丝点旁。

mRNA 基因定位研究的进展：结构基因

的定位特别引起人们注目, 现正在进行的有:

(1) 组蛋白的基因定位: 1972年以来, 从海胆胚胎提取的组蛋白 mRNA 已成功地与其他真核细胞的 DNA 进行杂交。已知, 果蝇组蛋白基因定位在染色体 2, 39D-39E₁₋₂ 带区。人的组蛋白基因定位, 最近才由 Steffensen 等用分离的海胆卵组蛋白基因, 通过质粒系统制备成 ³H-cRNA, 确定在 7 号染色体上^[7]。Szaba 等^[15]采用另一种方法, 分离 HeLa 细胞的组蛋白 H₄ mRNA 与保留 7 号染色体的人×小鼠杂种细胞的 DNA 杂交, 得到了同样证实。

(2) 血红蛋白的基因定位; 最早是 Price 等^[16]用兔网织球 mRNA 进行实验, 他们指出血红蛋白的基因定位于人细胞的 2 号和 4 号染色体长臂上。对此有过争论。至 1977 年, Steffensen^[13]用高比活的 ¹²⁵I-mRNA 和改进原位杂交方法, 发现血红蛋白的 α 和 β 基因定位在 C 组染色体。最近, Henderson 等^[17]通过易位和细菌宿主-载体系统纯系繁殖方法才把兔网织球血红蛋白的 mRNA 确定在小鼠 11 号染色体 (α-血红蛋白) 和 7 号染色体 (β-血红蛋白) 上。由于血红蛋白是单一基因顺序的, 其定位研究要比组蛋白基因困难得多。目前, 对于人血红蛋白基因的定位, 有人应用分子杂交和细胞融合技术相结合的方法进行探索, 他们用 ³H 或 ³²P 标记核酸前体物, 由 DNA 聚合酶在体外以人的 α-或 β-血红蛋白 mRNA 为模板合成 cDNA, 再从啮齿动物和人体细胞杂交后保留有人染色体的杂种纯系中提取总 DNA, 两者 (cDNA 和总 DNA) 杂交的结果可以确定杂种纯系染色体内是否有 α-或 β 血红蛋白的基因存在。与此同时, 进行染色体核型和同功酶分析, 从而确定有 α-或 β-血红蛋白基因的是哪条染色体。Deisseroth 等^[18]用此方法确定人的 α-血红蛋白基因在 16 号染色体上。近两年的研究进展, 显然尚未把血红蛋白的全部基因位置完全确定下来。

最近, 值得介绍的, 是应用原位杂交技术可以在原位上测定细胞内基因转录的情况。

Conkie 等^[19]用血红蛋白的 cDNA 为探针, 探测用病毒或致癌剂引起转化的小鼠细胞胞质血红蛋白 mRNA 的含量变化。Harrison 等^[20]在胚肝内示范不同发育阶段的成红血细胞中血红蛋白 mRNA 的水平有变动。John 等^[21]以鸡胚骨骼肌重链球蛋白 mRNA 互补的 cDNA, 测量发育不同时期成肌细胞重链球蛋白 mRNA 的分布, 从而分析其合成的动力学。这种通过原位杂交方法进行 mRNA 定量和定位的研究, 有助于深入了解胚胎发育和基因表达的调控等问题。

参 考 文 献

- [1] French, W. L. and L. B. Kitzmoller, 1967. *Amer. Zoologist.*, 7: 782.
- [2] Gall, L.G. and M.L. Pardue, 1969. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 64:600-604.
- [3] Pardue, M.L. and J.G. Gall, 1975. *M-ed. Cell Biol.*, 10: p. 1-16.
- [4] Yunis, J.J., M.T. Kuo and G.F. Saunders, 1977. *Chromosoma.*, 61: 335-344.
- [5] Altenbury, L.C., M.L. Cetz, W.R. Craign, G. F. Saunders and M. W. Shaw, 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 70: 1536-1539.
- [6] Malcolm, S., R. Williamson, E. Boyd and M.A. Ferguson-Smith, 1977. *Cytogenet. Cell Genet.*, 19: 256-261.
- [7] Evans, H. J. and K. C. Atwood, 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 22: 146-149.
- [8] Yunis, J.J., J.R. Sawyer and D.W. Ball, 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 22: 679-683.
- [9] Bostock, C. J. and A.T. Sumer, 1978. In "The Eukaryotic Chromosome", 1978. North-Holland Publishing Company Amsterdam-New York-Oxford, pp.407-431.
- [10] Hsu, T.C., S.E. Spiriito and M.L. Pardue, 1975. *Chromosoma.*, 53: 25-36.
- [11] Szaba, P., M.R. Lee, F.B. Elder and W. Prenskey, 1978. *Chromosoma.*, 65: 161-172.
- [12] Evans, H. J., R.A. Buckland and M. L. Pardue, 1974. *Chromosoma.*, 48: 405-426.
- [13] Steffensen, D.M., 1977. In "Molecular structure of human chromosomes", ed

- Yunis, J.J., pp.59-68, Acad. New Yoek, San Francisco, London.
- [14] Kurnit, D. M., F. L. Brown and J.J. Maio, 1978. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 21: 145-167.
- [15] Szaba, P., L.C. Yu, T. Borun, F. Varicchio, M. Siniscalco and W. Prenskey, 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 22: 359-364.
- [16] Price, M.P., J.H. Conover and K. Hirschhorn, 1972. *Nature(London)*, 237: 340-342.
- [17] Henderson, A.S.M. T. Yu and K.C. Atwood, 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 235-240.
- [18] Deisseroth, A., A. Nienhuis, P. Turner, R. Velez, W.F. Anderson, F. Ruddle, J. Lawrence, R. Creagen and R. Kucherlapati, 1977. *Cell.*, 12: 205-218.
- [19] Conkie, D., N. Affara, P.R. Harrison, J. Paul and K. Jones, 1974. *J. Cell Biol.*, 63: 414-419.
- [20] Harrison, P. R., D. Conkie, N. Affara and J. Paul, 1974. *J. Cell Biol.*, 63: 402-413.
- [21] John, H. A., M. Patrino-georgonlas and K. W. Jones, 1977. *Cell.*, 12: 501-508.

植物染色体数目变化和植物分类

李 正 理

(北京大学生物系)

过去几十年中对于植物分类学很有影响的一个方面,就是应用植物细胞形态到植物分类和演化的研究。由于这种影响,从而形成了一门植物分类学和植物细胞学结合在一起的边缘科学,称为植物细胞分类学。这一学科后来并与植物细胞遗传学交织在一起,利用杂交等实验手段,更丰富了它的内容。而现在的所谓实验分类学,也很多是在植物细胞分类学的基础上发展出来的。到了近年更出现了根据细胞内DNA和蛋白质的变化来说明植物的分类和系统演化,这样,随着学科的进展,势将形成另一个新的分支,所谓大分子分类学(Macromolecular Taxonomy)。

一般植物分类学中应用细胞学的特征,主要是根据染色体的数目变化(倍性分析)和染色体的形态变化(组型分析),以这二方面作为比较的基础,将植物的分类系统和种、属的亲缘关系进行了更深入的考察。同时并将减数分裂时的染色体行为(价体分析)和结构变化,作为了解种群的演化和关系的补充。

其中以染色体数目的变化(整倍性和非整

倍性变化)最容易作为一种分类的鉴别特征。事实证明,用这种特征来区别种和种之间的差异,已有很大的价值。不过,近年也陆续发现,应用染色体数目的变化来区别各种植物,实际上并不只是简单的倍数增减,而是比较复杂的,牵涉面也较广的一个问题。

地球上的种子植物(裸子植物和被子植物)大约有25万到30万之间,这方面的具体数字,尚难取得一致的意见。例如Stuessy(1978)统计各种维管植物,计有:有花植物25万种,裸子植物750种,蕨类植物1万1千种。但是Grant(1963)则认为有花植物有28万6千种,裸子植物640种,蕨类植物1万种。不过,及到目前为止,已经知道种子植物染色体数目的种,可能还不到种子植物总数的十分之一。

就是那些已报导的各種植物的染色体数目,特别在二、三十年代早期所检查的,由于当时有的没有应用恰当的技术,观察的不够准确,以及没有将所用的植物的种名鉴定正确等原因,有些染色体数目可能尚需要有一些修正。有的染色体计数可能只看到一次,或者只从