

染色体分带技术及其应用

朱季美 丛笑倩

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

染色体是细胞的主要结构之一,是细胞遗传的物质基础,一般出现于体细胞的有丝分裂和生殖细胞的减数分裂过程中。已知一切动、植物的细胞核都具有一定的形态结构和数目的染色体。它对生物的发育、遗传、变异、进化和增殖等过程的调节和控制都具有极大的意义。

一百多年来,人们虽广泛的研究、记载了各种染色体核型,但只是从50年代起,才开始对染色体本身进行深入细致的分析,组织培养方法的应用,低渗溶液处理细胞,使细胞膨大从而获得分散得较好的染色体的技术的采用,都促进了染色体研究的发展^[1]。1956年Tjje和Leven才首次确认了人类二倍体细胞染色体数目为46^[2],从而结束了关于人类染色体数目的报道长期不一致的争论。人类染色体异常疾病也逐个被发现,如克氏症的性染色体为47,XXY、杜氏症为45,XO、唐氏症(先天愚型)的21染色体有3个等等。1960年Denver会议上确定了人类染色体国际统一记载标准:即按相对长度、着丝点指数、臂比分为七组。之后又召开了一系列会议——伦敦会议(1963)、芝加哥会议(1966)等等。从此人类染色体畸变与疾病及各种生物染色体的研究愈益引起了人们的重视。

近年来,染色体的分析方法又有了很大的进展。1968年Caspersson等人^[3]首先从氮芥喹吡啶(Quinacrine Mustard)染色在蚕豆、延令草属等植物细胞和中国田鼠细胞的染色体获得清晰的荧光分带。1970年他^[4]又成功地将分带技术应用于人体细胞的染色体分析,获得了染色体特殊分带图谱(即Q-带)。以后相继发展了C-带、G-带、R-带、T-带、Cd-

带和N-带等等各种分带方法。分带技术的发展不仅能更准确地进行同源染色体的配对和核型排列,而且能更精细地辨认染色体的结构和变化,例如染色体的易位、缺失、臂间和臂内倒位;能正确地识别特定的染色体如环状染色体、重组染色体等。以及追溯标记染色体,超数染色体和微小染色体的来源及探讨生物种属的染色体演化、性染色体的分化等等问题。因而分带技术在生物学中获得了广泛的应用。

染色体分带技术

染色体本身结构状态的差异可以用染料使其呈现,表现为带状的明暗区域。所用的染料不同或处理的方法不同,出现的分带也有区别。目前常见分带技术有以下数种:

Q-带: Caspersson (1970年)^[4]用氮芥喹吡啶对人类中期染色体染色后,在荧光显微镜下可见为暗区分割的光亮的荧光带称Q-带。每对染色体都有一定数目、粗细和部位分布的带纹,各条带的荧光强度也是一定的。在期间核内只有Y染色质呈荧光。用苯并咪唑染料Hoechst 33258^[5]、喹吡啶二氢氧化物等也都能获得好的Q-带^[6]。

G-带: Sumner 等人(1971)将分裂中期染色体制片在0.01N NaOH溶液中处理1—2分钟后,再经2×SSC溶液(0.3M氯化钠,0.03M柠檬酸三钠配于蒸馏水中)中60℃温育处理、吉姆萨染料染色即获得深着色带纹称G-带,亦称ASG法。现已有几十种不同的处理方式,结合吉姆萨染色获得类似的G-带。G-带图谱基本上与Q-带相同(即G-带深着色区相当于Q-带荧光区)。唯染色体1、9、16

次缢痕处Q-带为暗区(不发荧光或弱光亮区)而G-带则为深着色区。

目前国内外常采用简便的胰酶处理法,即用生理盐水新鲜配置浓度为0.25%胰酶液,调节pH至7.2—7.3,此时酶液清澄,即可使用。染色体制片置37℃胰酶液中,处理时间随片龄(染色体制片保存的日数)的长短而定。一般片令长处理时间应有所增加;或染色体制片经0.025%胰酶室温处理几秒钟后,再入2×SSC溶液中,在60℃温育1小时,结合吉姆萨染色亦能获得清晰的G-带。若染色体制片存放超过一月,则可采用Gallimore等(1973年)法处理后再染色,即先将染色体制片置2×SSC溶液中,在60℃温育3小时,然后移入1%胰酶液中处理几十秒钟(需用生理盐水新鲜配制胰酶液,一般存放在冰瓶内,温度不宜超过10℃)。水洗后,吉姆萨染色。

C-带: 染色体制片经酸、碱处理后,再经柠檬酸盐溶液处理,着丝点、次缢痕部位和Y染色体长臂远端一部分为吉姆萨液深染即C-带^[7,8]。C-带又称着丝点异染色质带,是高度重复顺序DNA部位。C-带大小变化可能和重复顺序DNA存在量有关。目前常规操作的方法是将片子置2×SSC溶液中以1M NaOH将pH调节至12,温育45秒,经2×SSC充分洗涤后,再浸泡在2×SSC溶液中,在65℃温育1小时,吉姆萨染色^[9];或用BSG法^[9],即先经0.2N HCl处理1小时(室温),水洗后浸入5%Ba(OH)₂(pH₁₃左右),在50℃处理10—15分钟,再在2×SSC中,在60℃温育1小时,水洗后染色。

R-带: 染色体制片经87—89℃生理盐水处理10分钟,吉姆萨染色获得深着色分带,与G-带的染色深浅程度恰好相反。染色体制片也可浸于1M NaH₂PO₄(pH4.0—4.5)中,在88℃处理10分钟,经流水洗后,以蒸馏水配制的吉姆萨染液(pH5.5—6.0)染色10分钟^[10]。

1979年Prantera等人^[11]采用5微克/每毫升的色霉素A₃或橄榄霉素配置在含

2.5mM氯化镁的磷酸缓冲液(0.15M氯化钠,0.03M氯化钾和0.01M碳酸氢钠,调节pH至7.0)中处理20分钟后,在上述缓冲液中封片。在不同的激发滤光镜下产生不同的激发光波而使同一染色体上同时显现出Q-带和R-带图谱。

T-带: 用热Ba(OH)₂液(pH13)处理;或用pH5.2—8.6各种有机盐和无机盐热处理,再经吉姆萨或荧光染料染色,使染色体末端区域着色即得T-带^[12]。T-带和R-带有助于检测染色体末端的缺失、添加和末端区域断裂点易位。

Cd-带: 经生理盐水(pH8.9—9.0),在85℃处理45分钟后,再经吉姆萨染色,在着丝点区域呈现两个大小相等小点,前中期则呈现一窄的长带^[13],这可能是代表与纺锤丝相联结的小球。

N-带: 经三氯醋酸和盐酸处理对核仁组织者区域^[14]专-染色,或用氨银(ammoniacal silver),在核仁组织者区域产生银染分带。^[15,16]这区域是酸性蛋白分布区域。

F-带: 孚尔根染色法产生的带称F-带。在Y染色体长臂远端一半区域Q-带、G-带呈正反应,而F-带则呈负反应。少数末端部分Q-、G-带为负反应,而F-带则正着色^[17]。

G-11方法: 用碱性吉姆萨(pH11)染色可获得C-带内亚分带^[18],可能是重复顺序卫星DNA的特殊类型,与C-带关系目前还不十分清楚,此法有助于检测染色体9次缢痕形态变化及臂间倒位。

目前在实验研究和临床应用中显示染色体分带的方法,以Q-带、G-带、C-带和R-带最为普遍。

无论用那种方法要获得较好的染色体分带的片子,我们认为必须应有分散好的染色体制片,如染色体具有一定的长度、姊妹单色单体不宜过度分开。每次制片时固定剂需新鲜配制。最好在细胞低渗处理后,立即在液中加少

量固定剂、搅匀后离心，再弃去低渗液重新固定，这样可使细胞不结聚成团，染色体完整。固定时间应适当，并多次更换固定液，便于去除染色体中蛋白质尤其是组蛋白，这样可以增加分带的清晰度。有人认为去除组蛋白H₁有利于获得好的G-带。一般制片在室温中需存放1—3天后再作分带染色。

至于各种分带出现的机理，直到目前为止仍不十分清楚。现在较一致地认为Q-带带纹确属富于A—T碱基成份。随着分带方法日益多见，往往用不同处理的方式可得极类似的分带图谱，因此染色体分带包括G-带、C-带等不能简单地看作代表染色体核酸的碱基差别，而是显示核酸、蛋白质组成和结构状态差异的一种方法。

分带技术的应用

一、确诊染色体异常疾病

随着分带技术在医学上的应用，目前已知许多遗传疾患都与染色体畸变有关。

(一) 慢性粒细胞白血病(CML) 1960年 Nowell 等首先发现人体慢性粒细胞白血病患者骨髓来源的血源细胞有专一的Ph¹染色体，当时认为是G组染色体中一个染色体缺失的结果。这一现象后来得到进一步证实，在CML患者中约占90%病例中存在Ph¹染色体。Oriordan等(1971)明确指出是G₂₂染色体之一。Rowley(1973)^[19]用Q-带和G-带证实Ph¹染色体是22染色体长臂缺失并移到第9对染色体长臂上t(9q⁺; 22q⁻)，并报道CML患者中没有Ph¹染色体的病人与有Ph¹的病人比较，在病床上有所不同，前者常是年老的患者，白血球和血小板数目较低，用药物二甲磺酸丁酯(Busulfan)处理不及Ph¹阳性者反应好，他们的生存期比Ph¹阳性者短。在转为急性期时，原有的Ph¹染色体也随之消失。在CML患者细胞中还存在着其它染色体易位t(2q⁺; 22q⁻)、t(19q⁺; 22q⁻)。当CML急性发作时常伴有其它异常染色体出现，例如

染色体17长臂等臂染色体，8号染色体为三体性，9号染色体三体性。骨髓细胞中21号染色体三体性和Ph¹染色体。

(二) 伯基特淋巴瘤(Burkitts Lymphoma) 伯基特淋巴瘤的染色体现已证实有一致的异常。Manolov等人^[20](1972)用荧光方法检测出染色体14长臂末端增添一额外带纹。此带来自染色体8易位t(8q⁻; 14q⁺)^[21]。

二、癌变细胞的染色体异常

染色体分带技术广泛应用于医学临床后，促进了临床对各种染色体疾病病因研究。

(一) 卵巢癌腹水细胞用常规染色体分析法常表现为“正常”的染色体，但经采用分带染色后(Q-带、G-带)，发现由于染色体重组而出现许多“新染色体”。所发现的六种重组类型在第一对染色体长臂中都能观察到^[22]。

(二) 陈汉源等^[23](1978)报道三例人体肝癌原级培养细胞染色体数为超二倍体或超四倍体，这可能来源于不同的两种肝细胞(2n和4n)，三例肝癌细胞D和G组染色体减少为全部染色体倍数值的一半，其中染色体15的单体性最为显著。相反E组和F组染色体都比其它组号平均增多二倍。G-带染色证明一个染色体1的短臂要比同源染色体增长一段，在这短臂末端额外多出一条着色较深带纹，认为可能来自G组染色体21的易位。

三、研究物种的系统发生及染色体本身的演化

(一) 近年来对生物的进化和染色体的演化问题也引起了人们的注意例如狒狒和非洲绿猴两种灵长类亲缘上属于远亲种猴类，它们的型核和人类的染色体核型完全不同，但经R-带、G-带研究证明、非洲绿猴端着丝点的染色体4和13的分带带纹和人染色体1短臂和人体染色体1长臂的带纹完全相同；并与狒狒的染色体1的短臂和长臂类同。狒狒的染色体1短臂带纹也完全与人体染色体1短臂相同。淀粉凝胶电泳分析证明绿猴的染色体4和染色体13存有人类染色体1短臂的烯醇酶—1

(ENO-1)、葡萄糖磷酸变位酶-1 (PGM-1) 和人染色体长臂的肽酶-C (PEP-C)。狒狒染色体1也存在 ENO-1, 但其 PGM-1 则介于人与小鼠之间。PEP-C 则与小鼠相同 (Finaz 1977)^[24]。又如徐道觉等^[25] (1975) 提出印第安吠鹿 (*M. Muntjak*) 雌性染色体数为 $2n=6$ 、雄性则 $2n=7$, 而中国吠鹿 (即中国小鹿) 染色体数 $2n=46$, 并全为顶端着丝点染色体。他认为这两种鹿染色体中可能存在分裂或融合的变化过程, 即6条染色体可能分裂成46条染色体; 或由46条顶端着丝点的染色体由罗伯逊易位或多次其它随意易位、融合而成为6条染色体, 在融合、易位过程中可能发生染色体着丝点的缺失。

(二) 狐类 *Lemur fulvus fulvus* ($2n=60$) 和 *Cheirogoleus medius* ($2n=66$) 是不同属的两种猴类, 它们的染色体经G-带、C-带、N-带等法证明 *C. medius* 的32对常染色体中27对G-带带纹和 *L. fulvus fulvus* G-带不易区分^[26]。因此可认为此两种猴类在系统发育上有密切的联系。

(三) 菲律宾卷尾猴 (*Cebus Capucinus - Oplalryrhini*) 的染色体经R-带、Q-带、C-带的分带图谱分析, 与人类染色体分带带纹极为相似^[27]。为人和类人猿起源于共同的祖先提供了依据。

(四) 1978年徐道觉等人^[28]研究了六种小鼠染色体 ($2n=40$): *M. musculus domesticus*、*M. musculus molossinus*、*M. Caroli*、*M. Cervicolor*、*M. Cookü* 和 *M. booduga fulvidiventris*, 各经G-带分析核型后, 证明同属于 *Mus* 亚属, 六种小鼠染色体带纹十分相似, 说明遗传物质的排列分布没有发生剧烈的变动。另外两种不同亚属小鼠 *M. Pahari* *Cochmys* 亚属和 *M. Shortridgei* *Pyromys* 亚属呈现完全不同的分带带纹, 由此说明不同亚属在系统发育上关系较远。

(五) 蝶螈 *Tritures. a. alpestris*、*Tritures. V. Vulgaris* 和 *Tritures. h. helveticus* 是同

属而不同种的三种蝶螈。经采用G-带分析其体细胞的染色体和减数分裂中期的染色体, 证明雄性的 *T. a. alpestris* 的染色体4和 *T. V. Vulgaris* 的染色体5分别在其一个同源染色体长臂的末端呈现为异形染色体配对, 即出现深着色的G-带带纹, 此为异染色质区域。而雌性蝶螈的染色体和 *T. h. helveticus* 的染色体则未呈现结构异染色质的异态性^[29]。可能染色体的异染色质化是性染色体分化的初级阶段。

此外依赖异种杂交细胞技术, 获得各种带标记染色体无性繁殖系细胞, 利用分带技术辨认其特有的染色体区、带, 再结合生化测定在特定的染色体区、带或亚带上确定某种产物, 这种基因定位方面的工作也屡见不鲜^[30]。随着分带方法的不断改进、创新, 目前不少已采用高分辨率分带方法, 即分析晚前期染色体分带带纹 (Yunis 1976)^[31], 以便更精细地研究染色体的分带结构和畸变。随着染色体的研究上新技术的应用以及对染色体的结构模式和分子结构的深入研究, 必将对许多疾病病因的分析, 基因图谱的精细定位和染色体本身的演化、发育和进化等问题的研究推向一个更新的水平。

参 考 文 献

- [1] Hsu, T. C., 1952 *J. Heredity*, 43: 167.
- [2] Tjje, J. H., Leven, A., 1956 *Hereditas*, 42: 1-6.
- [3] Caspersson, T., Farber, S., Feley, G. E., Kudynowski, J., Modest, E. J., Cimonsson, E., Wagh, U., Zech, L., 1968 *Exp. Cell Res.*, 49: 219-222.
- [4] Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., 1970 *Chromosoma*, 30: 215-227.
- [5] Hilwig, I., Gropp, A., 1972 *Exp. Cell Res.*, 75: 112-126.
- [6] Stefes, K., Arrighi, F. E., 1971 *Exp. Cell Res.*, 68: 228-231.
- [7] Yunis, J. J., Yasminch, W. G., 1971 *Science*, 174: 1200-1209.
- [8] Arrighi, F. E., Hsu, T. C., 1971 *Cytogenetics*, 10: 81-86.
- [9] Sumner, A. T., 1972 *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.

- [10] Schargacher, H. G., Wolf, U., 1974 "Method in Human Cytogenetics".
- [11] Pranter, G., Bonaccorsi, S., Pimpinelli, S., 1979 *Science*. 204: 79—80.
- [12] Wurster-Hill, D. H., 1975 In Busch, H., "Methods in Cancer Research".
- [13] Eiberg, H., 1974 *Nature*. 248, 5443: 55.
- [14] Matsui, S., Sasaki, M., 1973 *Nature*. 246: 184—150.
- [15] Goodpasture, C., Bloom, S. E., 1975 *Chromosoma*. 53: 37—50.
- [16] Howell, W. M., Denton, T. E., 1975 *Experientia*. 31: 260—262.
- [17] Rodman, T. C., Tahiliani, S., 1973 *Chromosoma*. 42: 37—56.
- [18] Bobrow, M., Mafan, K., Pearson, P. L., 1972 *Nature (New Biol)*. 238: 122—124.
- [19] Rowley, J. D., 1973 *Nature*. 243: 290—293.
- [20] Manolov, G., Manolova, Y., 1972 *Nature*. 273: 33—34.
- [21] Zech, L., Haglung, U., Nilsson, K., Klein, G., 1976 *Int. J. Cancer*. 17: 47—56.
- [22] Tiepole, L., Znfardi, O., 1973 *Cytogenet. Cell. Genet.*, 12: 8—16.
- [23] 陈汉源等, 1978, 实验生物学报, 11: 171—188.
- [24] Finaz, C., Cong, N. V., Cochet, C., Frézal, J., De Grouchy, J., 1977 *Cytogenet. Cell Genet.*, 18: 160—164.
- [25] Hsu, T. C., Pathak, S., Chen, T. R., 1975 *Cytogenet. Cell Genet.*, 15: 41—49.
- [26] Dresser, M. E., Hamilton, H. E., 1979 *Cytogenet. Cell Genet.*, 24: 160—167.
- [27] Dutrillaux, B., 1979 *Cytogenet. Cell Genet.*, 24: 84—94.
- [28] Hsu, T. C., Markvong, A., Marshall, J. T., 1978 *Cytogenet. Cell Genet.*, 20: 304—307.
- [29] Schmind, M., Olert, J., Klett, Ch., 1979 *Chromosoma*. 71: 29—55.
- [30] D'Ancona, G. G., Chern, C. J., Benn, P., Croce, C. M., 1977 *Cytogenet. Cell Genet.*, 18: 327—332.
- [31] Yunis, J. J., 1976 *Science*. 191: 1268—1270.

名 词 解 释

细胞遗传学(Cytogenetics)

细胞遗传学是根据生物的纯种和杂种细胞, 来分析研究作为遗传基因的传递者即染色体的行为、形态、构造、数目和组合, 并根据这些研究所得到的知识, 进一步阐明生物遗传现象的科学。它是一门属于细胞学与遗传学之间的边缘科学, 对遗传和变异机制的阐明, 动植物育种理论的建立, 以及生物进化学说的发展, 都有一定的意义。

操纵子 (operon)

操纵子是细菌染色体上的一小段 DNA, 它由结构基因和调控基因组成。调控基因位于结构基因附近, 控制其转录。一个操纵子可转录出一条为几个蛋白质编码的 mRNA 分子, 所以一个操纵子就是一个转录单位, 因此也有人称操纵子为转录子。

Jacob 和 Monod 在研究细菌基因表达的调控问题时, 于 1961 年提出关于操纵子的概念。他们所研

究的第一个操纵子模型为大肠杆菌乳糖操纵子。已对乳糖操纵子进行了广泛的探讨, 它由启动基因 (P 区)、操纵基因 (O 区) 和分别为 β 半乳糖苷酶、 β 半乳糖苷透过酶和 β 半乳糖苷转乙酰酶编码的三个结构基因组成。当用乳糖代替葡萄糖培养细菌时, 乳糖操纵子就开始表达, RNA 聚合酶与 P 区结合, 经过 O 区、然后对双链 DNA 中的一条链进行转录, 产生一条 mRNA, 它在核糖体上可翻译出上述三个酶蛋白, 细菌从而可利用乳糖作为它的碳源。乳糖操纵子的基因表达存在正控制和负控制两个调控体系。

除大肠杆菌乳糖操纵子外, 在细菌内搞得比较清楚的体系还有色氨酸操纵子, 精氨酸操纵子, 阿拉伯糖操纵子, 半乳糖操纵子和组氨酸操纵子等。

一般认为操纵子学说可代表原核生物基因表达的调控模式。

(叶敏)