

问题。近年,很多工作者观察到肿瘤病毒转化的细胞,它们的肌动蛋白纤维减少,肌动蛋白和肌球蛋白纤维的排列样式有改变^[30]。当转化细胞逆转,重新获得正常细胞性状时,纤维系统形成较正常样式。由此看来,对正常细胞骨架结构和功能的了解,是进一步认识肿瘤细胞生物学特性必不可少的方面之一。

参 考 文 献

- [21] Wessells, N. K. et al., 1971, *Science*, 171:135—143.
- [22] Palevity, B. A. et al., 1975, *J. Cell Biol.*, 65:29.
- [23] Avers, C. J. 1976, *Cell Biology*. pp. 391—400. D. Van Nostrand Company. New

York.

- [24] Sanger, J. W. 1975, *Proc Natl Acad Sci.*, 72:2451—2455.
- [25] Herman, I. M. et al., 1978, *Exp Cell Res.*, 114:15—25.
- [26] Fujiwara, K. et al., 1976, *J. Cell Biol.*, 71:848—875.
- [27] Fuller, G. M. et al., 1975, *Science*, 187: 948—950.
- [28] Sanger, J. W. 1975, *Proc Natl Acad Sci.*, 72:1913—1916.
- [29] Fujiwara, K. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 79:268—275.
- [30] Pollack, P. et al., 1975, *Proc Natl Acad Sci.*, 72:2994—2998.

(全文完)

从核酸免疫看染色体分带的机理^{*}

卫 林 祥

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

染色体分带技术是用某些细胞化学和免疫化学显色方法,在染色体臂、着丝点上显示出着色深浅相间的带谱的技术。

一、染色体分带技术简述

Caspersson 等^[1](1968)首先发现动植物细胞的中期染色体用喹吖啶芥染色后,在荧光显微镜下染色体呈现明、暗相间的荧光带谱,简称Q-带。此后 Arrighi 和徐道觉^[2](1971)报道了一种对着丝点异染色质区有特殊着色的技术,简称C-带。Summer 和 Evans^[3](1971)则采用 Giemsa 作染料,使中期染色体产生与Q-带相似的带谱,称作G-带。而 Dutrillaux 等^[4](1971)将G-带的操作适当改变之后,得到与G-带相反的带谱,叫做R-带(即反带)。此后,这十多年里又有许多作者报道了一系列新的分带技术,如表1所示。

表1中所列的染色体分带技术,大多是用各种不同染料进行的显色分带反应。同时也列入了最近由 Erlanger 和 Miller 建立起来的、

用免疫化学方法进行的专一性很强的染色体分带技术^[5]。有关用细胞化学方法进行染色体分带,已有许多报道^[6-8],在此不再详述。下面着重介绍用抗核酸抗体进行的特殊染色体分带法,并就分带机制作初浅的探讨。

二、抗核酸抗体的产生及其与染色体DNA的反应

1. 抗核酸抗体的产生

要将抗核苷或核苷酸(简称抗核酸)抗体用于染色体分带,首先应获得对嘌呤和嘧啶专一的抗体。Erlanger 和 Beiser^[9](1964)最早成功地建立了用嘌呤或嘧啶半抗原与蛋白质(通常用牛血清白蛋白或兔血清白蛋白)的结合物来免疫动物,从而获得对嘌呤或嘧啶有专一性的抗体。合成嘌呤或嘧啶与蛋白质结合物的具体步骤如图1所示。反应的起始物质是核糖核

^{*} 在本文写作过程中,承蒙庄孝德、曾弥白教授热情鼓励和指导,特此致谢。

表1 染色体分带类型

分带类型	处理方法	染料	特征
Q-带	不经处理	喹吖啶	Q-带及一些着丝点异染色质3+
G-带	1. G ₂ -期处理 放线菌素D 利福霉素 四环素 天青B(Azure B)	Giemsa	G-带以及一些着丝点异染色质3+
	2. 固定染色体的处理 2×SSC, 60℃, 1小时 蛋白酶 尿素 去垢剂 氧化剂	Giemsa	
	3. 抗腺嘌呤抗体(Anti-A)*		
	4. 在染色过程中处理	Giemsa, P Hg等	
R-带	1. 20mM PO ₄ , pH6.15, 87℃ 2. Earle's 盐, pH 6.5, 87℃ 3. 冷处理	Giemsa Ao	与 G-带相反
	4. 抗胞嘧啶抗体(Anti-C)*		
T-带	Earle's 盐, pH 5.1, 87℃	Giemsa 等	染端粒区
BUdR(或 BrdU)	1. 在S期的后半期将细胞暴露在BUdR下	Giemsa	显示出早期和晚期DNA复制区域
	2. 在第二次S期的一段时间里将细胞暴露在BUdR下	Hoeschesl	显示出早期和晚期DNA复制区域
C-带	1. 0.07 N NaOH, 2-6×SSC 2. DNase	Giemsa	染着丝点处的异染色质
	3. 抗甲基化胞嘧啶抗体(Anti-5MeC)*		
Giemsa-11	不经处理	Giemsa(pH 11) 37℃, 10-20分钟	在人类染第9染色体的次缢痕和一些其它染色体的着丝点异染色质
Cd-带	染色体固定后用 Earle's 盐 pH 8.5-9.0, 85℃处理45分钟	Giemsa	染着丝点
N-带	1. 5% TCA, 85-90℃, 30分钟; 然后 0.1 NHCl, 60℃ 30-45 分钟	Giemsa	染核仁组织者区域
	2. 银染色	银染料	染核仁组织者区域
Hoechst 33258	不经处理	Hoechst 33258	强烈地染一些着丝点异染色质

* 用核酸免疫化学分带法进行染色。

苷或核糖核苷酸。先让它们在室温下与少许过量的过氧化物起反应, 后者能将核苷或核苷酸中 2' 和 3'-羟基氧化成醛基。醛化的衍生物在 pH9—9.5 时通过赖氨酸残基与载体蛋白质形成

成一个酸不稳定的中间物, 这种中间物可用 NaBH₄ 还原成稳定的叔胺形结合物。

以上反应是逐步进行的, 不需要分离任何中间产物, 因此操作很为简便。利用这种方法能



图 1 合成核苷(或核苷酸)与蛋白质结合物的具体步骤

使 15—25 个核苷(或核苷酸分子)结合到一分子牛血清白蛋白上去。这个反应不限于合成核糖核苷酸与蛋白质的结合物,也可用于合成含邻羟基的任何糖苷与蛋白质之间的结合物。

由于脱氧核苷酸没有邻羟基,故不能与过碘酸起反应,形成二醛化合物。若要合成胸腺嘧啶与蛋白质的结合物,可将载体蛋白与 1-β-D-呋喃核糖胸腺嘧啶缩合即成。用这种方法制备的抗原来免疫动物,就能获得对胸腺嘧啶专一的抗体,它们也能与变性 DNA 起反应。

表 2 所列举的是在 Erlanger 和其他一些实验室中已经得到的三十多种不同核苷和核苷酸半抗原决定簇。其中包括五种主要的嘌呤和嘧啶碱基、一些所谓的稀有碱基、二核苷酸和

三核苷酸等。甚至还有人工合成的 Poly(rA)·Poly(dT) 杂交分子的半抗原决定簇^[10]。

2. 抗核酸抗体与染色体上单链 DNA 的作用

抗核酸抗体不能与天然双链 DNA 起反应,但能与单链或变性 DNA 的特定碱基起反应。因此抗核酸抗体是一种研究染色体 DNA 结构的有用工具,可为染色体分带机制提供直接的证据。抗核酸抗体与染色体 DNA 的作用随所使用 DNA 变性方法及抗体种类不同而不同。运用常用的一些 DNA 变性方法得到的染色体分带图谱结果如下:

1. 氢氧化钠变性 DNA 后与抗核酸抗体的结合 染色体经 NaOH 处理后,通常呈膨

表 2 对染色体研究有用的抗核苷和抗核苷酸抗体的决定簇

类别 名称	核糖核苷	脱氧核糖核苷	核苷一磷酸	二核苷酸	三核苷酸(密码子)
决定簇基团名称	尿嘧啶	胸腺嘧啶	AMP	ApA	ApApA(赖氨酸)
	腺嘌呤		UMP	ApG	ApApC(门冬氨酸)
	鸟嘌呤		GMP	CpA	ApApU(门冬氨酸)
	胞嘧啶		TMP	ApU	ApUpG(甲硫氨酸)
	5-甲基尿嘧啶			UpA	ApGpU(丝氨酸)
	5-溴尿嘧啶			ApG	ApGpC(丝氨酸)
	5-碘尿嘧啶			GpA	GpGpU(甘氨酸)
	6-甲基腺嘌呤			CpC	
	5-甲基胞嘧啶			CpG	
				GpC	

胀状态,以至只有抗腺嘌呤(Anti-A)和抗鸟嘌呤(Anti-G)抗体能与染色体DNA结合。但抗体在染色体上的分布是均匀的,不呈明暗相间的带谱。为克服这一困难,可采用其它DNA变性法来研究。

2. 甲酰胺变性DNA后与抗核酸抗体的结合 先将染色体在95%甲酰胺中,于65℃变性30—60分钟,再用间接免疫荧光法染色,Dev等^[11](1972)发现Anti-A在染色体上呈高度非均一结合。Anti-A荧光抗体沿着染色体长轴呈明、暗相间的带谱分布。所得到的带谱非常像Q-带或G-带的图谱,只是Y-染色体远端的嘧啶明带区域例外,它们与Anti-A的结合很少。

3. 光氧化变性DNA后与抗核酸抗体的结合 Schreck等^[12](1973)指出,在有亚甲基蓝存在的光氧化反应中,固定染色体DNA中鸟嘌呤残基被破坏,从而暴露了DNA互补链上的胞嘧啶残基。后者能与Anti-C结合,产生类似R-带的带谱。

图2^[12]为人类24条染色体用Anti-C、Anti-A、喹吖啶氮芥和Giemsa G-带法(从左至右)显示的分带方法。从图可知用后面三种方法得到的带谱总的说来非常一致。然而用Anti-C技术产生的带谱与用其他三种方法得到的带谱正好相反。即用Anti-C得到强染色的带区,当用Anti-A、喹吖啶或Giemsa G-带法染色时,只能得浅染色。

4. UV变性DNA后与抗核酸抗体的结合 Seaman发现,DNA用UV处理后,会在邻近嘧啶(大多是胸腺嘧啶)残基之间形成二聚体。Schreck等^[13](1974)用Anti-A、Anti-T和Anti-T-T与UV变性的染色体相互作用,产生类似Q-带或G-带的带谱,同时在染色体1、9、16的着丝点周围出现强荧光。Anti-C或Anti-G也能结合到UV变性的染色体上去。但这种结合较弱,且相当均匀地分布在染色体上。只是染色体9的着丝点周围例外,对Anti-C的结合明显增加。

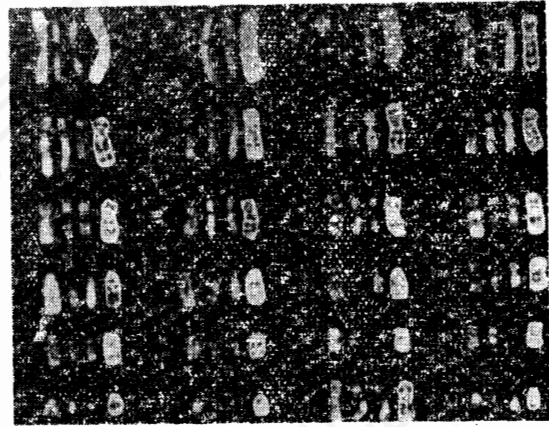


图2 人类24条染色体用Anti-C、Anti-A、喹吖啶氮芥和Giemsa G-带法(从左至右)显示的分带方法

Lubit等^[14](1976), Schreck等^[15](1977), Kahane等^[16](1978), Eastman等^[17](1980), 以及卫林祥等^[18](1981)发现Anti-5MeC能用于对染色体结构和功能的研究。图3为人类中期染色体经UV照射和Anti-5MeC间接免疫过氧化物酶法染色后显示的染色情况。从图可看到Anti-5MeC与UV变性DNA的结合集中在几个特殊位置处,即人类染色体1、9、16结

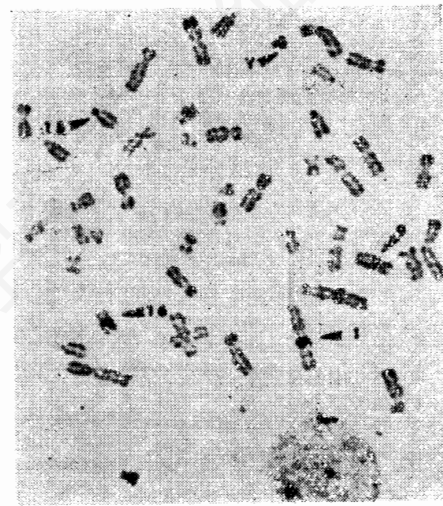


图3 人类中期染色体经UV照射和Anti-5MeC间接免疫过氧化物酶染色后的情况

图中所列数字为染色体号数,箭头所指为Anti-5MeC深染色区域。[引自Lubit等^[14](1976)]

表 3 染色体分带技术的比较

染色技术	相应的带谱模式		异染色质着丝点区的特殊染色			具近端着丝点次缢痕	Y-染色体长臂部分
	Q/或G	R	1 和 16	9	15		
细胞化学分带方法							
Q-带	+						+
G-带	+		+				
R-带		+					
C-带(结构异染色质)			+	+	+		+
N-带(核仁组织者)						+	
Giemsa II				+			
与 CRNA 原位杂交法							
卫星 DNA-II, 密度为1.693 克/立方厘米			+	+			
卫星 DNA-III, 密度为1.703 克/立方厘米				+			
核糖体顺反子						+	
抗核酸抗体(及变性方法)							
Anti-A(甲酰胺)	+						
Anti-A(UV照射)	+		+				
Anti-ApA(UV 照射)	+		+				
Anti-C(光氧化)		+					
Anti-C(UV 照射)				+			
Anti-5 MeC(UV 照射)			+	+	+		+

构异染色质的 C-带区域; 染色体 15 的相应 C-带区; 以及 Y-染色体靠远端的一半或 2/3 处。染色体 10、17、22 和 Y 有时会出现一个小的增强的 Anti-5MeC 结合区。

上面我们对用免疫化学方法进行染色体分带的一些基本特点作了描述。这种分带技术与用细胞化学进行的染色体分带之间的进一步比较可从表 3 看出。若将这些方法结合起来应用, 则可更精确地鉴定某些染色体的特殊区域, 并为探讨各种染色体分带的机制提供确切的证据。

三、从核酸免疫看染色体分带的机理

有关染色体分带的机制目前还缺乏较为一

致的说法^[10]。这里只能就几种主要染色体分带法的可能机理作简单介绍。

1. Q-带和G-带

Comings 等于 1972—1978 年间做了一系列工作, 证实染色体 DNA 中富 AT 片段有显著地增强喹吖啶荧光的作用。然而富含 GC 碱基对的 DNA 片段则引起喹吖啶荧光的淬灭。荧光强度的变化随碱基组成的四次方而变。目前一般认为 Q-带和 G-带显示染色体 DNA 上富 AT-碱基对区域, 而它们的带间则显示富 GC-碱基对区域。Anti-A 与用甲酰胺变性过的中期染色体 DNA 的结合, 更直接地证实了 Comings 等的发现。因为 Anti-A 倾向于主

要与染色体上显示Q-带和G-带的富AT区域结合。

蛋白质也可能阻碍喹吖啶结合到DNA上去,但这种蛋白质-DNA相互作用在产生Q-带上所起作用的程度还不知道。Comings认为形成G-带的原因也可能是由于染色体上G-带区域DNA的侧链为未被遮盖的“自由”DNA,它们能与Giemsa分子相互作用,致使染料在带区堆积起来呈深着色。而带间则由于种种目前还不太清楚的原因,以致不能与染料结合,呈浅着色。

2. R-带

Verma和Dutrillaux分别发现,染色体经76—95℃处理或用碱和甲酰胺溶液温浴时,构成G-带的富AT-碱基对被破坏,而形成R-带的富GC-碱基对仍处在天然构型,仍可显示R-带,这证明构成R-带的基础是GC-碱基对。

前面提到由亚甲蓝引起的光氧化反应能专一地破坏染色体DNA上的鸟嘌呤残基,致使Anti-C能与互补链上的胞嘧啶残基起反应,得到与用Giemsa或吖啶橙产生的R-带相似的带谱,这就更直接地证明产生R-带的机制在于染色体DNA上的富GC碱基对。

由此可知,中期染色体经适当处理之后, Anti-A倾向于主要与染色体上富AT区域结合,产生类似于Q-带或G-带的带谱。而Anti-C倾向于主要与富GC区域结合,产生类似R-带的带谱(如图2)。因此,主要的染色体带谱反映了染色体DNA上碱基组成的区域性分布。

3. C-带

Comings对于形成C-带的机制作了广泛研究后指出,与C-带密切相关的明显特征是染色体上非C-带区DNA被抽提,而C-带区DNA仍然保留在染色体上。Comings等发现,染色体经氢氧化钠和盐处理之后,染色体上80%的DNA被抽提。DNA优先从非C-带区被抽提之后,造成染色体臂的浅着色和着丝

点异染色质区的深着色。这也许是由于着丝点区的染色体结构是处在非常致密的状态,保护着那里的异染色质免受氢氧化钠和盐的破坏,从而产生C-带。

前面谈到Anti-5MeC、Anti-A、Anti-ApA和Anti-T-T能与用UV变性的DNA结合。这种结合在人类染色体1、9、16结构异染色质的C-带区域以及染色体15的相应C-带区域特别明显(如图3)。Jones已用DNA-RNA分子杂交法证明,人类染色体1和16上结合最强的C-带区域是富AT的人类卫星DNA-II。经UV变性后,它们可以与Anti-A、Anti-T和Anti-T-T结合。而染色体9上的C-带区域则含有卫星DNA-II和卫星DNA-III。因此5MeC残基存在于卫星DNA-II上,甚至也许也存在于卫星DNA-III上(表3)。

Comings于1972年和1978年曾先后二次对构成染色体带谱的机制进行了分析,提出染色体是由三种不同类型染色质组成的假说:(1)常染色质,(2)结构异染色质或C-带异染色质,以及(3)插入异染色质或G-带异染色质。同时对这些染色质分别在构成染色体带谱上的作用提出了假说。表4列举了这些染色质的主要特征。从表4中可明显看到,在G-带和R-带染色质之间有明显区别。用BUDR-Hoechst法对DNA复制先后顺序的研究表明,早期复制的富GC-DNA与R-带密切相关,然而晚期复制的富AT-DNA则与G-带有密切关系。此外,还可发现着丝点结构异染色质是高度甲基化的DNA,这可能与这区域的DNA在遗传活力上不活跃有关。

总之,有关染色体分带的机制问题,仍然是细胞化学家目前正在探索的问题之一。然而免疫化学方法在染色体分带技术上的应用,为阐明分带的机理提供了直接的证据。

参 考 文 献

- [1] Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.

表 4 染色体带谱里染色质的三种主要类型

特 征	着丝点结构异染色质	插入的“异染色质”	常 染 色 质
与带的关系	在C-带上	在G-带上	在R-带上
在染色体上的位置	通常在着丝点处	在染色体臂上	通常在染色体臂上
细胞分裂间期时的状态	浓缩状态	浓缩状态	弥散状态
遗传活力	不活跃	可能不活跃	通常是活跃的
DNA 复制的时期	晚 S 期	晚 S 期	早 S 期
DNA 中 AT 含量	富 GC, 中性或富 AT 由卫星 DNA 决定	富 AT	富 GC
DNA 重复程度	通常是卫星 DNA	中等重复顺序和不重复碱基	中等重复顺序和不重复碱基
DNA 甲基化程度	常常是高度甲基化	±	+
与粗线期染色粒的关系	着丝点处的染色粒	插入的染色粒	位于染色粒之间

- E., Kudynowski, J., Modest, E. J., Simonsson, E., Wagh, U. and Zech, L., 1968. *Exp. Cell Res.*, 49:219—222.
- [2] Arrighi, F. E. and Hsa, T. C., 1971. *Cytogenetics*, 10:81—86.
- [3] Sumner, A. T., Evans, H. J. and Buckland, R. A., 1971. *Nature New Biol.*, 232:31—32.
- [4] Dutrillaux, B. and Lejeune, J., 1971. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C.*, 272:2638—2640.
- [5] Miller, O. J. and Erlanger, B. F., 1977. *Human Cytogenetics: ICNUCLA Symposia On Molecular and Cellular Biology VII*:p. 87—99.
- [6] ISCN 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 309—396.
- [7] Comings, D. E., 1978. *Ann. Rev. Genet.*, 12:25—46.
- [8] 朱季美、丛笑倩, 1980, 细胞生物学杂志, 2:(2), 5—9.
- [9] Erlanger, B. F. and Beiser, S. M. 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52:63—74.
- [10] Rudkin, G. T. and Stollar, B. D., 1977. *Nature.*, 265:472—473
- [11] Dev, V. G., Warburton, D., Miller, O. J., Beiser, S. M. and Erlanger, B. F. 1972. *Exp. Cell Res.*, 74:288—293.
- [12] Schreck, R. R., Warburton, D., Miller, O. J., Beiser, S. M. and Erlanger, B. F. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70:804—807.
- [13] Schreck, R. R., Erlanger, B. F. and Miller, O. J., 1974. *Exp. Cell Res.*, 88: 31—39.
- [14] Lubit, B. W., Pham, T. D., Miller, O. J., Erlanger, B. F., 1976. *Cell*, 9:503—509.
- [15] Schreck, R. R., Erlanger, B. F. and Miller, O. J., 1977. *Exp. Cell Res.*, 108: 403—411.
- [16] Kahana, Z. E., Miller, O. J., and Erlanger, B. F., 1978. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 42:397—400.
- [17] Eastman, E. M., Goodman, R. M., Erlanger, B. F., Miller, O. J., 1980. *Chromosoma.*, 79:225—239.
- [18] Wei, L. H. (卫林祥), Goodman, R. M., Miller, O. J., and Erlanger, B. F., 1981. *Exp. Cell Res.*, (在印刷中).
- [19] Comings, D. E., 1978. *Methods in Cell Biol.*, 17:115—132.

T 淋巴细胞的酯酶标记及其应用

葛 日 萍

(河南省肿瘤研究所)

淋巴细胞参与机体免疫反应的作用和意义已为人们所重视。随着生物化学、生物物理学及细胞生物学的发展,认识又在日益加深。近年运用细胞化学和免疫学的方法,进一步了解

到淋巴细胞中存在着多种酶类,于是更引起大家的关注和兴趣。

本文曾承林飞卿教授及章谷生老师提出宝贵意见,特此致谢。