

位分析的网站在线服务和简单的分析软件都已经见到,而准确性也不断得到提高,但无论如何,在对表位进行预测后,人工合成肽用于对预测结果的功能性证实才是验证表位可靠性的唯一标准。

摘要

确定抗原分子被 T 细胞所识别抗原分子上的短肽序列,对 T 细胞表位进行定位对于特异性免疫应答的调节有重要意义。由于 CD4⁺ T 细胞表位和 CD8⁺ T 细胞表位在各方面性质的诸多不同,对这两种表位进行定位所采取的策略也应该是不同的。运用所选择的效应细胞对合成肽库的筛选是对 CD4⁺ T 细胞表位进行定位的有效策略,而对于 CD8⁺ T 细胞表位定位,需要通过一些特殊的手法将抗原肽导入细胞后进一步运用效应细胞进行筛选。

参考文献

[1] Barber LD, et al., 1993, *Annu Rev Cell Biol* 9:163-227.

- [2] Engelhard VH, 1994, *Annu Rev Immunol* 12:181-207.
 [3] Kirsten F, et al., 1991, *Nature* 353:290-296.
 [4] Juergen H, et al., 1993, *Cell* 74:197-203.
 [5] De Magistris MT, et al., 1992, *Cell* 68:625-634.
 [6] Anat FE, et al., 2001, *FASEB J* 15:187-194.
 [7] Maej NJ, et al., 1990, *J Immunol Methods* 134:23-31.
 [8] Adler S, et al., 1994, *FEBS Lett* 352:167-170.
 [9] Reece JR, et al., 1994, *J Immunol Methods* 172:241-254.
 [10] Taylor PM, et al., 1987, *In vitro culture of T cell lines and clones*. In Klaus GGB, ed *Lymphocytes* IRL press Oxford pp 133-147.
 [11] Seiji K, et al., 2000, *Immunol Lett* 72:53-60.
 [12] Moore MW, et al., 1988, *Cell* 54:777-785.
 [13] Rebecca LW et al., *J Immunol Method* 234:137-147.
 [14] Darji A et al., 1995, *Eur J Immunol* 25:2967-2971.
 [15] Alexander YR, et al., 1991, *Nature* 353:622-627.
 [16] Mattheakis JC, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9022-9026.
 [17] Hanah M, et al., 1987, *J Immunol* 138:2213-2229.
 [18] Claudia DL, et al., 1999, *J Immunol* 163:1725-1729.

B 染色体分子生物学研究进展

祁仲夏 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

B 染色体是独立存在于物种染色体组之外的一种特殊染色体,又被称为超数染色体(supernumerary chromosome)、附加染色体(accessory chromosome)或额外染色体(extra chromosome)^[1]。迄今已在 1000 多种植物和 300 多种动物中发现了 B 染色体。一般认为 B 染色体具有以下特征^[2]:1. 与常染色体(A 染色体)形态不同,在绝大多数含 B 染色体的物种中,B 染色体小于 A 染色体,其组成绝大部分为异染色质;2. B 染色体遗传不遵循孟德尔遗传法则,B 染色体在减数分裂时不分离,具有一定的积累和消减机制,例如在被检测的 1306 个玉米花粉粒中,B 染色体着丝粒不分离的频率约为 56.6%,不分离主要发生在减数第二次分裂,在减数第一次分裂中也偶有发生^[4];3. B 染色体有时在有丝分裂后期不分离,在含 B 染色体的物种个体中,不同的体细胞所含有的 B 染色体数目会有差异;4. B 染色体遗传活力是惰性的,其上不携带与主要性状相关的基因;5. B 染色体的存在对物种的影响通常表现为中性,在个别物种中会在适应性及生长等方面产生影响,这种影响会随物种个体携带 B 染色体数目的增加而

上升,例如在玉米中含 B 染色体的花粉会优先与卵细胞受精^[4];Polwman 对生长在河岸边的细香葱(*Allium schoenoprasum*)进行研究,发现在干旱情况下物种个体所含 B 染色体的频率与该物种种子的发芽率呈正相关,能增强种子萌发时抗干旱的能力^[5]。

众所周知,DNA 分子自身结构特点及其表达产物对染色体及其行为会产生决定性的影响,B 染色体也不例外,现代分子生物学的发展使了解 B 染色体的 DNA 结构特征成为可能。目前应用于 B 染色体研究的分子生物学技术手段主要包括:Southern 杂交、荧光原位杂交、减法杂交和染色体显微分离扩增技术。由于实验材料的限制,有关 B 染色体分子生物学的研究主要以禾本科的黑麦(*Secale cereale*)、玉米(*Zea mays*),菊科短毛菊属的(*Brachycome dichromosomatica*),两栖类的蛙类(*Leopelma hochstetter*),昆虫中的果蝇(*Drosophila subsilvestris*)及寄生黄蜂(*Nasonia vitripennis*)的研究最为深入。综合近年有关 B 染色体分子生物学研究报道可以发现,B 染色体 DNA 在组成上既与 A 染

色体 DNA 类似,又有其独特的序列和特征。

一、A、B 染色体共有序列

早在 70 年代, Timmis 等^[6]和 Flavell 等^[7]对含 B 染色体和不含 B 染色体的两种黑麦基因组进行 DNA 复性动力学研究,就曾发现二者之间在 DNA 组成方面无显著的差异,这也说明 B 染色体的 DNA 分子组成与常染色体的 DNA 分子组成相类似。

减数分裂时 B 染色体因不与 A 染色体配对,可以很容易的识别和分离。Sandery 等^[8]最早将染色体微切方法应用于 B 染色体 DNA 序列的研究。他们将减数分裂时不配对的 B 染色体进行原位裂解和提抽,并进行了微克隆。Southern 杂交分析显示,克隆文库中的克隆与含 B 染色体和不含 B 染色体的两种黑麦总体 DNA 都有杂交信号;因 B 染色体分离数目少,克隆文库不能覆盖整条 B 染色体,因而没有发现 B 染色体特异序列,但该研究结果有力地支持了 B 染色体与 A 染色体在 DNA 组成上十分相似的看法。Houben 等^[9]利用显微切割技术对黑麦 B 染色体的近端部位置进行了切割和 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-Polymerase Chain Reaction) 扩增,扩增产物与不含 B 染色体的黑麦总体 DNA 也有很强的杂交信号,同样验证了黑麦 B 染色体与 A 染色体的 DNA 组成具有相似性。其他植物中的 B 染色体,如玉米^[10]等,都与黑麦 B 染色体一样,有着与各自物种 A 染色体 DNA 组成类似的特征。在动物中,利用 AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) 技术, Tanic 等^[11]对同品系黄颈鼠 (*Apodemus flavicollis*) 中不含 B 染色体和含 1B、2B 和 3B 染色体的个体基因组的总体特征进行了初步分析,虽然从 DNA 定量方面可以区分基因组是否含有 B 染色体,但是 B 染色体的有无并不改变基因组的总体特征。

在 B 染色体功能组件,如着丝粒、端粒和复制起始点等方面,郭歌等^[12]以寡核苷酸 (CCCTAAA)₃ 为引物,从 B 染色体端部微切片段的 PCR 产物中扩增出了黑麦 B 染色体端粒相关序列。经原位杂交,该序列被定位到黑麦所有染色体的端部,同时它还与玉米端粒相关序列高度同源。张荣信等^[13]将黑麦 B 染色体着丝粒微切产物进行 LA-PCR (Linker Adapter PCR) 扩增并筛选到一个高度重复序列 pRBC6。该序列在玉米、水稻 (*Oryza sativa*)、顶芒山羊草 (*Aegilops comosa*)、拟南芥以及酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中都找到了与之高度同源的序

列。Liang 等^[14]从两色蜀黍 (*Sorghum bicolor*) BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 克隆的亚克隆中发现一个 745bp 大小的重复序列,该序列在禾本科多种植物中保守,并通过原位杂交定位于这些植物的染色体着丝粒区,在黑麦 B 染色体着丝粒区也有杂交信号。这些研究进一步表明植物 B 染色体在功能组件构成方面与 A 染色体也十分相似。

DNA 甲基化被认为是细胞调控基因活性的重要机制之一,在很多已知 B 染色体序列中都发生了甲基化。Neves 等^[15]利用 5-azacytidine 处理黑麦根尖,使其在 DNA 合成时掺入异常的胞嘧啶,发生类似甲基化的修饰,处理后的根尖细胞在有丝分裂后期染色体不能正常分离,其行为与 B 染色体在有丝分裂和减数分裂时不分离的行为十分类似。这一研究从一个侧面说明 B 染色体的细胞学行为与其 DNA 分子的修饰,特别是 DNA 甲基化密切相关。

冷泉港实验室对拟南芥 4 号染色体上的一个 0.5 - 0.7Mb 的异染色质区域进行了深入的研究^[16],他们发现该区域主要由一些高度重复序列转座子 (Transposon) 和反转座子 (Retrotransposon) 组成,基因被重复序列高度分割,密度也非常低,整个区域 DNA 序列的甲基化程度都非常高。传统的细胞化学方法早已证实,B 染色体主要是由高度凝集的异染色质组成,不难想像,B 染色体 DNA 也具有与异染色质类区似的特征。

二、B 染色体特异序列

植物 B 染色体 DNA 特异序列最早是从黑麦中获得的。Sandery 等^[17]用多种内切酶对含 B 染色体和不含 B 染色体的黑麦总 DNA 进行酶切分析,在 DraI、EcoRI 和 BamHI 酶切的总 DNA 产物中都发现了一个仅在含 B 染色体的基因组中出现的 DNA 片段。Southern 杂交分析显示三者可相互产生杂交信号,但杂交模式有所不同。这表明在黑麦 B 染色体上存在一个具有 DraI、EcoRI 和 BamHI 酶切位点的高拷贝重复序列家族,并被命名为 D1100。将 D1100 与含 B 染色体的黑麦种群及黑麦近源种 *Secale vavilavii* 进行杂交,结果显示 D1100 出现在黑麦与 *S. vavilavii* 在进化上相互分离之后,但又早于黑麦含 B 染色体种群的出现。随后,Blunden 等^[18]利用相似的方法又分离到另外一外 B 染色体特异重复序列家族——E3900。E3900 仅出现在黑麦中,禾本科的其他作物中不含这一序列。Houben 等^[9]利用显微切割技术对黑麦 B 染色体的近端部

位置进行了微切和 DOP-PCR 扩增,在扩增产物中检测到黑麦 B 染色体特异序列 D1100 和 E3900 序列。当以 D1100 序列特异引物对 DOP-PCR 产物进行扩增时,还发现了 D1100 类似序列,这些序列与黑麦 A 染色体 DNA 也有杂交信号,揭示 B 染色体上特异序列可能从 A 染色体演化而来。E3900 和 D1100 性质类似,只是具有不同的重复单位,它们紧密邻接,都定位于 B 染色体长臂的端部,E3900 则更靠近端粒部位。在 E3900 的一个亚克隆 pRAB2100 中存在一个 A、B 染色体共有的中度重复序列,该序列还同时存在于小麦和大麦基因组中。pRAB2100 的端部序列还与玉米的 Copia-类似反转座子 PREM2 和 Ropie 的多嘌呤结合位点高度同源。E3900 的第 2853-3384 位点与反转座子 Ty3/gypsy 家族中的 crwydryn 具有很高的同源性;该区域还包含编码部分 gag 蛋白的开放读码框(Open Reading Frame, ORF)。而在对 D1100 单位重复序列的分析中发现,其序列中包含一个微小反向重复可转座因子(Miniature Inverted-repeated Transposable Element, MITE) Tnr 1。除此之外,在 E3900 和 D1100 中都还含有与 Tnr 类似的序列^[19]。

Lin 等^[20]利用 RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) 技术,从含 A、B 重组染色体的 1B 和 B1 玉米株系中筛选出 B 染色体特异性标记: TB-4Sa、TB-1La、TB-3Sb、UBC313、UBC345、UBC349 和 UBC426。1B 染色体为 B 染色体和 1 号染色体之间的重组体,即具有 1 号染色体的着丝粒和 B 染色体的长臂;B1 染色体则具有 B 染色体染色体的着丝粒和 1 号染色体的长臂。由于不同的突变株系中 B 染色体长臂与 1 号染色体发生交换位置不同,可以通过检测特异标记在 1B 和 B1 染色体上出现的频率来确定标记在 B 染色体上的位置。利用这种方法上述标记被定位于 B 染色体(图 1)。Alfenito^[21]在对玉米的研究中,发现一系列与玉米及多种植物着丝粒序列同源性很高的 B 染色体特异序列。最近的研究表明,玉米 B 染色体着丝粒特异序列与玉米 4 号染色体着丝粒序列最为密切^[22]。

John 等^[23]最早报道了利用减法杂交获得的一个短毛菊属 *Brachycome dichromosomatica* B 染色体特异重复序列——Bd-49,其重复单位为 176bp。Leach 等^[24]对 Bd-49 重复序列又做了更深入的研究。Bd-49 序列位于 *Brachycome dichromosomatica* B 染色体着丝粒部位,经甲基化分析后发现 B 染色体上的这一重复序列是高度甲基化的,其甲基化位

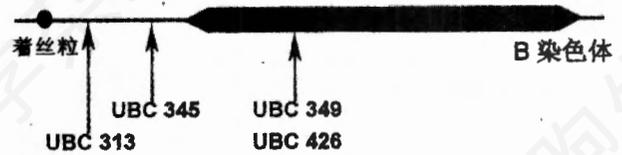


图 1 玉米 B 染色体分子标记的定位^[20]

点为^mCG 和^mCCG。Bd-49 重复序列在短毛菊属的其他物种中也有出现,降低杂交的严谨度和延长杂交时间,在 *Brachycome dichromosomatica* 的 A 染色体上也能检测到与 Bd-49 类似的重复序列。Franks 等^[25]又以 Bd-49 序列为探针,对全基因组文库进行了筛选,从 9000 个噬菌体克隆中仅筛选到一个含 Bd-49 序列的克隆 λBd49,在随后对 λBd49 亚克隆的分析中,共找到 6 个含 Bd-49 的亚克隆,部分克隆序列富含 AT,并分布于整个基因组,其中 Bd-49-6f 与莴苣(*Lactuca sativa*)基因组中的一个反转座子序列有 70% 的同源性,与 *Cladosporium fulvum* 的一个反转座子的同源性为 65%。

Jamilena^[26]在纤细还阳参(*Crepis capillaris*)中发现一个名为 pCc21 的 DNA 片段。序列分析显示 pCc21 序列中包含一段 54bp 富含 CA 的序列: GATCTAACACACGCAGTACACACACACCAAACACACACAGACACACATAGAAAACGT。这一 CA 富含区分布于整个基因组中,在 A、B 染色体之间的差异则表现为该序列拷贝数的差异。

在寄生黄蜂(*Nasonia vitripennis*)中存在一种特殊的 B 染色体,即 PSR (Paternal Sex Ratio) 染色体。*N. vitripennis* 是以单双倍体来决定个体的性别,即受精卵发育成为雌性,未受精卵发育成雄性,但是当雌性与含有 PSR 染色体的雄性交配后,其后代全部都为雄性个体。细胞学的观察和研究发现在受精卵第一次有丝分裂时,PSR 染色体可以使来自父方的常染色体高度凝集并在随后的分裂过程中丢失。Nur^[27]和 Eickbush^[28]等构建了含有雄性 PSR 染色体的噬菌体文库,在 6000 多个克隆中找到 36 个只与含 PSR 染色体个体有杂交信号的克隆,并最终筛选出四个 PSR 染色体特异的高拷贝重复序列: PSR2、PSR18、PSR22、PSR105。PSR2 重复序列在不同克隆间具有 92% - 99% 的同源性,并含有一个 171bp 长的重复单位;PSR18 的重复单位为 154bp,它和 PSR2 序列之间具有 73% 的同源性;PSR105 为 PSR18 的一个亚家族,具有 214bp 长的重复单

位;PSR22 重复序列中则包含一个 183bp 长的重复单位。这些序列在 PSR 染色体中的含量可高达 30%,在 *N. Vitripennis* 的近源种 *N. Longicornis* 和 *N. Giraulti* 中也发现了它们的同源序列。这几个 PSR 特异重复序列中都有两个短的保守序列,即保守区 I; AAAGTCNGACTT 和保守区 II: TTT-TATAAAA,对于这两个保守区的功能尚不清楚。根据 PSR 染色体在有丝分裂过程中的反式作用,这两个保守区可能参与结合某些维持常染色体正常结构的蛋白,或者它们编码某些导致常染色体凝聚的蛋白,致使染色体凝聚。

Gutknecht 等^[29]利用基因组 DNA 酶切差异显示的方法在果蝇中发现一个新的 B 染色体特异的高度重复序列,命名为 PsSP216。PsSP216 具有一般高度重复序列的特征:以 216bp 为单位高度重复,不同的重复序列单位之间同源性在 93% 以上。原位杂交时,该序列与整条 B 染色体都有非常强烈的信号,在 A 染色体着丝粒部位也有信号。PsSP216 高度重复序列可能携带了某些与染色体结构特别是着丝粒结构域有关的信息。

生长在新西兰的一种蛙类 *Leiopelma hochstetter* 性别决定为 ZW/ZZ 型,该物种中的 B 染色体与 W 染色体具有非常类似的特征,已发现的 B 染色体特异序列:34L4605、34L4477、34L7416、34A16649、35A2393、35A2433 和 35A18317 同样也出现在 W 染色体上^[30]。在 *Leiopelma hochstetter* 中,B 染色体的产生很可能是单价 W 染色体重组和重复序列快速扩增的结果,B 染色体的进化很可能与雌性决定 W 染色体上的特异 DNA 有关。

现代分子生物学的技术手段揭示了 B 染色体 DNA 的一般特征,使有谜一般身世的 B 染色体不再深不可测。在 B 染色体分子生物学的相关报道中都清楚的显示出 B 染色体与 A 染色体 DNA 组成的相似性,从分子水平上为 B 染色体来源于 A 染色体提供了强有力的证据。B 染色体一旦在物种中产生,会沿着其独特的进化路线前进,并具有种种特殊的性状和行为。就目前的研究来看,在动物特别是昆虫和两栖类中 B 染色体具有与性染色体类似的特征,而在植物中通常不存在性染色体;似乎在动物和植物中 B 染色体的产生途径会有所区别。虽然已经在不同物种中发现了一些 B 染色体特异的序列,但这些序列基本上都是高度重复序列,也只定位于 B 染色体的着丝粒和端粒部位,就认识 B 染色体的本来面目而言,未知还远远大于已知。真正了解

B 染色体的起源和进化,不仅可以揭示遗传物质及其载体的演变途径,还可以开发 B 染色体在染色体工程中的巨大潜能。

摘 要

B 染色体是独立存在于物种染色体组之外的一种特殊染色体,广泛存在于动物和植物中。近年来随着分子生物学技术手段的不断发展和完善,在分子水平上对 B 染色体有了更全面和深刻的认识。B 染色体 DNA 组成与常染色体(A 染色体)极为相似,大部分 DNA 序列是 A、B 染色体所共有的。B 染色体同时还含有相当数量的特异性 DNA 序列,已发现的 B 染色体特异 DNA 全部为高度重复序列,多分布于 B 染色体的着丝粒和端粒部位。但是,目前对 B 染色体的了解还非常有限。

参 考 文 献

- [1] Beukboom L. W. et al., 1994, *Heredity*, 73:328-336.
- [2] 王玉元, 1997, 武汉植物学研究, 15(1):73-79.
- [3] Jones R. N., et al., 1982, *Academic Press*, pp:1-167.
- [4] Wayne R., et al., 1992, *Genetics*, 131:211-223.
- [5] Plowman A. B., et al., 1994, *Heredity*, 72:587-593.
- [6] Timmis, J. N., et al., 1975, *J. Exp. Bot.*, 26:367-378.
- [7] Flavell, R. B., et al., 1975, *Heredity*, 35:127-131.
- [8] Sandery M. J., et al., 1991, *Plant molecular biology reporter*, 9(1):21-30.
- [9] Houben A., et al., 1996, *Chromosoma*, 105:97-103.
- [10] Stark, E. A., et al., 1996, *Chromosome Res*, 4:15-23.
- [11] Tanic N., et al., 2000, *Genome Research* 10:55-61.
- [12] 郭歌等, 1998, 植物学报, 40(12):1123-1128.
- [13] 张荣信等, 1999, 科学通报, 44(5):520-524.
- [14] Liang J., et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:14210-14213.
- [15] Neves N. et al., 1992, *Genome*, 35:650-653.
- [16] The Cold Spring Harbor Laboratory, 2000, *Cell*, 100:377-386.
- [17] Sandery M. J., et al., 1990, *Genome* 33:908-913.
- [18] Blunden R., et al., 1993, *Genome*, 36:706-711.
- [19] Langdon T., et al. 2000, *Genetics*, 154:869-884.
- [20] Lin B. Y., et al., 1997, *Theor. Appl. Genet.* 94:534-538.
- [21] Alfenito M. R., et al., 1993, *Genetics* 135:589-597.
- [22] Pagea B. T., et al., 2001, *Genetics* 159:291-302.
- [23] John U. P., et al., 1991, *Genome*, 34:739-744.
- [24] Leach C. R., et al., 1995, *Chromosoma*, 103:708-714.
- [25] Franks T. K., 1996, *Chromosoma*, 105:223-230.
- [26] Jamilena M., 1995, *Chromosoma*, 104:113-120.
- [27] Nur U., et al., 1988, *Science* 240:512-514.
- [28] Eickbush D. G., et al., 1992, *Chromosoma*, 101:575-583.
- [29] Gutknecht J., et al., 1995, *Chromosoma*, 103:539-544.
- [30] Sharbel T. F., et al., 1998, *Genome*, 41:14-22.