

度梯度离心后与高速法所得样品一样可分成上下二条区带,这是因为样品中存在封闭与不封闭两种影泡之故^[7]。

综上所述,低速法分离影泡虽然膜蛋白产率低,但由于不需高速离心机等设备,作为一种分离红细胞影泡的简易方法仍是可取的。本法除适用于人红细胞影泡的制备外,亦可用于家兔等动物红细胞影泡的制备。

三、讨 论

分离影泡,一般常用高速离心法(20,000 × g, 40 分钟左右)^[2],近来也有人用分子筛、琼脂糖 4 B 柱分离法^[9],而用低速离心法的报道尚不多见。本文用低速离心法制备影泡,在形态、膜蛋白电泳图谱和其他性质等方面均和高速离心法所得者相同,所不同的是膜蛋白产率较低。这主要是由于低速离心法的离心速度低,影泡不能全部沉淀最终影响膜蛋白产率。

由表 2 可见,在高速离心法中,人红细胞影泡膜上的乙酰胆碱酯酶能全部回收,这和

Hanahan (1974)^[10] 的报道是一致的。而在低速离心法中,乙酰胆碱酯酶活性不能全部回收,这可能和低速法的分离效率有关。

文中的电镜照片,由本校电镜室姜福民同志摄制,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Schwoch, G. et al.: *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2**, 197, 1973.
- [2] Dodge, J. T. et al.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **100**, 119, 1963.
- [3] 中国科学院北京动物研究所细胞室、生物膜组:《生物化学与生物物理进展》, **1**, 22, 1977.
- [4] Lowry, O. H.: *J. B. C.*, **193**, 265, 1951.
- [5] Ellman, G. L. et al.: *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88, 1961.
- [6] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, **10**(13), 2607, 1971.
- [7] 秦德安,何学民、左大珏:《华东师范大学学报》(自然科学版), **3**, 103, 1982.
- [8] Steck, T. L. et al.: *Science*, **168**, 255, 1970.
- [9] Fröman, G.: *Preparative Biochemistry*, **10**(11), 59, 1980.
- [10] Hanahan, D. J. et al.: *B. B. A.*, **363**, 283, 1974.

[本文于 1982 年 1 月 15 日收到]

原位杂交技术的新进展

原位杂交是 60 年代末期开始建立的在染色体上或细胞内对特殊基因进行定位的技术。根据具有互补碱基序列的两条多核苷酸链,在适当的反应条件下可形成杂交双链的原理,用一个带放射性标记的多核苷酸(DNA 或 RNA)作为探针,与经过预处理使其中 DNA 变性或外露的染色体或细胞样品共同保温,然后用放射自显影法对杂交位置做出鉴定。近年来,随着探针提纯和标记技术的改进,以及多种新型探测技术的出现,不但提高了原位杂交技术的分辨率,而且扩大了此技术的应用范围。成为研究基因在细胞核内的空间组编方式,及其在分化和发育过程中作用和表达方式等重要课题的有效手段。这里准备介绍一些技术方面的新成就。

原位杂交技术,最初用来确定许多物种基因组内大量重复序列在染色体上的位置,取得成功。但在用于测定特异基因在染色体上的位置时却遇到了困难。首先是这些基因在基因组内的复份不多,所占比例也少,难于用普通的物理方法进行提纯;其次是用一般方

法标记的探针,在其基因部位给出的信号比较微弱;再有就是用提纯的 RNA 作为探针时,如果探针内混有少量由 DNA 重复序列编码的 RNA 杂质,那么这些杂质就不仅可能在其本身的基因位置上给出信号,而且有时信号很强,甚至可以超过主要 RNA 探针产生的信号。一个突出的实例是有人用“提纯的” tRNA 作为探针,在果蝇染色体上进行基因定位,曾发现在 5S RNA 的基因部位出现杂交信号,强度可与 tRNA 基因处的信号媲美。定量观察表明:果蝇体系中, tRNA 探针内即使混入 0.1% 的 5S RNA 也能给出可观的信号,因此在使用提纯的 RNA 作为探针时,对结果进行解释必需十分慎重。近年来重组 DNA 和 DNA 克隆技术的不断发展,从基因组内分离出特定的基因或规定的 DNA 段落已经成为许多实验室的日常工作。现在已可制成分析任何基因在染色体上定位用的探针,克服了原位杂交技术中探针提纯带来的困难。

曾有人采用比活为 $1-5 \times 10^9$ dpm μg^{-1} 的标记探针,根据果蝇多丝染色体和人二倍体染色体上 5S RNA

和 rRNA 定位的模型实验,对原位杂交技术的探测极限进行过测定。计算出一个接近于 10^3 bp 的单拷贝基因,在放射自显影中需要经过 60 天曝光时间,才能在每个杂交位置上给出相当于 0.12—0.6 喱的银粒,这种比活水平的探针,可以用无载体标记的 NaI 直接碘化法进行常规制备,或用氘标记的核苷酸作为前体用 cRNA 或 DNA 转录法制备,也可用三种标记前体,在取代合成中对 DNA 探针进行氘标记。氘标记的探针,虽然比活较低,但由于能放出 β 辐射,对提高放射自显影的分辨率是有利的,然而即使如此,在使用中仍需在长时间曝光以后,仔细分析数据才能获得比较可信的结果。由此可见,为便于常规进行单拷贝基因的定位工作,有必要采取措施提高原位杂交体产生的探测信号。

最容易的一种增强探测信号的方法是提高探针的比活水平。采用目前已有商品供应的高活力 ^{125}I 标记的 dCTP ($\geq 1000\text{Ci}/\text{mmol}$) 作为前体,已可用取代合成法或 cRNA 转录获得比活接近于 $4 \times 10^9\text{dpm}/\mu\text{g}$ 的探针。利用这样标记的 SV40 ^{125}I -cRNA 探针来测定这种病毒在哺乳类染色体上嵌入的位置,在放射自显影中只需曝光不到一周,即可获得足够数量的银粒。

另外一种增强杂交体探测信号的方法,是通过增加探针分子的大小来间接提高信号。Tcraba 等描述了一种利用探针网络探测原位杂交体的巧妙方法,他们把带有 poly(A) 尾巴的病毒 RNA 探针与鸡染色体杂交,然后在所得杂交体的 poly(A) 尾巴上,用一个带 ^{125}I 标记 poly(BrUrd) 尾巴的 DNA 复合物与之配对形成互补结构,借以测定染色体上病毒 RNA 杂交体的位置。这里所用的 DNA 复合物是把 ^{125}I 标记的高分子量海胆 DNA 先行变性,待其复性时由于散在的重复序列之间可发生随机的碱基配对,而形成网络结构。由于 ^{125}I 先标记在 DNA 网络上再与杂交体结合,给出的杂交体探测信号就是 DNA 网络大小的函数,而不再是原来的 poly(A⁺) RNA 探针本身的信号。这种方法唯一的不足是 poly(A⁺) RNA 探针仍需经过高度提纯。

取代合成的杂交质体序列,也能通过形成探针网络来扩增已知杂交体的信号,这是因为探针分子本身,用取代合成法进行标记时可被随机切断,而形成探针网络。在杂交缓冲剂中增加 10% 葡聚糖硫酸盐,可增加探针网络形成的速率。葡聚糖硫酸盐还可提高杂交反应速率,不论此反应是在溶液中、滤纸上还是在原位发生。在 DNA 印渍上用双链探针得到的杂交信号要比用同等比活的单链探针得到的信号大 100 倍之多。原位杂交中也可得到类似的结果。增强后的信号确实很大,以致最近在曝光 5 至 22 天的放射自显影图中已测出几种单拷贝基因,包括人体 α -珠蛋白基因、人体胰岛素基因、锡兰仓鼠 CAD 基因、人体 α 胶原蛋白基

因、人体肌动蛋白基因和人体免疫球蛋白 κ 轻链基因,在染色体上的位置。这些基因都是以 ^{125}I dCTP 或 ^3H dXTP 作为前体,用取代合成法标记杂交质体序列形成的探针网络,来进行染色体定位的。这样的探针并不需要特别高的比活力,网络的最佳大小是 500—1000 bp,对于扩增探测信号的效果来讲,探针网络的大小要比探针的比活更为重要。肌动蛋白的定位中,单个基因位置的信号平均每个曝光日得到两个银粒,如果没有形成探针网络,那么预计得到的信号只能相当于每个曝光日 0.01—0.02 银粒。这样高的信号增强水平,使任何可以形成杂交质体的基因都能很容易在二倍体染色体上定位。

染色体上基因定位的研究中,另外一种重要的改进是把染色体分带技术与原位杂交技术结合使用。这些方法,包括用胰蛋白酶或 1% lipsol 去垢剂处理后把姬姆萨分带的染色体预先拍照,或者在杂交反应以后用喹吖因芥子将染色体染色以获得 Q 带。此外,在杂交和放射自显影以后只要用瑞氏-姬姆萨染色,总能在中期染色体中得到 G 带图案。最近还观察到准备作 R 分带的染色体,不需要进一步变性即可用于原位杂交实验。如果感兴趣的基因恰好位于 R 分带处理时引起变性的区域,那么就可直接测定与探针杂交的位置。

原位杂交技术,在可以作为在细胞和组织中,进行染色体上 DNA 或 RNA 序列定位和定量工作的常规手段并获得可重复的结果以前,还有些附带的技术问题需要解决:首先必需把细胞或组织样品牢固的粘着在载玻片或盖玻片上,以利于对寓有特异基因序列和表达此种基因的细胞群体进行定量研究;其次是要使细胞可被杂交探针顺利的渗入,而同时保持基本形态特征不致过份受损,还必需确定有效的进入可渗透细胞所需探针的最佳大小;最后,必需使外露的靶序列在整个原位杂交的操作过程中,保留在可渗透细胞内部。粘着问题可以在放置细胞或组织样品前,先在培养基上用明胶着色基、丹氏溶液或变性血清和聚乙烯吡咯烷酮涂层的方法解决。杂交实验前细胞材料的处理条件(包括固定步骤、酸、去垢剂和/或蛋白水解酶处理)已经改良,并已测出可以得到最强杂交信号的探针序列长度,大约为 50—100 个核苷酸。杂交步骤临开始前,用聚甲醛短时间处理细胞,可使细胞内保留的 DNA 和 RNA 增加。这种第二次固定处理,可提高杂交信号强度 3—5 倍。把这样的步骤与含甲醛胺和葡聚糖硫酸盐的杂交试剂结合使用,现在已有可能在放射自显影曝光 10—13 天后测出细胞内长度为 10kb 的单拷贝病毒 DNA 的嵌入位置。

尽管原位杂交实验中已广泛应用放射性标记的探针,但即使采用低能氘标记,衰变颗粒的轨迹和放射自显影乳胶的厚度,仍对确定靶序列在染色体或细胞内位置的精确性有所限制。最近有些研究小组正探索着

用其它方法探测多核苷酸在染色体上的结合位置。例如, Rudkin 和 Stollar 研制了针对 DNA-RNA 杂交体的抗体, 用免疫细胞化学的方法探测果蝇多丝染色体上的基因。Bowman 等用化学方法把荧光素或玫瑰红偶联在 RNA 分子的 3' 末端制成探针进行细胞或果蝇染色体的原位杂交。荧光标记探针的使用, 不但可快速获得结果, 其主要的优点是显著提高分辨率, 因为荧光显微镜对绿色荧光的分辨力可以达到 $0.25\mu\text{m}$, 而 ^3H 或 ^{125}I 放射自显影的分辨率最多只能分别达到 $1\mu\text{m}$ 和 $4\mu\text{m}$ 。

多核苷酸探针也可以不用放射性标记而用生物素(一种水溶性维生素)进行标记, 利用生物素可与抗生物素蛋白发生相互作用的特点用免疫法予以探测。将生物素分子用一个含 4、11 或 16 原子组成的连接臂共价的连接的嘧啶环的 C5 位置上, 合成 TTP 或 UTP 类似物。在离体条件下, 这类带生物素标记的核苷酸类似物, 可以作为核酸聚合酶的底物掺入 DNA 或 RNA。合成的带生物素标记的 DNA 或 RNA 可作为探针有效地参与标准杂交反应。杂交位置可根据探针内部的生物素标记, 在抗生物素抗体和带有荧光、酶或电子稠密试剂标签的第二抗体联合作用下, 免疫反应的信号予以探测; 或者用预制的抗生物素蛋白, 与经过生物素羧基酰化的辣根过氧化物酶或小肠碱性磷酸酶衍生物

结合形成的络合物, 对杂交部位进行亲合标记来加以鉴定。这类方法曾用于确定果蝇多丝染色体、哺乳类分裂中期染色体、组织培养中的细胞和石蜡包埋的福尔马林固定组织中特异基因的位置。生物素标记的杂交探针还曾用于监测细胞或组织中特异基因的表达, 以及探测结合于硝酸纤维素上的多核苷酸序列。

另外, 在电子显微镜下进行观察时可用带胶体金标记的过氧化氢酶或蛋白质处理杂交探针, 得到极高的空间分辨率。这些探测方法应使人们能够更准确的测定基因及其转录产物在染色体上的确切位置。用电镜法研究细胞或组织块连续超薄切片的杂交图象, 将为构筑特异 DNA 序列在单个细胞内组编方式的三维图象提供可能。虽然在当前不用同位素的探测方法有时还不如同位素标记放射自显影法灵敏, 但是可以预期这一领域必将不断出现显著进步。事实上, 用于探测生物素标记多核苷酸的新型蛋白质复合物已经足够灵敏, 可以在 Southern 或点渍杂交方式中察觉每个细胞内不足一个基因当量的 DNA 序列。

总之, 原位杂交技术经过近几年的技术改进, 已经大大提高了灵敏度、速度和适用性, 今后必将在基础研究和应用研究中发挥更大作用。

[TIBS 卷 7 · 第 12 期 1982 年—12 月刘 蓉摘]

(上接封 3)

这是因为它独立存在于细胞中能自我复制, 并将遗传性状传给后代; (3) 它不仅存在于原核生物细胞中, 而且在真核生物的酵母细胞、人体细胞(如人白细胞)、高等植物的玉米和高粱细胞中也有它的存在, 有人认为它与 Retrovirus (一种病毒) 没有明显差别; (4) 质体与噬菌体有些类似性, 如象非病毒染色体外遗传因子和缺损性原噬菌体 (prophage) 没有严格的差别, p1 噬菌体(溶源状态)或 λdv (λ 的衍生质体)就是例证, 但两者有区别, 一般说, 质体是非致死性复制子(至少对其寄主细胞), 无外壳蛋白包裹, 而噬菌体是潜在的致死性的复制子, 有外壳蛋白包裹着; (5) 有人认为, 任何染色体外的遗传结构都可称之为 plasmid, 包括 Plasmid 基因、附

加体、潜在性病毒和能复制的细胞器如叶绿体、线粒体。这样, plasmid 所包括的内容扩大了。能否这样认为, 也是值得研究的问题。

此外, 某些病毒如 EB 病毒也存在着 plasmid (Pagano. J. S. 1979), 此处用“质体”或“质环”译名可与病毒“质粒”相区别之; 最近发现高等植物细胞中存在 plasmid (Goodin P., 1982), 若用“质体”名称, 则与 plastid (质体, 形成粒) 有些混同, 故可用“质环”或“质粒”区别之, 但以用“质环”名称或许更妥当些。

总之, 上述事实和各种不同见解供有关科学工作者研讨时参考, 使 plasmid 的名称在科学的基础上能得到统一。

[本文于 1982 年 11 月 20 日收到]