

生物学动态遗传工程专集

生物学动态遗传工程专集



编辑说明

英明领袖华主席号召：“重视遗传工程的研究”（1978年2月26日，五届人大《政府工作报告》）。方毅副总理在全国科学大会上的报告中指出：“在分子生物学发展的基础上形成的遗传工程，有可能按人类的需要在分子水平上加工和转移遗传物质，创造生物的新物种。它为细胞分化、生长发育、肿瘤发生等有关高等生物的基础研究，提供了有效的实验手段，并可能为农业、工业和医药等某些生产领域的重大变革，开拓新的途径。”

目前全国广大生物学工作者正朝气蓬勃、斗志昂扬地向科学现代化进军。广大的科研、教学及生产技术人员积极开展遗传工程的研究。为了提供有关参考资料，特编辑出版本专集。收集近年来国际上遗传工程研究的重要论文、简讯和部分名词解释共64篇。主要内容包括：遗传工程研究的最新成就、原理、概念、技术和方法；基因的分离、载体、重组和转移；遗传工程在工、农、医上的应用等。可供科研、教学及生产部门有关人员参考。

遗传工程是个新兴的学科，方兴未艾，欣欣向荣。它必将在生产上发挥巨大的作用，为人类创造不可估量的财富。

由于我们编辑水平所限，有不妥之处欢迎指正！

编者

1978年7月

生物科学动态

中国科学技术情报研究所重庆分所 编辑
科学技术文献出版社重庆分社 出版
重庆市市中区胜利路91号

重庆书店重庆发行所 发行
重庆印制一厂 印刷

开本：787×1092毫米1/16 印张：14
字数：3.5万 印数：11500
1978年7月第1版 1978年7月第1次印刷

书号：13176·30 定价：1.40元

生物科学动态

遗传工程专集

1978年 增 刊

(总第81—82期)

目 录

略谈遗传工程的一些新成就	方宗熙 (1)
原位分子杂交	陆德裕 (5)
遗传工程	S. B. Primrose (15)
基因的操纵	S. N. Cohen (31)
一种DNA操纵基因-阻遏物系统	T. Maniatis等 (41)
基因操作的基本技术	高木 康敬 (52)
基因的生化操纵	K. Murray (62)
微生物通过基因转移而进化的机理	D. Reanney (69)
植物体细胞遗传操作	P. R. Day等 (74)
基因工程学和人体遗传疾病治疗问题	Г. А. Анненков (76)
遗传工程与作物改良	P. S. Carlson等 (82)
DNA技术在商业上初露头角	(87)
化学合成的生长激素释放抑制因子的基因在大肠杆菌体内表达	板仓 敬一 (89)
真核细胞DNA片段的无性繁殖作为研究染色体结构和功能的方法	C. A. Thomas, Jr (93)
DNA序列分析新方法	赵惠智等 (105)
决定DNA碱基顺序的新方法	大森 治夫 (110)
寡核糖核苷酸碱基顺序的测定方法	福家 基宏 (113)
重组体DNA: 今日研究的范例	J. Abelson (121)
体外建成λ溶原杂种经诱导后DNA连接酶产量提高500倍	S. M. Panasenko等 (125)
质粒(导言)	D. R. Helinski (128)
质粒DNA的复制	D. R. Helinski (130)
细菌质粒结构的进化: 移位遗传单元和DNA序列插入的作用	S. N. Cohen等 (136)
控制DNA <i>EcoRI</i> 限制与修饰的细菌质粒之限制性内切酶分析	M. Betlach等 (143)
细菌基因扩增	J. F. Collins (150)
哺乳动物中通过染色体参与的基因转移	J. L. Marx (158)
大肠杆菌-普通果蝇重组质体的细菌间转移	D. H. Hamer (162)
重组DNA研究	J. A. Miller (165)
到底有几种反密码子?	仲 如 (167)
“动摇”遗传密码假说	(170)

病毒怎样复制脱氧核糖核酸	J. Rogers (171)
脱氧核糖核酸如何卷曲在活细胞内	J. Roger (173)
病毒的信使结构: 一些惊人的新发展	J. L. Marx (175)
固氮小麦的发现	常胁恒一郎 (179)
从进化的观点展望遗传工程	R. Sinsheimer (185)
重组体 DNA	R. L. Sinsheimer (189)
遗传工程的应用	林泰禧 (207)

简 讯

- | | |
|--|-------------------------|
| 识读 DNA 的不同方式 (14); | 高血压基因的确定 (51); |
| DNA 重组体是怎样形成的 (61); | T 枝原体引起男性不育 (68); |
| 联接 DNA 分子的两种方法 (73); | 转位和转位子 (81); |
| 小麦种子信息 RNA 的存活时间 (81); | 启动和抑制细胞分裂的新方法 (88); |
| 锌和癌的关系 (104); | 细菌基因转移到酵母 (109); |
| DNA 序列分析的新技术 (120); | 核蛋白体的 RNA 功能是什么? (124); |
| 英国加强农作物遗传结构操纵技术的研究 (127); | |
| 第一种哺乳类 mRNA (兔 β 珠蛋白 mRNA) 的全序列已被测出 (135); | |
| 第二次报导——生命有机体的一个完整 DNA 序列 (200) | |

名 词 解 释

- | | |
|---------------|------------------------|
| 脱氧核糖核酸 (142); | 核糖核酸 (149); |
| 分子杂交 (157); | 遗传密码 (161); |
| 转录和翻译 (164); | 反密码子 (169); |
| 操纵子 (172); | 碱基顺序和配对; 质粒与致育因子 (206) |

会 议

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 基因和间隔区的研究 | (17) |
| 遗传工程国际讨论会 | (184) |
| 国外涉及有关质体和遗传工程方面专业会议简况 | 柯 为 (201) |
| 固氮作用: 遗传操作的展望 | J. L. Marx (202) |

略谈遗传工程的一些新成就

方宗熙

(山东海洋学院生物系)

遗传工程也叫做基因工程，就是采用类似工程技术的方法取出一定的遗传物质，在体外进行重组，然后介绍到生物体内，来定向地改造生物的遗传性，创造出新类型的生物，使生物更好地为人类服务。

由于遗传的功能单位是基因，又由于基因的分子基础（即遗传物质）主要是去氧核糖核酸(DNA)，因此遗传工程也叫做DNA重组。但是这不是一般有性过程中所看到的基因重组，而是亲缘关系有所不同（不同物种）的DNA重组。这种重组一般能改变较大的遗传性，而且改变了的遗传性是比较稳定的，所以它在实践上有深远的意义。

(一)

用于遗传工程中的主要工具首先是限制性内切酶和基因运载体。此外，还应用许多其他的酶和理化方法。

什么是限制性内切酶？

限制性内切酶是作用于核酸DNA的酶，是从多种微生物提取出来的许多具有专一性的催化剂。所谓专一性是指不同的内切酶能作用于核酸DNA中碱基顺序的不同部位上，把DNA在一定位置上切断，使DNA片断露出粘性的一端。

现在已知的内切酶有六十多种，常用的大约有二十种。

基因运载体是指能转运遗传物质(DNA)的特殊载体。目前所利用的载体主要是噬菌体（即细菌的病毒）和质粒。质粒是可以存在于细菌细胞质里的一种小颗粒。噬菌体和质粒的遗传物质都主要是DNA。它们都可以在细菌中进行复制。这两类基因运载体都能够比较容易地感染大肠杆菌，并且可以由一个大肠杆菌转移给或者说感染到其他大肠杆菌。

遗传工程主要包括两个步骤。第一个步骤是把运载体如质粒的DNA分子和其他要利用的生物DNA分子取出来，在体外用内切酶在DNA特定的碱基顺序部位上切开，露出DNA的切口，即“粘性的”一端。这粘性端可以跟原来分开的DNA再连接起来，也可以跟外源性（即其他生物）的DNA粘性端相连接。如果属于后者的情况，那就实现了DNA重组。比方说，用内切酶把从大肠杆菌取出来的质粒DNA切开，又用内切酶把动物如大鼠的染色体DNA切成若干碎段，其中如果有一个碎段恰好是胰岛素基因，那末这胰岛素基因如果跟切开的质粒连接起来，整合入质粒DNA内，这就实现了DNA重组。这样的组合由于带有人所需要的基因（胰岛素基因），就有利用价值了。

遗传工程的第二个步骤是把重组后的质粒移入（即感染）大肠杆菌，使它在细菌的细胞质内稳定下来，进行复制。而且这

复制作用可以比大肠杆菌染色体的复制快些。这样，大肠杆菌繁殖了，那特殊的质粒也繁殖了，而且繁殖的更多些。

如果条件适宜，那含有胰岛素基因的质粒不仅能自主地进行繁殖，而且还可能让胰岛素基因进行转录和翻译。如果出现这种过程，那末大肠杆菌就能产生出胰岛素了。

上述的基因工程的大意如图1所示。利

(二)

上面讲的是利用现成的基因进行遗传工程的事，下面谈一个用人工合成的基因进行遗传工程的事。

据外国报纸报道，美国科学家最近用人工合成的一个对个体发育很重要的基因进行遗传工程的工作，取得了成功。

在这里，人工合成出什么基因？

人工合成出能够产生一种人脑激素的基因，这基因在人脑基部的下丘脑发生作用，使下丘脑能够分泌一种激素，叫做 somatostatin。这是一个多肽，由14个氨基酸所组成。这种激素有调节脑垂体功能的作用。而大家知道，脑垂体又能分泌多种激素，以控制身体各种器官的发育。

当然，用人工方法即化学方法来合成基因，这不是第一次成功。第一次合成的基因是酵母菌丙氨酸转运

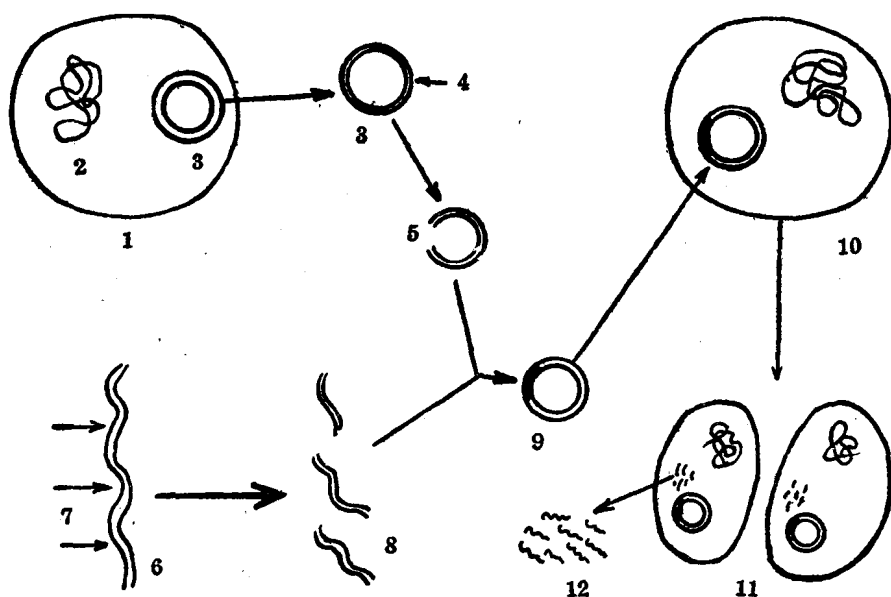


图1. 遗传工程示意图

这里包括两个主要步骤：一是用内切酶去切开基因运载体（如质粒）和切断所需要的染色体DNA；二是把重组的DNA移入细胞里，使新基因能在那里进行无性增殖和发生作用。

1. 大肠杆菌； 2. 大肠杆菌的染色体； 3. 质粒DNA，呈环状； 4. 某些内切酶作用的点； 5. 被切开的质粒DNA； 6. 染色体，可以是来自原核细胞的也可以是来自真核细胞的； 7. 某些内切酶作用的点； 8. 被内切酶切碎的几个染色体DNA片断； 9. 从（8）而来的DNA片断跟质粒整合在一起，这是体外的DNA重组； 10. 重组的DNA被移入另一大肠杆菌内； 11. 大肠杆菌的后代，在那里DNA重组的质粒得到增殖，并可能出现转录和翻译； 12. 大肠杆菌的新产物如胰岛素。

用与此相似的方法，1977年已成功地大家鼠的胰岛素基因移入大肠杆菌，使大肠杆菌产生出胰岛素了^①。在这里，每个大肠杆菌仿佛变成成为制造胰岛素的小工厂了。

应用相似的原理和方法，也可以使细菌产生出所需要的抗菌素或其他物质。

RNA基因。这是一个tRNA基因，专门用来转运丙氨酸的。这个基因是1970年 Khor-

^① 胰岛素基因的遗传工程实际上比这里说的复杂得多。这包括以下步骤：把这基因的mRNA提纯，然后利用分子杂交的方法，产生出相应的DNA，即胰岛素基因。有了这基因才有本文所说的遗传工程。参阅 New Scientist 74(1056)。

na 等人合成的。1977 年合成的这个在下丘脑发生作用的基因是一个结构基因。

不管要合成什么基因，必须首先知道那个基因的 DNA 碱基排列顺序，这一般是从分析其有关的蛋白质或 RNA 而知道的。

上述的下丘脑激素基因的合成的先决条件当然也是要预先知道那个基因的编码详情。

这个下丘脑激素基因是由几个科学家领导的几个小组联合制造出来的。这包括加利福尼亚州大学的 Berg 博士，希望市医学中心的 Riggs 博士和 Salk 研究所的 Vale 博士。他们利用这个人造基因制造出千分之五克的激素。

怎样制造出这种激素呢？

他们把那人造的那个基因移入细菌里。据说，这细菌能够“愉快”地工作，合成出人们预期得到的激素。

报道者没有说明那人造基因怎样移入细菌。推测起来，可能是利用内切酶处理过的质粒或噬菌体。这是说，让人造基因(DNA)跟质粒或噬菌体连接在一起，由质粒或噬菌体带入到细菌的细胞里去。

报道者也没有说明是利用什么细菌。推测起来，可能是大肠杆菌，因为这是遗传工程最常用的微生物^①。

所制造出来的只有千分之五克，这不算多。但是万事起头难，一个人造基因能够在活体内发生作用，这暗示着这方面的工作能够付之实践，有广阔的前景。将来一定有许多很有价值的但由于产量很少而成本贵的产品，可以利用遗传工程产生出来。胰岛素基因在细菌里产生出胰岛素就是一例。因此有理由可以预期，遗传工程在医学上、工业上和农业上将发挥巨大的作用。例如，把某些细菌或兰藻的固氮基因移入谷类作物里，使谷类作物能固氮，这可以大大节省氮肥。如果成功，可能引起另一次绿色革命。

顺便提起，Achally 博士和 Guillemin 博士由于成功地提纯了上述下丘脑激素而在

去年得到了诺贝尔奖金。他们提取出这种激素，为量甚微，并且很不容易。据说，Guillemin 差不多用了 50 万只绵羊的脑子，从中取出那下丘脑把它磨碎，才得到千分之五克的这种激素。

(三)

在这里要再谈的另一种遗传工程的新成就，是法国巴斯德研究所遗传工程研究室做出来的。这个研究室目前有 47 个人，其中有 25 个科研人员。从事遗传工程这项工作的有 Kourilsky 博士和 Perrin 博士等。我去年简略地参观了这个实验室。

他们是用鸡的染色体做材料。从鸡胚提出染色体，提纯后，用内切酶把染色体 DNA 分割成许多碎片。然后让这些 DNA 片断跟噬菌体结合，把这些 DNA 片断分别在大肠杆菌里进行无性繁殖。接着又让若干 DNA 片断在同一大肠杆菌中连接起来，由此进行选择培养，发现了前人未知的一种奇特现象。

发现了什么呢？

他们发现在一条染色体的某一区段中，把这一区段中的左右两个片断连接起来，可以成一个结构基因。情形大概如图 2 所示。

据分析，上述的染色体某一区段大概含有 2700 多个核苷酸。由这一区段两侧所连接起来的 DNA 分子大约含有 2000 个核苷酸，这个新连接在一起的 DNA 能够转录出一条 mRNA，这条 mRNA 又可以作为样板，由此产生出一种蛋白质——一种珠蛋白。这是一种抗体。经免疫实验，证明它有正常的功能。

这就是说，上述鸡染色体某一区段的两侧部分连接起来成为一个结构基因，而这一

^① 本稿写成后，本刊编者寄来原文，原文见 Science, 1977, 198(4321)。原文指出，在上述遗传工程中所用的载体是质粒 pBR322，所用的细菌是大肠杆菌。（译文见本集第 89 页）

区段的中央部分约含有 746 个核苷酸，它并不进行转录。它具有什么功能呢？目前尚无明确答案。研究者认为它最可能的功能是调节作用。这个发现的详情据说不久就要发表。

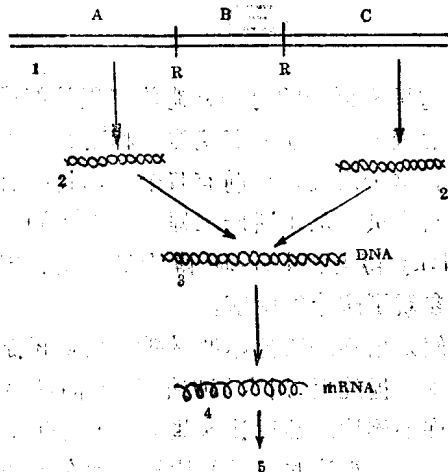


图 2. 遗传工程的另一例

说明结构基因的分子基础(遗传密码)不一定都连续排列在一起。

1. 鸡的一段染色体 DNA，在那里 A、B 和 C 是表示这段 DNA 的三个部分，R 是某些内切酶作用的位置，DNA 分子会在那里被分开；2. 由 A 和 B 分割下来的 DNA；3. 两个(2)段 DNA 彼此连接在一起；4. 转录出 mRNA；5. mRNA 的产物，这里是一种珠蛋白。

上述遗传工程的成就至少有几点富有生物学意义。第一，对结构基因起调节作用的 DNA 片断(区段)，在大肠杆菌和某些其他微生物中早已调查证实。例如，大肠杆菌的操纵子在 1961 年就研究清楚，证明那里有起调节作用的基因或 DNA 片断。但是在真核生物里，特别在高等动植物里，起调节作用的基因或 DNA 片断尚未充分论证过。按理是应该有这种起调节作用的遗传成分的。上述鸡染色体上某区段的某部分，可能是起调节作用的 DNA 片断。如果是这样，在高等动植物中也存在着调节基因的论点就落实

了。

第二，如果上述论点是成立的，那末起调节作用的 DNA 片断不一定要在结构基因的外边，也可以存在于结构基因内部。

第三，作为一个基因的分子基础，其三联体(遗传密码)不一定都必须连续排列在一起。如果这样，这对基因的概念就有所发展了。

据说，在美国和西欧其他国家里也在从事同样的遗传工程的工作。巴斯德研究所首先在这方面取得了成绩，是由于法国在管理遗传工程方面，不象其他国家那末严格死板。如果这是研究取得成果的原因之一，那是值得我们参考的。

(四)

遗传工程(基因工程)是七十年代前后新发展起来的学科，是人工塑造新生物类型的最有力的手段。它不仅具有巨大的理论意义，也具有广泛的应用价值。它正在生机勃勃地向前发展着，可能在不远的将来在工农业方面引起技术革命。

但是，事物都是一分为二的。基因工程也不能例外。比方说，遗传工程的管理如果不善，使用不当，可能把致癌基因引入人体，造成严重后果。

也可能利用遗传工程产生毒性很剧烈的微生物，为社会帝国主义和帝国主义的细菌战服务。

这些问题是怎样发生的呢？怎么办呢？

关键在于人，在于社会制度。只要帝国主义、霸权主义继续存在，上述的危险性就会继续存在。因此，我们应该大力开展遗传工程的研究。一来这项工作可以提高科学水平，二来可以使遗传工程为人民造福，三来可以对潜在的危险有充分估计，做到有备无患。

原位分子杂交

陆德裕

(中国科学院动物研究所)

自从核酸分子杂交的技术建立以来,人们对认识原核细胞和真核细胞基因组的分子组成,核酸分子的互补性,以及核酸的代谢和进化等方面就有了一种很有利的研究手段。分子杂交技术的原理就是根据单链的DNA或RNA,能与另一根单链DNA上和它互补的碱基序列配对的特点,在一定的条件下,使它们的互补碱基之间形成氢键,从而把两根单链联结起来成为一种DNA·DNA或DNA·RNA的双链杂交分子。

一般来说,除了某些RNA病毒而外,DNA是决定生物遗传的主要物质,它的构成单位是核苷酸。每一种核苷酸由三部份组成,即一个碱基,一个脱氧核糖和一个磷酸基团。碱基又有四种,即腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶,分别以A、G、T、C表示。许多核苷酸通过磷酸二酯键联结在一起,就形成了多核苷酸的长链。DNA分子就是由两条盘绕成螺旋状的多核苷酸长链所构成。其中一条链上的一个碱基总是与另一条链上的一个碱基相配对,但是这种配对并不是随机的,而是有明显的专一性,即A总是与T相配,G总是与C相配。例如一条DNA链上的碱基序列为-A-G-C-G-...那么与它互补的一条链上的碱基序列一定是-T-C-G-C-...,二条链中碱基之间配对的这种专一性,称为碱基的互补性,这两条链便叫做互补链。在生物体内,当DNA进行复制时,总是以其中的一条链为模板,合成另一条与它互补的DNA链。当由DNA转录成RNA链时,

这条RNA链中的碱基成份也是与DNA链成互补的状态,所不同的是其中有一种碱基——胸腺嘧啶,被尿嘧啶(一般以U表示)所代替,所以这种RNA链上的U总是与DNA链上的A互补,G总是与C互补,因此分子杂交技术就能用来鉴别DNA链之间或DNA链和RNA链之间是否存在这种互补性。

在研究分子杂交的最初阶段,是将解链(又叫变性)后所得的单链DNA和RNA链,置于一定盐浓度的中性水溶液中混和,这叫做液相分子杂交。在这种液相系统中,核酸分子自由碰撞可能产生两种反应:一种是RNA链与单链DNA相结合,另一种是单链DNA本身之间相结合,由于后一种结合相应减少前一种结合的机率,因此,也就会给分子杂交的定量测定带来一定的误差。所以后来人们就考虑把解链后的单链DNA固定在某种固相的支持物上,使它们本身不致于彼此重新联合成双链。最初Bautz和Hall(1962)将糖苷化的DNA附着在硝化纤维柱上,后来Bolton和Mecarthy(1962,1963),将单链DNA附着在琼脂柱中,Britten(1963),也曾用紫外线照射,使单链DNA固定在合成的多聚物上,再将这种多聚物装柱供分子杂交使用。同时,Nygaard和Hall(1963)最先发现硝化纤维微孔滤膜能有效地吸附单链DNA,而不吸附RNA。后来,Gillespie和Spiegelman(1965)便根据这个道理,将单链DNA固定在这种微孔滤膜上,然后加上RNA溶液,使它们进行杂交

反应,这叫做微孔滤膜分子杂交,也就是固相和液相之间的分子杂交。

以后, French和Kitzmler (1967), 首先根据微孔滤膜分子杂交的原理,又设计了用同位素标记的RNA或DNA,与细胞学制片上的染色体DNA进行杂交,以便追踪某些特异性DNA分子或相当于基因的DNA序列,在细胞内的定位问题,可惜由于他们所得的结果不一致,故未详细发表。后来, Gall和Pardue (1969), K. W. Jone (1969),以及Buongiorno-Nardelli(1970),又分别进行了这方面的研究,他们的方法是将完整的细胞核或染色体,做成细胞学片子,使其中的DNA固定在玻片上,并保持它们原来的细胞学位置,然后再使这种DNA解链,并与用同位素标记的和它互补的RNA或单链DNA溶液,进行杂交反应,最后用放射自显影法和显微镜观察,可以直接检测出细胞中染色体上杂交分子所占的位置,这就叫原位分子杂交。

现在,原位分子杂交,已被应用于研究高等生物中的基因定位,单个细胞水平中的基因扩增,某些特定核酸序列的信息在染色体上的分布,以及某些病毒病因的探讨等。随着这一方法在应用上的扩大,技术上也不断有所改进,本文拟就原位分子杂交的有关方法以及近来研究的概况作一简扼的介绍。

方 法

前面已经提到原位分子杂交的原理和微孔滤膜分子杂交的原理相似。这是一种把普通细胞学技术、核酸分子杂交技术,和显微放射自显影结合起来的特殊技术。下面将按操作程序先作一般的介绍:

(一) 细胞学制片: 根据所用的材料和实验要求,可采用不同的细胞学制片方法,如压片、涂片、细胞悬液滴片(即空气干燥法),或组织切片等不同的方法。若要制备染色体的标本,一般采用前三种方法较简便。

但应注意几点,首先材料要新鲜,以保证细胞结构尽可能接近生活状态,第二,组织块要尽可能小(最好切成5mm长的小薄片),以保证固定液可迅速均匀地渗入组织内,第三,要采用适当的固定液,制备染色体标本,一般用3:1的甲醇(或纯酒精)冰醋酸固定液,临用前配制。凡含有戊二醛、汞、铅等的固定液不宜用,因为它们会干扰DNA的解链,或降低乳胶的敏感性。固定时间一般为5—10分钟,然后在已涂好硅胶油的干盖片上滴一滴45%冰醋酸,从固定液中将组织块取出,放入盖片上的冰醋酸中,用细针或尖镊子将组织充分捣碎,并将此盖片翻过来盖在载片上,进行压片,压好的片子放在干冰的表面上几分钟,使片子完全冰冻,使用刀片将盖片取下,细胞基本上都粘附于载片上。迅速置载片于95%酒精中至少5分钟,然后取出载片置空气中干燥备用,这种干燥的片子可放在干燥器内保存几个月之久。

若所取的材料为培养细胞,则可先用低速离心法收集细胞,然后将细胞悬浮于低渗溶液内,置室温下处理10多分钟,再经低速离心,倾去上清液,在沉淀的细胞中加入等体积50%的冰醋酸,不作搅动,再把它置冰浴中固定20分钟左右,倾去冰醋酸,然后小心地加入1—2滴50%冰醋酸,轻轻摇动使细胞悬浮,将此细胞悬液滴一滴于硅化盖片上,进行压片。也可将细胞悬液,滴在予先冷却的载片上,使细胞自动铺展,再将载片置空气中干燥备用。

(二) DNA的解链(变性)处理:

(1) 除去内源RNA: 内源RNA是指细胞本身所含的RNA,如不去掉,会与标记的外源RNA竞争染色体上可供杂交的位点,影响杂交的效率。所以在使DNA解链前,必须先用核糖核酸酶(RNase)处理片子,一般将已配好的胰脏RNase母液溶于 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液中,配成 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,

每张载片上约滴 200 μ l, 盖以 22 $\times$ 40mm 的盖片, 放入湿室内, 置 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 或室温下二小时。

将经 RNase 处理后的片子, 置于盛有 2 $\times$ SSC 溶液的染色缸内, 使盖片与载片自动脱开, 然后用 2 $\times$ SSC 缓冲液将载片洗数次, 以充分去掉 RNase, 再经 70%, 95% 酒精各一次, 置空气中干燥备用。

(2) DNA 的解链: DNA 的解链是杂交反应成功与否的先决条件, 凡能在离体情况下使纯化的 DNA 解链的各种因子, 如酸、碱、热等, 也都能使染色体上的 DNA 发生解链, 但各有利弊, 如酸处理后, 虽能使染色体形态保持良好, 但有人认为强酸会使核酸发生降解作用, 会降低杂交效率。一般认为碱处理较好, 它不仅能使 DNA 解链, 而且可以去掉内源 RNA, 缺点是 NaOH 处理后, 会使染色体发生膨胀, 使染色体的细胞学图象失真。不过 NaOH 所引起的膨胀, 在以后通过 2 $\times$ SSC 缓冲液时有可能得到恢复, 所以一般多采用碱处理, 浓度为 0.07N 的 NaOH, 在室温下处理 2—3 分钟。然后经 70%, 95% 酒精各处理 10 分钟, 取出片子, 置空气中干燥备用。

加热也可以使 DNA 解链, 一般是将片子放入低离子浓度 (0.1 $\times$ SSC) 的溶液内煮沸 2—3 分钟。过去曾有人认为这样的处理, 不一定能使 DNA 完全解链。因为核蛋白的复合物对热较稳定, 但是现有的实验结果证明, 热处理后的杂交率和特异性, 与碱处理者并无根本的区别, 而且在热处理时, 如加入甲酰胺, 还可以在一定的盐浓度条件下, 降低 DNA 的熔点 (指解链的温度)。

(三) 制备放射性核酸:

(1) 活体法标记核酸: 将细胞培养在含有氚标记的核酸前身物溶液中, 若条件适宜, 可得比活性相当高的核酸组分。J. G. Gall 和 M. L. Pardue (1971), 曾把非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的肾脏细胞, 置

于含有 1mCi 3 H-尿嘧啶 (10—20Ci/mMole) 的 20ml 培养液内, 培养 3—5 天后, 收集细胞, 提取 DNA, 用蔗糖梯度离心法纯化 RNA, 所得转移核糖核酸 (tRNA), 核糖体核糖核酸 (rRNA), 其比活性为 1—5 $\times$ 10⁵cpm/ μ g。若在 20ml 的培养液内, 加入 100 μ ci 的 3 H-胸腺嘧啶, 培养 3—5 天后, 收集细胞, 提取 DNA, 可得比活性为 1—2 $\times$ 10⁵cpm/ μ g 的 DNA 组分。

(2) 离体法标记核酸: 若要得到高比活性的核酸, 最好是用离体法合成, 即以解链的天然 DNA 为模板, 通过大肠杆菌 (*E. coli*) DNA 聚合酶的作用, 将带有同位素标记的核糖核苷酸合成与该 DNA 互补的带有放射性的 RNA (c-RNA)。若以 mRNA 为模板, 则可用病毒的逆转录酶 (如鸟类白血病毒 AMV 逆转录酶) 合成与 mRNA 互补的带有放射性的 DNA (c-DNA)。离体所合成的标记核酸, 其比活性取决于参予反应的核苷酸前体的比活性, 这可根据需要来选择。

(3) 化学法标记核酸: 当用活体法和离体法都还不能获得所需要的高放射活性的核酸时, 还可以利用化学的方法, 加入放射性原子来标记核酸, Prenskey, W. 等 (1973) 曾用非载体 125 I 标记果蝇的 5S RNA, 其比活性可达 10⁸dpm/ μ g, 用这种核酸作原位分子杂交, 片子曝光二天后, 就可用放射自显影的方法, 检查出杂交分子的位置, 而同样的材料, 若用 3 H-RNA 杂交, 则需曝光两个月, 方能在片子上显出杂交分子的银颗粒。

除了上述几种常用的核酸标记法外, 最近 H. C. Macgregor 等 (1976), 利用 DNA 缺口翻译 (Nick-translated) 法, 能得放射性活性很高的 3 H-rDNA。还有利用标记的特异氨基酸或酶促修复法来标记 tRNA, 用以研究特定 tRNA 产生的位点。

(四) 杂交反应: 原位分子杂交中所用的反应条件, 如离子强度、温度、保温时间

等,基本上和相应的滤膜分子杂交相似。一般将同位素标记的核酸溶于 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液中,如用 $18 \times 18 \text{mm}$ 或 $22 \times 22 \text{mm}$ 的盖片时,可在载片上加 $5-10 \mu\text{l}$ 的同位素标记核酸溶液,若用 $9 \times 9 \text{mm}$ 的盖片时,则加量可相应减少。加入同位素标记的核酸溶液后,盖上盖片,放入湿室,为了防止蒸发,可将湿室四周封闭。杂交反应所需时间因对象而不同,可以从 $1-18$ 小时不等。John(1969)指出,在用 rRNA 作杂交反应时,只需保温几分钟。杂交反应的时间与杂交分子的有效核苷酸浓度(指所含互补序列的核苷酸量)有关,例如在相同的浓度下,一个复杂的序列,其有效核苷酸浓度要比一个简单序列低。在一个 DNA 组分中,它的重复序列高,它的杂交速度就快。所以可以通过杂交的速度来测定 DNA 序列的重复性。至于标记核酸的浓度,有人主张用较高的浓度,John 等(1969)用 ^3H -RNA 作杂交反应时,浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$, Gall 和 Pardue(1971),倾向于用较低的浓度,一般用 $2-3 \mu\text{g/ml}$,假若是用 *E. coli* 聚合酶所获得的高放射活性 RNA,则浓度可低至 $0.01 \mu\text{g/ml}$,他们认为浓度过高有两个缺点,第一浪费同位素和核酸,第二会增加非特异性结合的本底。

杂交反应的温度,一般为 $65-67^\circ\text{C}$,若反应物内加有甲酰胺,温度可降至 37°C 。

若为 DNA·DNA 杂交反应,则于反应终止后,置片子于 60°C $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液内,将盖片和过量 DNA 洗脱。若为 RNA·DNA 杂交,则应在片子上加核糖核酸酶处理,浓度一般为 $20 \mu\text{g/ml}$,置片子于 37°C 1 小时,以去掉未结合的剩余 RNA,然后用 $2 \times \text{SSC}$ 溶液冲洗,上述两种情况的片子,都经 70% , 95% 酒精洗,再置空气中干燥备用。

(五) 放射自显影:操作与一般放射自显影技术相同,可用乳胶薄膜或液状乳胶涂片。曝光时间因材料不同,可从几天至数月不等。如标记核酸比活性高,而在基因组中

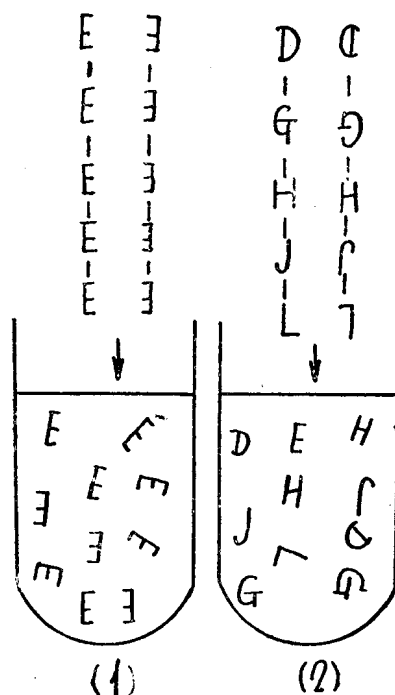


图 1 示有效核苷酸浓度及序列的重复性与再联合速度的关系。

- (1) 示简单的重复 DNA 序列, 每个序列有 50% 的结合机率。
- (2) 示比较复杂的 DNA 序列, 每个序列有 10% 的结合机率。

又是高度重复核苷酸序列者,则曝光时间可短,反之则应加长。片子经显影、定影后干燥,再用 Giemsa 或醋酸地衣红 (acetoorcein) 染液染色。要恰当使用封片剂,否则会使片子退色,或使银颗粒溶解。也可不要封片,直接用浸润油 (immersion oil) 观察片子,然后用石油醚去浸润油。

(六) 实验用具和试剂:

(1) 硅化玻片:将洗净的干盖片,浸入 1% 硅酸油 (silicon) 溶液中,取出后用蒸馏水冲洗,垂直方向置室温下干燥备用。

(2) 湿室:取直径 12cm 大小的培养皿,在底盘铺一张滤纸,加入 $2 \times \text{SSC}$ 溶液使滤纸浸湿,然后将玻片放在两个橡皮垫上(可用青霉素瓶的盖代替),再将培养皿盖好即成(图 2)。

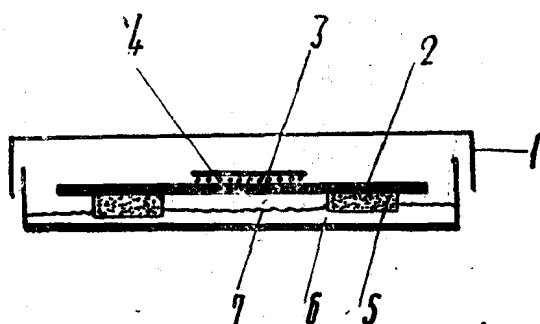


图2 湿室结构

1. 培养皿
2. 载片
3. 盖片
4. 标记RNA或DNA溶液
5. 橡皮垫
6. 滤纸
7. 杂交用缓冲液

(3) SSC缓冲液: 配制溶液含氯化钠0.15M, 柠檬酸钠15mM, 用盐酸调pH至7.0, 一般可配成10倍的母液, 临用前适当稀释。

(4) RNase母液的制备: 将胰脏RNase溶于pH 5.0的20mM醋酸钠中, (酶含量相当于1 mg/ml), 置沸水浴中煮沸5分钟, 以除去污染的DNase活力, 冷却后贮存于-20℃备用。

(5) Giemsa染料: 取0.5克Giemsa染料, 溶于33毫升甘油中, 置60℃二小时, 再加33毫升甲醇, 充分摇匀, 即成母液, 临用前用10mM, pH 7.0磷酸缓冲液稀释成1:10—1:20的浓度染片。

(6) aceto-orcein (醋酸地衣红): 称0.2克地衣红, 溶于10ml 50%冰醋酸中, 可在试管中溶解。将试管用木塞轻轻塞好, 置水浴中煮沸30分钟, 冷却后过滤, 即成染液。

现将我们实验室所作的鱼类细胞原位分子杂交的方法介绍如下:

(一) 放射性核酸的制备: (1) c-DNA的合成: 从鱼类卵巢成熟卵细胞质中提取mRNA, 以此mRNA为模板。用鸟类白血病病毒(AMV)逆转录酶合成与mRNA

互补的带有放射性的c-DNA。以总体积为100μl的反应系统为例, 内含:

- | | |
|------------------------|-------|
| 1). ^3H -dTTP | 1 μci |
| 2). Tris-HCl (pH 8.5) | 50mM |
| 3). DTT | 6mM |
| 4). KCl | 50mM |
| 5). Mg^{++} | 6mM |
| 6). dATP | |
| dCTP | 各80mM |
| dGTP | |
| 7). AMV酶 | 10单位 |
| 8). 鱼卵巢成熟卵细胞质mRNA(模板) | 5 μg |

合成大量c-DNA时, 可按比例增加各反应物。上述溶液在37℃水浴中保温45—60分钟, 然后在冰水中冷却, 中止反应。加入SDS, 使成1%溶液, 再加NaCl, 使成0.4M, 然后加入等体积酚-氯仿-辛醇(酚-氯仿-辛醇混合液的配法: (A)重蒸的酚用PH 7.5的Tris-HCl缓冲液饱和。(B)另以24:1的比例(W/V)配制氯仿-辛醇混合液。以等体积的(A)液和(B)液混合即成, 临用前配制)。在室温下充分振荡5—10分钟, 用3000g离心10分钟, 溶液即分三层(上层为核酸水溶液, 中层为蛋白质呈乳白色, 下层为有机溶液), 取上层水溶液, 再重复提取1—2次, 然后用氯仿-辛醇混合洗1—2次, 除去残留的酚, 将所得水溶液加在葡聚糖凝胶(Sephadex G50)柱上(柱大小为1×65cm), 此柱已予先用10mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1% SDS, 1mM EDTA和150mM NaCl平衡好, 以每分钟1ml的流速洗脱, 按收集管的顺序, 在每收集管内吸50μl, 用液体闪烁计数器测放射性, 有放射活性的组分中, 即含有产物c-DNA, 但没有未参与反应的标记核苷酸。将这些组分合并, 加NaCl至0.4M, 加二倍体积冷乙醇过夜(-20℃), 再用25000g离心30分钟, 真空干燥沉淀部份, 再溶于10mM Tris-HCl (PH 7.8), 1mM EDTA和150mM NaCl内, 加入等量0.6N

的NaOH使成0.3N的NaOH溶液,在37℃水浴中保温16—24小时,使产物中残存的RNA全部水解,仅留下单链的c-DNA。在此液内再加入Tris使成50mM溶液,然后用0.3N的HCl将溶液调至中性备用。

(2) c-RNA的合成:以解链的鱼类辜丸DNA为模板,用*E. coli* RNA聚合酶合成与DNA互补的带有放射性的c-RNA。以总体积为100μl为例,内含:

- | | |
|--|--------|
| 1) ³ H-UTP | 1 μci |
| 2) ATP, CTP, GTP, 各 | 0.4mM |
| 3) KCl | 150mM |
| 4) MgCl ₂ · 6H ₂ O | 50mM |
| 5) DTT | 0.4mM |
| 6) <i>E. coli</i> RNA聚合酶 | 10μg |
| 7) 解链鱼辜丸DNA(模板) | 1—2 μg |
| 8) Tris-HCl (pH 7.9) | 50mM |

合成大量c-RNA,可按比例增加各反应物。将上述混合物在37℃水浴中保温60—90分钟,再加入2μg无RNase的DNase,继续保温5—10分钟,使混合物内的DNA降解。保温毕,置冰浴中中止反应。与上述提取c-DNA产物一样,在此反应混合物内加入SDS和NaCl,并用酚-氯仿-辛醇提取,所得水溶液加在Sephadex G100柱上进行层析分离,使合成的c-RNA与未参与合成的标记核苷酸等分开。柱体积为1.0×30cm,予先用含10mM MgCl₂, 10mM EDTA,和0.02%叠氮钠的10mM Tris-HCl(pH 7.9)缓冲液平衡,加柱后又用此缓冲液洗脱。以每小时15ml的收集洗脱液,每ml收集一管,并逐管用260mμ测吸收值,将含有RNA的组分合并,加载体酵母RNA(200—400μg/ml),再加1/10体积20%的醋酸钾调pH至5.4,再加二倍体积的冷乙醇,使RNA在-20℃下至少沉淀18小时,然后以2000转/分离心20分钟,收集沉淀,贮-20℃下备用。

(二) 细胞学制片:采用两种方法制备染色体标本,一种是涂片法,将体长16-20mm的幼鱼,置0.02%秋水仙素溶液中室温下游

动4—6小时,并同时充氧,以保证幼鱼保持活跃状态,取下第四对腮弓或尾鳍的第一部份,置蒸馏水低渗处理30分钟,用3:1甲醇冰醋酸液固定,并换一次固定液,两次共15—20分钟,用镊子将固定的组织夹出,置于洗净的载片上轻轻推动,使细胞均匀地粘附于载片上,要尽量涂得薄而均匀,如有未分散的细胞团应去掉,置载片于空气中干燥,应防止灰尘污染,最好置于载片合内干燥。

另一种方法是取成鱼的全血培养,用1ml注射器, 5 $\frac{1}{2}$ 号针头,自鱼尾动脉取血,培养液为199(含20%小牛血清,青霉素100μg/ml,链霉素200单位/ml)。每5ml 199培养液内加肝素0.033ml(500单位/ml),植物血凝素(PHA)粗提液0.075ml,用碳酸氢钠调pH至7.8。

上述每5ml培养液分装4个链霉素瓶,每瓶内滴全血1—2滴,置37℃培养68小时,加入秋水仙素1滴(浓度为3.125μg/ml),继续培养4小时后,收集细胞。收集细胞时,在培养液内加入蒸馏水,培养液与蒸馏水之比为1:7,进行低渗处理20分钟,用800转/分离心5分钟,除去上清液,沉淀物加3:1甲醇冰醋酸液固定,换一次固定液,两次共固定1小时,再用800转/分离心10分钟,倾去上清液,最后加少量新固定液,制成细胞悬液,将此细胞悬液滴在已予冷的载片上并使其铺开,置空气中干燥。

(三) 去内源RNA和蛋白质:

(1) 置载片于0.2N HCl中,室温下30分钟,以除去内源RNA和碱性蛋白。

(2) 置载片于蒸馏水中洗几次,在空气中干燥。

(3) 滴0.2ml RNase于载片上,盖上22×40mm盖片(RNase浓度为100μg/ml)。

(4) 置载片于湿室内,放入37℃温箱中保温1小时。

(5) 用 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液洗却载片, 使盖片自行脱下, 并用 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液洗几次, 完全去掉 RNase。

(6) 置 70% 酒精中 5 分钟。

(7) 置 95% 酒精中 5 分钟。

(8) 在空气中干燥。

(四) DNA 解链:

(9) 置载片于 0.07N NaOH 中, 室温下处理 2 分钟。

(10) 置 70% 酒精中 10 分钟, 换 1—2 次以去掉碱。

(11) 用 95% 酒精洗 2—3 次。

(12) 空气中干燥。

(五) 分子杂交反应:

(13) 在已制备的细胞片子上, 滴 $50\mu\text{l}$ ^3H -RNA, 盖上盖片 ($22 \times 40\text{mm}$ 盖片)。

(14) 把载片放入湿室中, 置 65°C 下保温 18 小时。

(15) 置载片于 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液中洗脱盖片, 并用 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液洗 2—3 次, 以去掉未结合的 ^3H -RNA。

(16) 滴 RNase 于载片上, 置 37°C 温箱中保温 1 小时。

(17) 用 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液冲洗数次 (室温)。

(18) 置 70% 酒精中 5 分钟。

(19) 置 95% 酒精中 5 分钟。

(20) 在空气中干燥。

(六) 放射自显影:

配制 L4 乳胶液 (Ilford L-4 英国) (1 份乳胶 + 1 份蒸馏水), 将上述已干燥的载片垂直放入此稀释的乳胶液中浸渍后取出, 仍以垂直方向在暗室内干燥 (室温), 再放入暗盒置 4°C 下曝光, 曝光完毕的片子, 经显影和定影后, 用 Giemsa 染色, 即可在显微镜下观察。

结 果

一、用天然核酸进行原位分子杂交:

假若是进行 DNA·DNA 的杂交, 可用碱性氯化铯梯度离心法, 将双链 DNA 分成单链, 然后用这种单链 DNA 与染色体上已解链的 DNA 杂交。在这方面比较成功的是对真核细胞基因组中具有高度重复序列的 DNA 分离, 这种 DNA 称为随体 DNA (satellite DNA)。在小白鼠细胞中, 这种重复序列的 DNA 占基因组中总 DNA 的 1%, 通过细胞培养, 可以分离获得 ^3H 标记的这类 DNA, 再用梯度离心法将它们分成单链, 用它们进行原位杂交, 结果证明它们位于 19 个具中央着丝点的常染色体的着丝点处, 和 X-染色体上, 而 Y-染色体上则完全没有。当然, 其他动物的随体 DNA 也可以用这种方法分成单链供原位杂交用, 不过一般都愿采用离体合成的方法, 获得放射活性较高的 c-RNA 或 c-DNA 供原位分子杂交使用。

关于 RNA·DNA 的杂交, 至今大约已对五种天然 RNA, 用原位分子杂交法对它们进行了染色体上的定位研究, 它们是 rRNA、5S RNA、tRNA、组蛋白 mRNA, 以及某些摇蚊 (*Chironomus tentans*) 的唾液腺多线染色体上 Balbiani 环上的 RNA。

rRNA 是比较易于纯化而又能获得高放射活性的一种 RNA, 而且在两栖类卵母细胞的生长过程中, 它要进行大量的扩增, 所以很有利于原位杂交的研究, 用这种 rRNA 做

附注:

dTTP 脱氧胸腺嘧啶三磷酸核苷
dCTP 脱氧胞嘧啶三磷酸核苷
dATP 脱氧腺嘌呤三磷酸核苷
dGTP 脱氧鸟嘌呤三磷酸核苷
DTT 二巯基赤藓醇

POPOP 1,4-二[2-(5-苯基噁唑基)]苯

EDTA 乙二胺四乙酸

Sephadex G50 葡聚糖凝胶

原位杂交所得的结果,完全证实了过去实验所得的结果,例如滤膜分子杂交的实验证明果蝇的rDNA是在染色体的核仁组织区中,而原位杂交法也证明果蝇的rRNA能专一地与巨大染色体的核仁相结合,这说明核仁中有rDNA。在*Sciara*的多线染色体中,rDNA也是位于X-染色体末端的核仁组织区中。两栖类卵母细胞中,标记的rRNA也只与核仁和核帽相结合,证明这两处有rDNA的存在。

5S rRNA它在染色体上合成的位置,与核仁组织区中所合成的rRNA并无直接的关联,利用5SrRNA进行的原位分子杂交,证明果蝇的5S DNA位于第Ⅱ对染色体右臂56EF区域。非洲爪蟾的5S DNA几乎是在所有染色体的端粒上。

在真核细胞基因组中,tRNA基因也是一种具有重复序列的基因,不过它比rRNA基因的重复性要低得多,而且它是散布在许多位点上,至少在果蝇已得到证明,Wimber (1971),曾用tRNA与果蝇巨大染色体作原位分子杂交,并对tRNA基因位点作统计学的分析,他分析了X染色体和第Ⅱ对染色体的右臂及左臂末端,证明有一系列的不同tRNA基因位点,通过计标,他提出在整个基因组中,有130—140条区带能编码tRNA,其中约含有750个基因,也就是说每一条区带平均包括一个以上的基因。

组蛋白mRNA也是由重复序列的DNA所产生,产生组蛋白mRNA的基因的核苷酸序列在进化上比较稳定,从海胆卵胚胎中提取的组蛋白mRNA,可与其它真核细胞中的DNA杂交,如果蝇的多线染色体,它与海胆组蛋白mRNA互补的DNA序列,位于第Ⅱ对染色体的着丝点附近,即39E区域。

此外,Lambert等(1972),曾用显微解剖的方法,对摇蚊(*Chironomus tentans*)的唾液腺细胞核中第Ⅱ对染色体Balbiani环2上的DNA,第Ⅰ对染色体上的RNA,核液中高分子量和低分子量的RNA,以及核仁RNA,分别分离出来,与唾液腺的多线染

色体DNA进行原位分子杂交,结果证明低分子量的RNA,以及第Ⅰ对染色体上的RNA与所有四对染色体结合,并无特定区带之选择,而高分子量的RNA以及Balbiani环2上的RNA,只与Balbiani环2结合,这说明Balbiani环是合成高分子量RNA的地点,核仁RNA只与第Ⅰ,Ⅱ对染色体上的核仁结合,它主要是rRNA。

(二) 离体合成核酸的原位分子杂交:如随体DNA (Satellite DNA)、rDNA、5S DNA等,都可用前面所介绍的离体合成的方法合成和它们互补的RNA,用于原位分子杂交。例如将小白鼠的随体DNA的离体转录物,与小白鼠分裂中期的染色体进行杂交,结果与前面提到的天然单链DNA杂交的结果很吻合,即证明除了Y染色体外,其余19个染色体的着丝点以及X染色体均能与这种c-RNA强烈的结合。若将这种c-RNA与间期细胞核杂交,其结合位置也是在异染色质上。而且在很多生物,如果蝇、两栖类和人的细胞中,都证明随体DNA与染色体着丝点处的异染色质有关。人的细胞中有四种随体DNA,现已证明第1种集中于第1、9、16对染色体的着丝点处,而第3种集中在第9对染色体的着丝点处,其它几个染色体含量极少。

McDougall等(1972),曾用标记的病毒c-RNA追踪病毒在转化细胞中的位置。

以上介绍的主要是基因组中重复序列DNA的定位工作,而现在越来越多的兴趣是探索用原位分子杂交法对基因组中非重复序列DNA的定位,Price, P.M.等(1972)曾提取兔的网织红细胞血红蛋白mRNA,用它与人的细胞分裂中期染色DNA作原位分子杂交,借以研究人染色体上血红蛋白的基因位点。该作者(1975),又用兔的血红蛋白mRNA为模板,离体合成与之互补的c-DNA,原位分子杂交。Kuo, M.T.(1977),从金黄地鼠细胞质中提取poly-A RNA,以它为模板用鸟类白血病病毒逆转录酶合成

c-DNA; 作原位分子杂交以研究特定序列的信息在染色体上的分布。目前有关这方面的报导还只是开始, 但随着对各种特异 mRNA 的分离和提纯技术的进步, 将有可能利用原位分子杂交法来确定那些编码各种特异蛋白质的信息核酸在染色体的位置。

结 束 语

原位分子杂交是一项把经典细胞学和某些生物化学方法结合起来的技术, 它是研究真核细胞基因图谱的一种很好的手段。几年来, 它已为染色体的细胞学方面提供了一些有益的资料, 如某些重复 DNA 序列在染色体上的定位, 单个细胞水平的基因扩增, 以及某些特定序列的信息在染色体上的分布。最近 E. Manning (1975) 还利用原位分子杂交和扫描电镜相结合的方法, 研究果蝇 rRNA 基因在染色体上的位置。M. L. Pardue 等 (1975) 将荧光分带染色法和原位分子杂交结合起来研究入染色体上特定核苷酸序列的定位。

由于这一技术发展的历史并不太长, 其中尚有一些有待解决的问题, 如怎样才能既保持 DNA 的完整性, 而又能把染色体上的蛋白质完全去掉; 怎样才能完全避免染色体上已解链的 DNA 的复原; 以及提高非重复性基因的检测效率等。随着这些问题的解决, 将有可能使这一技术从定性的水平进而做到定量的水平, 特别是做到对非重复性基因的定位和定量, 将会有助于对个体发育, 细胞分化, 肿瘤病毒病因的研究。如能进一步将这一技术与现代某些分子生物学进展结合起来, 将有更大的发展前途, 例如现在已能纯化细胞核蛋白质的特异性抗体, 并已用来研究特异染色体蛋白质在细胞中的分布, 如能把这种方法与特异核苷酸序列在原位分布的研究结合起来, 将有可能在染色体水平上研究特异基因与特异蛋白质的相互关系。

本文承蒙童第周教授审阅。

文中所介绍的我们实验室内制备标记核酸的方法, 鱼类全血培养染色体的方法, 系由严绍颐、杨慧一、李光三等同志所提供, 特此致谢。

参 考 文 献

- Bautz, E. F. K. and Hall, B. D.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48,
400 (1962).
- Bolton, E. T. and McCarthy, B. J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48,
1390 (1962).
- Bolton, E. T. and McCarthy, B. J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 50,
156 (1963).
- Britten, R. J., *Science*, 142, 936 (1963).
- Buongiorno-Nardelli, M. Amaldi, F.,
Nature (Lond), 225, 946-948 (1976).
- French, W. L., Kitzmiller, J. B.,
Amer. Zoologist, 7, 782 (1967).
- Gall, J. G. and M. L. Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 64, 600 (1969).
- Gall, J. G. and M. L. Pardue, *Methods in Enzymology*, Vol. 21, Chap. 38 (1971).
- Gillespie, D. and S. Spiegelman, J.,
Mol. Biol., 12, 829 (1965).
- Henning, W., *Int. Rev. Cytol.*, 36, 1-44 (1973).
- Henning, W., *Trends in Biochemical Science*, December (1976).
- Jones, W. K., *New Techniques in Biophysics and Cell Biology*, Vol. 1 Chap. 2, (1973).
- Kuo, M. T. and Saunders, G. F., *Chromosoma*, 63, 3 (1977).
- Macgregor, H. C. and Mizuno, S., *Chromosoma*, 54, 1 (1976).
- McDougall, J., Dunn, A. and Jones, K. W., *Nature (Lond)*, 236, 348 (1972).
- Nygaard, A. P. and B. D. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12, 98 (1963).