
荧光原位杂交（FISH）探针的制备及其应用

概述

1、克隆性染色体异常是肿瘤的特征

2、染色体异常常见的类型

3、染色体异常的检测方法

二、荧光原位杂交及其探针

1、荧光原位杂交的原理

2、荧光原位杂交的探针

三、荧光原位杂交探针的制备和荧光原位杂交（按试验流程介绍）

一、 概述

1、克隆性染色体异常是肿瘤的特征

1914年德国遗传学家 Boveri 就提出染色体畸变与肿瘤起源相关，然而这还仅仅只是一个假说；1960年 Nowell 和 Hungerford 在 7 例慢性髓系白血病（chronic myeloid leukemia, CML）的患者中发现后来被称为费城染色体（Philadelphia chromosome）的微小染色体；1973年 Rowley 证实了 Ph 染色体是 9 号和 22 号染色体易位所致，这是人们在肿瘤中认识到的第一个染色体易位；目前，已经有 11,500 篇文献报道了 55,600 多种克隆性细胞遗传学异常。这些染色体畸变，尤其是染色体易位及其相应的融合基因在肿瘤致病的起始阶段有着重要的作用，无不说明克隆性细胞遗传学异常是肿瘤的特征，在肿瘤起源中起重要作用。

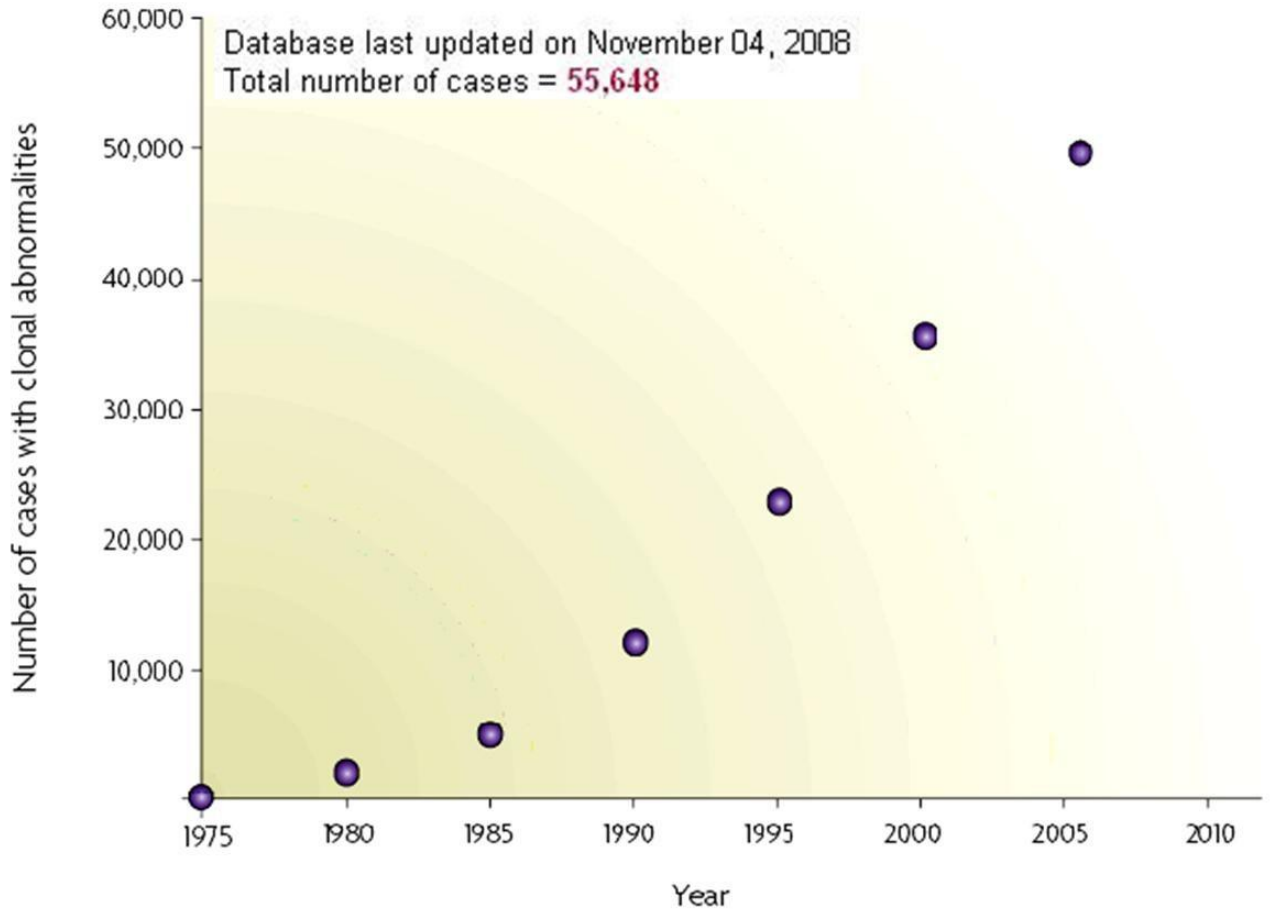
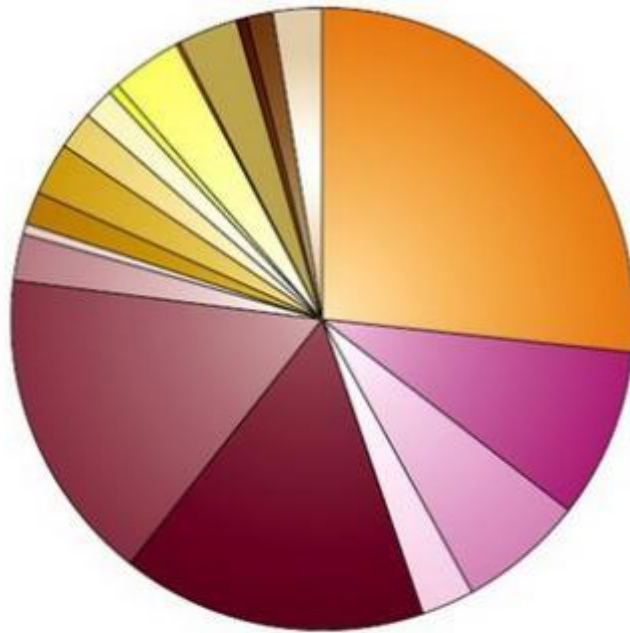


Figure 1 | The number of cytogenetically abnormal neoplasms reported in the literature.

DX.Y.CN

下图是各种疾病报告的克隆性染色体异常病例数



- AML (n=12,124)
- MDS (n=4,008)
- CML (n=2,999)
- CMD (n=1,180)
- ALL (n=7,194)
- B-ML (n=7,504)
- T-ML (n=1,094)
- HD (n=231)
- Respiratory system (n=759)
- Digestive system (n=1,334)
- Breast (n=799)
- Female genital organs (n=790)
- Male genital organs (n=297)
- Urinary tract (n=1,590)
- Endocrine system (n=150)
- Nervous system (n=1,416)
- Skin (n=264)
- Bone (n=570)
- Soft tissue (n=1,169)

The number of cases with clonal chromosome abnormalities in various diseases.

Nat Rev Cancer, 2007, 7(4):233-245

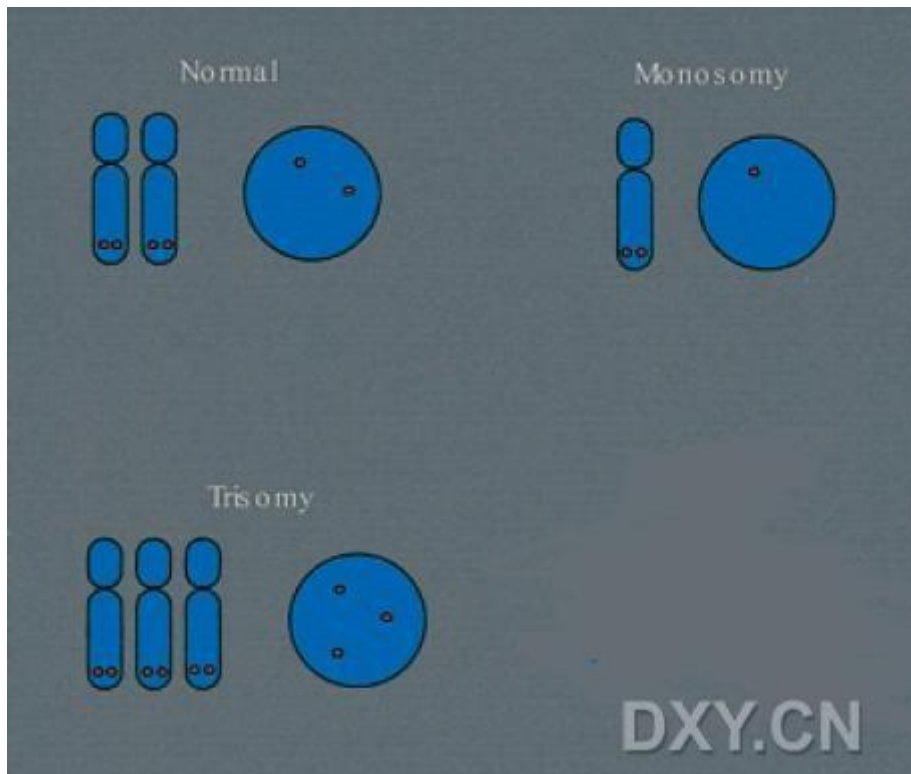
DXV.CN

2、

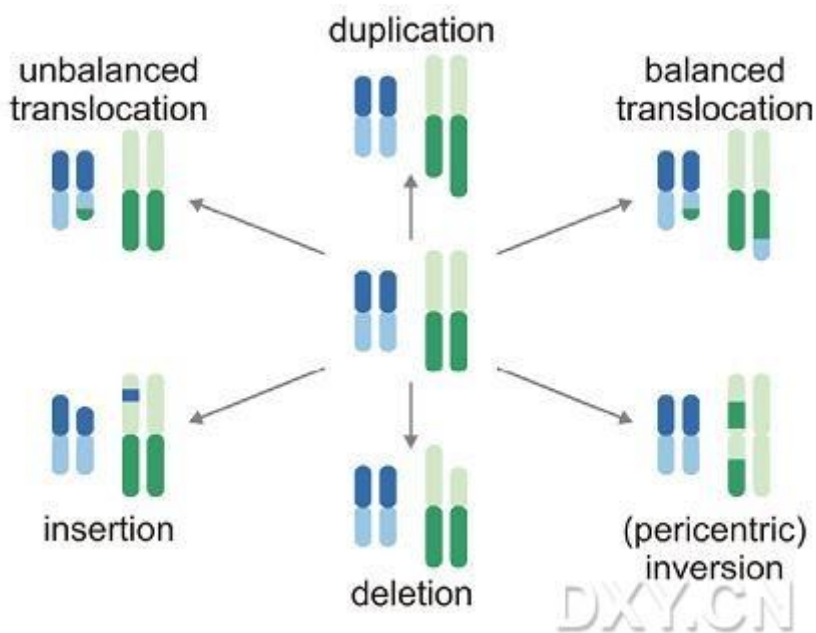
染色体异常的常见类型

染色体异常指数目异常和结构异常两类：前者包括整条染色体数目的扩增和缺失；后者包括染色体易位、插入、倒置、区带的缺失或扩增等。

下图是染色体数目异常



染色体结构异常



3、染色体异常的检测方法

染色体异常的识别得益于二十世纪六十年代后发展起来的胰蛋白酶-姬姆萨染色和常规显带技术，使得常规筛查全基因组染色体异常和检测染色体核型改变成为可能。染色体显带是细胞遗传学分析技术中标准和常用的方法，但耗时且依赖于获得良好的分裂相，还难于分析复杂和隐匿的异常。

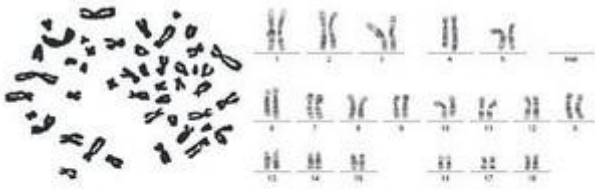
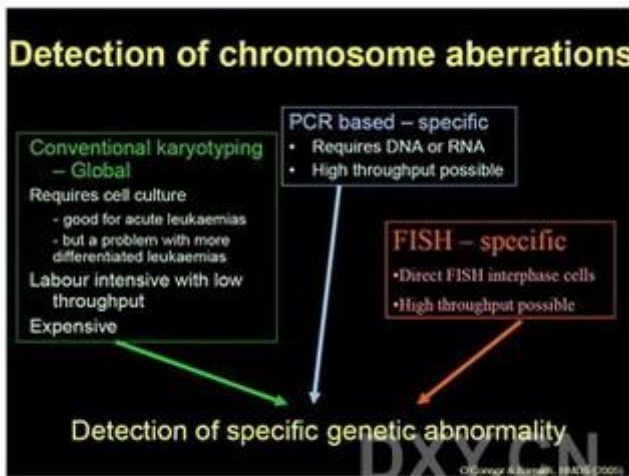


Figure 19: The 'evolution' of karyotyping
To the left is the karyotype described by Tjio and Levan, establishing the human chromosome number as 46, to the right is a normal human female karyotype, obtained by recent banding techniques.

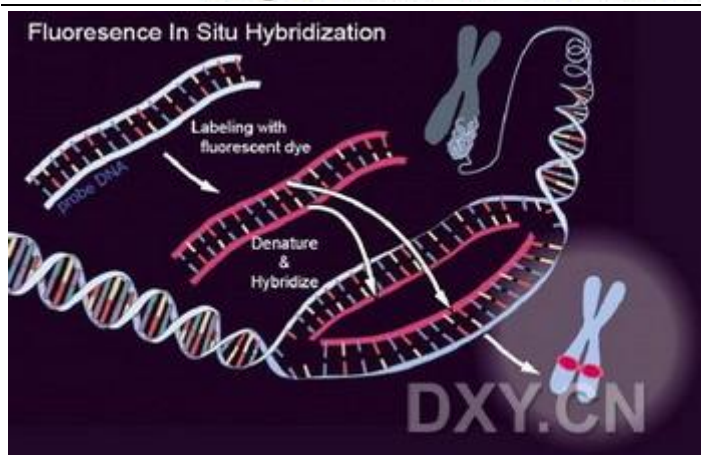
PCR 或荧光原位杂交（FISH, fluorescent in situ hybridization）对染色体异常的检出依赖于引物或探针与模板的结合，因此较常规显带具有更高的特异性，是高通量检测染色体异常的敏感和特异的方法。



荧光原位杂交及其探针

1、荧光原位杂交的原理

染色体荧光原位杂交始于传统的细胞遗传学和 DNA 技术的结合，这种结合开创了一门新的学科——分子细胞遗传学。其基础是 Southern blot 原理，以半抗原如生物素、地高辛间接标记或以荧光素直接标记的已知核酸分子为探针，探针和靶序列双链 DNA 变性后杂交，互补的异源单链 DNA 分子在适宜的温度和离子强度下退火形成稳定的异源双链 DNA，通过荧光标记的亲合素或抗地高辛抗体将半抗原显示出来，通过荧光显微镜观察杂交信号。FISH 具有快速灵敏、特异性好的特点，可同时分析分裂期和间期的多个细胞，并进行定量；可以检测隐匿或微小的染色体畸变以及复杂核型；还可以使用多种荧光标记，显示 DNA 片段及基因之间的相对位置与方向，空间定位精确。



2、荧光原位杂交探针的类型

FISH 技术种类甚多，发展迅速，其实现需要获得能与靶序列互补结合的探针。常用的探针有以下三类：1、染色体重复序列探针，主要是指着丝粒 α -卫星 DNA 重复序列探针和端粒重复序列探针，用以检测染色体数目异常，同时由于 G 显带时，端粒区是苍白的，因此涉及此区的易位常难以检测，而应用端粒探针则弥补了 G 显带的不足；2、染色体涂染探针，包括通过流式分选或显微切割获得的全染色体或染色体臂以及特异性区带的涂染探针，用以检测染色体数目或结构异常；3、染色体单一序列探针，包括各类人工染色体探针，如酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)、细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)、P1 人工染色体 (P1 artificial chromosome, PAC) 探针，主要用以识别染色体的易位、缺失和扩增。

α -卫星 DNA (alpha satellite DNA) 是唯一一个存在于所有人类染色体着丝粒区域的着丝粒 DNA (centromere DNA, CEN-DNA) 家族，由 171bp 的单体为单位组成的高度串联重复片段，重复数百次至数千次，跨越长达 100kb 的着丝粒 DNA 区域，其杂交将产生很强的杂交信号。因此常被选为着丝粒探针的来源。

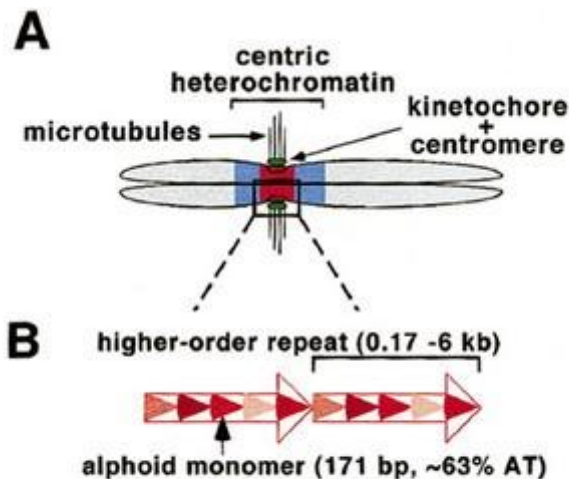


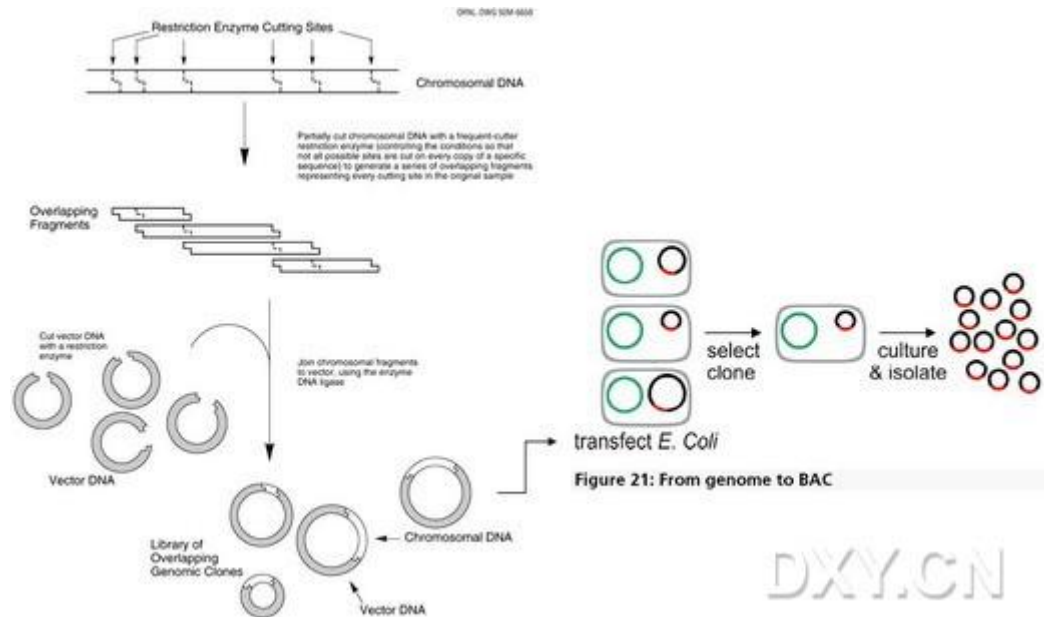
Figure 1. Structure and Organization of the Human Kinetochore and Centromeric DNA

The Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, Cambridge) 由 Wellcome Trust 和 British Medical Research Council 联合建立,是世界上较早开展人类基因组大规模测序并具有相当实力的测序中心。该中心利用能容纳大片段人类基因组 DNA 的高容量载体(如粘粒、BAC、PAC 等)构建了大片段人类基因组 DNA 文库,通过文库中末端相互重叠的 DNA 片段连接成叠连群(contig)并与鸟枪法相结合,加快了基因组测序,实现了人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)中人类基因组的物理作图(physical mapping)和基因组测序相结合的目标。因此,这些克隆文库为基因定位研究提供

了丰富的 DNA 序列资源，NCBI Clone Registry (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/>)、Ensembl Genome Browser

(<http://www.ensembl.org/index.html>) 和 UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) 提供的网络生物信息学资源也记载了许多克隆基因组定位的详细信息，为我们选择相应克隆作为染色体单一序列和端粒探针的来源提供了便利。

大片段人类基因组 DNA 文库的构建过程



常用的 BAC、PAC 文库

Table 1 Sources of clones used

Library	Clones in current whole-genome map	Type	Vector	Enzyme	Average insert size (kb)
RPCI-4, -5*	568	PAC	pCYPAC2	Mbol	116
RPCI-11*	272,027	BAC	pBACe3.6	EcoRI	174
			pTARBAC1†	Mbol	196
RPCI-13*	59,051	BAC	pBACe3.6	Mbol or DpnI	149
CT-A, -B‡	228	BAC	pBeloBAC11	HindIII	120
CT-C, -D1‡	52,725	BAC	pBeloBAC11	HindIII	125
CT-D2‡	559	BAC	pBeloBAC11	EcoRI	190
Other§	10,231				

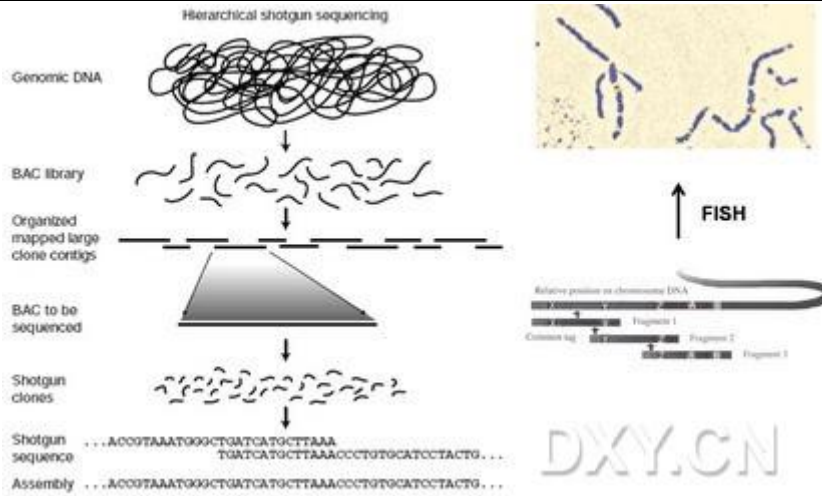
* <http://www.chori.org/bacpac/>

† RPCI-11, segment 5

‡ http://informa.bio.caltech.edu/Bac_info.html

§ Various clones from multiple libraries sent by collaborating centres.

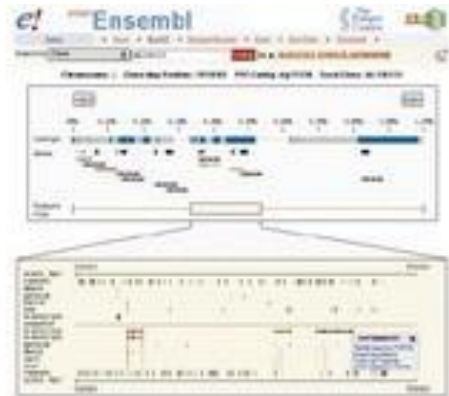
人类基因组的鸟枪法测序和物理作图



定位检索 BAC、PAC 克隆的常用数据库



UCSC Genome Bioinformatics
<http://genome.ucsc.edu/>



Ensembl Genome Browser
<http://www.ensembl.org/index.html>

荧光原位杂交探针的制备和荧光原位杂交

实验流程



第一天

缺口平移标记探针

1.1 试剂准备

(1) 0.1mmol/L dNTP

0.3mmol/L dATP、0.3mmol/L dCTP 和 0.3mmol/L dGTP 等体积混合。

(2) 0.1mmol/L dTTP

1 倍体积的 0.3mmol/L dTTP 和 2 倍体积的三蒸水混合。

1.2 缺口平移体系和反应条件

0.1mmol/L dTTP 6.5μl

0.1mmol/L dNTP 10μl

10× Nick Translation buffer 5μl

1mmol/L DIG-11-dUTP /Biotin-16-dUTP 0.5μl

Nick Translation Enzyme 10μl

DNA (1μg) X μl

H₂O 18-X μl

in total 50μl

以上为标记 1μg DNA 的缺口平移体系，若标记更多量的 DNA，则试剂量和反应体系相应等倍扩大。各成分混匀后短时离心。对于 ≤10kb 的质粒，于 15℃ 反应 3.5 小时；对于 BAC/PAC，于 15℃ 反应 9 小时。

1.3 凝胶电泳判断探针大小

将 EP 管置于冰上，取其中 5μl 于 70℃ 加热 5 分钟后行 2% 琼脂糖凝胶电泳以观察所标记探针的大小，单一序列探针合适大小为 200~600bp；如片段大小偏大，则于 15℃ 延长反应 10~30 分钟，再重复进行凝胶电泳，直至得到合适大小的探针。

1.4 终止反应

向反应体系中加入 1μl 0.5M EDTA 和（或）70℃ 加热 5 分钟，以灭活酶。探针于 -20℃ 保存备用。

第二天

1. 探针的沉淀和变性

1.1 探针混合物的组成

(1) 对 BAC/PAC 探针

DNA 探针 5ul

Human Cot-1 DNA 3ul
Salmon Sperm DNA 0.5ul
H₂O 1.5ul
in total 10ul

(2) 对着丝粒探针:

DNA 探针 5ul
Salmon Sperm DNA 0.5ul
H₂O 4.5ul
in total 10ul

1.2 DNA 的沉淀

将探针混合物与 1ul (V/10) 3M 醋酸钠 (PH5.2) 和 27.5ul (2.5V) 无水乙醇 (-20℃冻存) 混合, -80℃沉淀 30min (或 -20℃沉淀过夜), 以 14000g 在 4℃离心 30min, 以沉淀 DNA。

1.3 清洗沉淀

小心弃去上清, 用 70 %乙醇洗涤一次, 再次以 14000g 在 4℃离心 15min; 小心弃去上清, 在 45~50℃的中温水浴中烘干 DNA 沉淀 10~15min。

注: 当大部分乙醇蒸发时, 白色的 DNA 沉淀变为半透明状; 一定要彻底清除乙醇, 否则会在加入 Master Mix 后产生微小的沉淀, 导致高背景。

1.4 溶解探针

加入 5ul 预热至 37℃的去离子甲酰胺 (PH 7.0), 短时离心后在 37℃振摇 30min 以充分溶解 DNA; 再加入预热至 37℃的 Master Mix 5ul, 短时离心后在 37℃振摇 15~30min。

注: 振摇时间尽可能延长; DNA 沉淀亦可以 TE 缓冲液 1.1ul 溶解后加入 Vysis 探针缓冲液 4.4ul 稀释, 混匀后瞬时离心, 37℃振摇 15~30min。

1.5 探针的变性和预杂交

短时离心后于 80℃水浴中变性探针 10min, 冰浴 5 分钟; 短时离心, 于 37℃水浴中预杂交 30~60min; 独特序列探针 (如 cDNA) 和重复序列探针 (如 α -卫星 DNA) 探针, 无需预杂交。

2. 标本 (染色体靶 DNA) 的处理和变性

2.1 滴片和老化

取出储存于 -20℃的细胞悬液标本, 以 1100 rpm.离心 10min 沉淀细胞, 换用适量体积的新鲜甲醇:冰乙醇 (v/v) =3:1 固定液重悬细胞并调整细胞密度, 滴片, 划出杂交区域, 晾干; 在预热到 37℃ 的 2×SSC 中老化 30min (也可实验前夜室温过夜老化再以 2×SSC 浸泡 2 分钟); 依次于 70 %、90 %和 100 %的梯度乙醇中依次脱水, 每缸 2min, 晾干 (以下略作“梯度乙醇脱水后凉干”)。

2.2 RNase A 消化

每张玻片上加 30ul 100ug/ml RNA 酶 (将 10mg/ml 的 RNase A 储存液稀释 100 倍), 盖上 22×22mm 盖玻片, 置于 37℃湿盒中孵育 1 小时; 室温下 2×SSC 中振荡洗涤, 5min/次×3 次; 梯度乙醇脱水后凉干。

2.3 靶 DNA 的变性

将玻片放入预温至 72℃ (每增加一张玻片, 温度要提高 1℃) 的 70 %去离子甲酰胺/2×SSC 中变性 2 分钟后, 立即置入预冷至 -20℃保存的梯度乙醇脱水晾干。

2.4 蛋白酶消化

将 50ul 100 mg/ml 的胃蛋白酶 (终浓度为 0.01 %) 加入预温至 37℃的 50ml 蒸馏水 (PH 2.0, 以适量稀盐酸酸化) 中, 混匀; 将变性后的玻片放入其中处理 10 分钟; 室温下 1×PBS 中振荡洗涤, 5min/次×2 次; 室温下梯度乙醇脱水后凉干。

注: 靶 DNA 的变性和消化应与探针变性同步进行, 完成后尽快进行杂交。

3. 杂交

将变性后的 DNA 探针加于玻片杂交区域, 盖上 22mm×22mm 盖玻片, 封片后置于湿盒中, 37℃杂交过夜。

第三天

1. 杂交后洗涤和半抗原信号放大

1.1 杂交后洗片

小心揭去封片胶和盖玻片,将玻片置于预热至 46℃的 50 % 甲酰胺/2×SSC 中,5min×3 缸;将玻片移入室温下 4×SSC/0.1 % Tween-20 中振荡洗涤 5min×2 缸;每张玻片滴加 30 μl 阻断液 1, 盖上 22mm×22mm 盖玻片,于 37℃湿盒中孵育 30min;再次将玻片移入室温下 4×SSC/0.1 % Tween-20 中振荡洗涤 5min×2 缸。

注: 此后步骤应注意避光操作。

1.2 滴加一抗

将 4 μl Anti-DIG monoclonal antibody 和 0.5 μl Texas-red-Avidin 稀释于 100 μl 抗体稀释液 1 中, 混匀; 每张玻片滴加 25 μl 于杂交区域, 盖上 22mm×22mm 盖玻片, 于 37℃湿盒中孵育 1 小时; 室温下 4×SSC/0.1 % Tween-20 中振荡洗涤 5min×2 缸。

1.3 滴加二抗

将 4 μl Anti-mouse-Ig-DIG 和 1 μl Biotinylated goat anti-Avidin 稀释于 100 μl 抗体稀释液 1 中, 混匀; 每张玻片滴加 25 μl 于杂交区域, 盖上 22mm×22mm 盖玻片, 于 37℃湿盒中孵育 40min; 室温下 4×SSC/0.1 % Tween-20 中振荡洗涤 5min×2 缸。

1.4 滴加三抗

将 4 μl Anti-DIG-Fluorescein 和 0.5 μl Texas-red-Avidin 稀释于 100 μl 抗体稀释液 1 中, 混匀; 每张玻片滴加 25 μl 于杂交区域, 盖上 22mm×22mm 盖玻片, 于 37℃湿盒中孵育 30min; 室温下 4×SSC/0.1 % Tween-20 中振荡洗涤 5min×2 缸。

注: 以上步骤按双色 FISH 描述, 若为单色 FISH 则选择相应抗体即可。

2. 核复染和抗荧光淬灭剂封片

将 1.25 μl 5 mg/ml 的 DAPI 加入 50 ml 2×SSC 中 (终浓度为 125 ng/ml, 避光保存于 4℃), 混匀; 将玻片置于其中, 避光复染 2min; 2×SSC 中洗涤 5min; 梯度乙醇脱水晾干; 每张玻片滴加 10 μl 抗荧光淬灭剂封片, 盖上 22mm×22mm 盖玻片, -20℃避光保存。

3. 荧光显微镜检测 FISH 杂交信号

以荧光显微镜观察, 在 DAPI/FITC/Texas Red 滤光镜激发下观察中期间期细胞的荧光杂交信号, 计数细胞和采集图像。每例分析 100~200 个间期细胞核细胞, 重叠、破损、未去除细胞质和杂交信号微弱的细胞核不计入其中。对于双色双融合 FISH, 细胞内杂交信号相互靠近 (<1/10 核直径的距离) 者计为一个信号。

4. 储存数据