

荧光原位杂交技术的发展及其在染色体基因定位中的应用

THE DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION AND APPLICATION TO CHROMOSOMAL LOCATION OF GENE

王昌留^{1,2} 张士瑾¹ 王勇军¹

(¹ 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(² 烟台师范学院生物系 烟台 264025)

中图分类号 Q343 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)09-0021-03

自1969年 Gall 和 Pardue 利用放射性同位素标记的 DNA 探针检测细胞制片上非洲爪蟾细胞核内的 rDNA 获得成功之后, Pardue 等同年又以小鼠卫星 DNA 为模板,利用体外合成的含 ³H 的 RNA 为探针成功地与中期染色体标本进行了原位杂交,从而开创了 RNA-DNA 的原位杂交技术。为了精确地定位目的基因,1974年 Evans 第一次将染色体显带技术和原位杂交技术结合起来,提高了基因定位的准确性。1977年 Rudkin 等发明了用间接免疫荧光法检测目的 DNA 的非同位素原位杂交技术 (nonisotopic in situ hybridization, NISH), 其大致过程是首先制备抗 DNA-RNA 复合物的抗体和用以检测该抗体的经罗丹宁 (Rhodamine) 标记的二抗,接着用 RNA 探针同目的 DNA 进行杂交,杂交后的标本先后同抗 DNA-RNA 复合物的抗体和二抗进行反应,然后根据显示结合抗体所在的部位,以确定目的 DNA 的位置。此后, Langer 等首次采用生物素标记的核苷酸探针 (biotin-UTP) 成功地进行染色体原位杂交^[1]。至此,以荧光标记探针在细胞制片上进行基因原位杂交的技术已趋于成熟^[2]。先期的基因原位杂交技术多用于基因组中重复顺序的定位。自从 Gerhard 等于1981年成功地将人单拷贝 α 球蛋白 DNA 序列定位到 16 号染色体上后^[3], 原位杂交技术也越来越多地应用于非重复顺序基因定位的研究。

荧光原位杂交技术 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 又分成单一的原位杂交、多重的原位杂交和多色的原位杂交 3 种。早期的原位杂交采用放射性标记作探针,其检测手段采用放射自显影。虽然该法灵敏度高,杂交信号强,尤其是对单拷贝 DNA 顺序定位十分有用,但缺点也非常明显,如实验周期长,特别

是放射性银粒和染色体聚焦的不同平面,易引起计数上的误差,再加上放射性标记的探针本身价格高、不稳定,对操作人员有危害和废物难以处理^[2]。因此,非放射性标记的染色体原位杂交技术应运而生。从 20 世纪 80 年代后期开始,人们用更为安全可靠的非放射性物质如荧光酶、地高辛、生物素等标记的探针进行原位杂交。非放射性标记原位杂交具有以下优点:标记的探针稳定,非特异杂交信号污染少,检测简便、快速和安全等^[4]。特别是荧光信号可以被特定的相机或激光扫描显微镜检测并记录下来,通过数字成像显微技术以获得更为准确的图谱^[5,6]。荧光标记探针的应用使在同一细胞制片上同时进行不同基因的定位成为可能,也就是从原先单一的原位杂交发展到多重的原位杂交。在多重原位杂交的基础上又发展出多色原位杂交,常通称为 MFISH,“M”分别代表“Multicolor”、“Multiplex”和“Multitarget”3 种类型^[7-9],这是近几年才发明的技术。MFISH 的最大特点是:可将多次繁琐的 FISH 实验和多种不同基因的定位在一次 FISH 实验中完成。

1 荧光原位杂交的原理

荧光原位杂交技术的原理非常简单,它利用荧光标记的 DNA 或 RNA 分子,根据 DNA-DNA 和 DNA-RNA 碱基的配对原则与染色体上相对应的序列

第一作者:王昌留,出生于 1963 年,在读博士,副教授,目前在研项目为国家自然科学基金 30070110 号和国家 863 计划青年基金 2001 AA628130 号。E-mail: changliu.wang@sina.com

收稿日期:2003-02-20;修回日期:2003-05-08

杂交。进行原位杂交时,先用高温或碱处理 DNA 分子,使之发生变性;当温度下降或 pH 值恢复到中性,变性的 DNA 会按照碱基互补配对的原则,重新形成氢键恢复到原来的双链结构。如果两条单链的来源不同,只有它们之间的碱基序列是同源互补或部分同源互补时,才能全部或部分复性,产生分子杂交。由于探针带有荧光物质,因此杂交的位点可直接在显微镜下观察到^[10]。

2 荧光原位杂交的操作步骤

根据探针标记的方法不同,可分为直接法和间接法原位杂交。前者是将荧光素如异硫氰酸荧光素(FITC),罗丹宁(Rhodamine),德州红(Texas Red)等染料直接结合到 DNA 或 RNA 上,在荧光显微镜下观察杂交信号^[11];后者多按照 1986 年 Pinkel 等的方法,先用 DNA 标记物(如生物素、地高辛)标记探针,然后制备其荧光抗体,待探针与标本杂交后,再用抗体进行反应,根据荧光信号所在的部位以确定目的 DNA 的位置。荧光原位杂交的操作步骤可概括为(1)制备染色体;(2)标记探针;(3)将探针与实验材料的靶序列进行杂交;(4)检测杂交的结果。

3 荧光原位杂交在染色体基因定位中的应用

FISH 技术是基因作图的一个简单、有效、准确、可靠的方法,它可直接确定 DNA 分子在染色体上的位置。

3.1 构建 DNA 物理图谱

用常规的分子生物学技术构建分子图谱是基于对 DNA 分子的标记,从中找出不同的 DNA 序列之间的连锁关系和相对位置。这种分析方法的准确性和图谱的分辨率取决于染色体减数分裂时 DNA 的重组率。由于重组率在染色体上的分布是不均匀的,靠近着丝粒的异染色质区的 DNA 重组率远比距着丝粒远的低得多,从而造成两个分子标记之间的遗传距离发生误差^[10]。FISH 在构建 DNA 分子图谱时,所用的分辨率是指两个不同的 DNA 探针能够检测到的最小距离,它决定了图谱的准确性和精密程度。FISH 技术发展至今,已可以在不同水平上进行染色体定位,即:在中期染色体上用 FISH 技术构建染色体分子图谱,这一水平的分辨率大约为 1~3 Mb,尚可用离心机械力将中期染色体拉长 5~20 倍,从而提高分辨率;在减数分裂的粗线期染色体上用 FISH 技术构建染色体分子图谱,由于该期分离到的染色体长度通常比中期染色体长 10~20 倍,这一水平的分辨率大约为 100 kb;在间期核的染色质上用 FISH 技术构建染色体分子图

谱,由于染色质凝缩程度很低,FISH 的分辨率可达 50 kb 左右;在游离的染色体上用 FISH 技术构建染色体分子图谱,也就是对间期核进行处理,使其释放出游离的染色丝,这种染色丝已失去原有的细胞空间结构,故 DNA 凝缩程度进一步降低,其 FISH 分辨率接近 12 kb;在 DNA 纤维上用 FISH 技术构建染色体分子图谱,在游离的染色体基础上,进一步处理染色体,使 DNA 分子完全从蛋白质中分离出来,制备 DNA 纤维,分辨率能达到 1~2 kb^[12,13]。高分辨率的 FISH 能快速准确地得到探针序列之间的顺序、方向及真实的物理距离,因而被广泛地应用于 DNA 物理图谱的构建。

3.2 基因组分析

用杂种一个亲本的基因组 DNA 作探针,与杂种进行染色体原位杂交,可有效地将同源性比较接近的两个染色体组(如同一属内的不同种之间)区分开来,这就是比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)技术。它采用待测 DNA 和参照 DNA 进行不同的荧光标记,以相同比例让两者竞争性地与正常染色体进行原位杂交,检测两种颜色的荧光强度,根据两种颜色的比率情况来显示基因组的结构状况,如发现两种颜色比率改变,则说明该区域存在 DNA 序列的缺失或扩增。如待测 DNA 有过量扩增,则与染色体结合的荧光占优势,信号增强。如待测 DNA 有缺失,则只显示参照 DNA 所标记的荧光颜色^[14,15]。另外,利用特定的 DNA 片段作为探针通过染色体原位杂交还可以反映染色体结构或有关核酸序列标记的空间物理位置,以确定染色体是否重排。G 带技术可区分染色体上的常染色质和异染色质,将 G 带结果和 FISH 的结果相结合,可了解基因在不同物种的活动状态为基因组进化研究提供重要信息^[12]。

3.3 转移基因整合位点的检测

目前,将外源基因直接导入动植物基因组已成为创造新品种的常用方法。转移基因的表达和整合位点有关,整合位点不同,基因的表达有明显差异。转移基因的整合还可能会引起插入突变,产生明显的表型效应。荧光原位杂交技术可用来直接检测到外源基因是否整合及整合位点。另外,通过标记的 DNA 探针与转基因动植物细胞中的 mRNA 杂交,观测其显示信号的强弱,还可获得转基因表达的信息^[16,17]。

参考文献

- 1 Langer P R, Waldrop A A, Ward D C. Enzymatic synthesis of biotinylated polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci US A*, 1981, 78(11): 6 633-6 637
- 2 孙梅,刘红林. 原位杂交技术及其在动物基因定位上的应用进展. *黄牛杂志*, 2000, 26(6): 39-43

- 3 Gerhard D S, Kawasaki E S, Bancroft F C, et al. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci US A*, 1981, 78(6): 3 755-3 759
- 4 黄梅,袁仕取,朱作言.原位杂交和原位技术在鱼类基因定位中的应用.水生生物学学报,2001,25(2): 195-201
- 5 任南,宋运淳.玉米(*Zea mays* L)cdc2和prh1基因的染色体原位杂交物理定位.遗传学报,1998,25(3): 271-277
- 6 张明,曹家树.染色体原位杂交技术.植物生理学通讯,2000,36(6):544-549
- 7 Tanke H J, Wiegant J, van Gijls wijk R P, et al. New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: Combined binary ratio labelling. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7(1):211
- 8 König K, Rie mann I, Fischer P, et al. Multiplex fish and three-dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulses. *Histochem Cell Biol*, 2000, 114:337-345
- 9 Sokolova I A, Halling K C, Jenkins R B, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn*, 2000, 2(3):116-123
- 10 杨易,钟金城.原位杂交技术及其在动物遗传育种中的应用.西南民族学院学报,2002,28(2):219-222,238
- 11 Wiedorn K H, Kuhl H, Galle J, et al. Comparison of insitu hybridization, direct and indirect insitu PCR as well as tyramide signal amplification for the detection of HPV. *Histochem Cell Biol*, 1999, 111(2):89-95
- 12 史娟.染色体原位杂交的发展及其应用.作物品种资源,1999(1):232-234
- 13 孙春晓.基因的染色体定位.国外医学:遗传学分册,2000,23(3):120-124
- 14 杨林,袁爱力.比较基因组杂交的方法与应用.癌症,1998,17(5):397-399
- 15 周晓.比较基因组杂交及其应用.国外医学:放射医学核医学分册,1998,22(2):80-83
- 16 刘蔽,卢光锈.应用荧光原位杂交技术检测人类APB_{WE}基因在转基因小鼠染色体上的定位及位置效应.遗传学报,2001,28(9):827-831
- 17 温昱,秦书俭.转基因技术常用的检测方法.锦州医学院学报,2001,22(6):48-50

(本文编辑:刘珊珊)