

地高辛标记探针用于人白细胞基因定位

隋正红 蒋盘宏 张学成
(青岛海洋大学生物系 266003)

基因定位可称为基因的功能解剖学^[1], 实现了基因定位, 有助于深入了解基因的结构、功能与调节及基因间的相互关系, 揭示本质与表象的关系。近十几年来, 它对阐明癌变机理^[2]及进一步的肿瘤治疗^[3]更是起到了推动作用, 基因定位在自然科学研究中的重要作用毋庸置疑。而基因定位中探针标记也经历了由放射性同位素^[4]到非放射性标记^[5,6]的过程, 非放射性标记技术的出现解决了稳定性、安全性的问题。1988年 Heiles 等^[7]发展了用地高辛标记 DNA 探针的方法, 使非放射性标记的方法在灵敏度和特异性方面得到了很大的提高。本文介绍了我们用地高辛标记探针在人白细胞制片上进行基因定位的工作, 并就影响基因定位效果的因素进行了探讨。

材料和方法

1. 材料

RPMI 1640(日本进口), PHA(协和遗传室), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(中科院生物物理所), 秋水仙素, 地高辛标记检测试剂盒及抗地高辛-FLUORESCEIN 荧光抗体(德国宝林曼公司), 组织凝集素基因片段(法国 CANNY 教授惠赠)

2. 细胞培养和制片

人外周血细胞经 PHA 刺激培养 60 小时后加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 在作用 7—8 小时后, 再加入秋水仙素(终浓度为 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 小时后收集细胞, 并用 0.075 mol/L 氯化钾低渗处理 20 分钟后制片。

3. 探针标记

以随机引物法用 Dig-11-dUTP 标记组织凝集素基因片段。待标记基因片段于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟后, 立即于冰水中冷却, 依次加入 2 μL 六聚核苷酸混合物, 2 μL dNTP 混合标记底物, 用双蒸水补至 19 μL 体积

后加入 1 μL Klenow 酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加 2 μL EDTA (0.2 mol/L, pH 8.0) 终止反应, 再加 2 μL 4 M LiCl, 75 μL 95% 乙醇, -70 $^{\circ}\text{C}$ 半小时后, 10,000 rpm 离心 10 分钟, 洗涤沉淀, 空气干燥, 溶于 TE。(详见试剂盒操作说明)

4. 原位杂交及洗涤

制片先用 RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 40 分钟, 用 2 \times SSC 冲洗后梯度乙醇脱水, 空气干燥。于变性液 (70% 甲酰胺, 2 \times SSC pH 7.0), 70 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒后立即于冰乙醇梯度中脱水, 空干后, 每片加 40 μL 杂交液 (50% 甲酰胺, 2 \times SSC pH 7.0; 5 \times Denhardt's, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鱼精 DNA; 10% 葡聚糖硫酸盐; 30 ng 变性标记探针) 盖上盖玻片, Parafilm 膜封片, 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。

杂交结束后先用 100 ml 2 \times SSC, 0.1% SDS 洗涤 30 分钟三次, 再用 100 ml 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 42 $^{\circ}\text{C}$ 冲洗 30 分钟三次, 用 2 \times SSC 冲洗 10 分钟两次后显色。或先于 50% 甲酰胺, 2 \times SSC 39 $^{\circ}\text{C}$ —42 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤 10 分钟三次, 后于 2 \times SSC 39 $^{\circ}\text{C}$ —42 $^{\circ}\text{C}$ 冲洗 10 分钟三次, 再于 2 \times SSC 冲洗 10 分钟两次后显色。详见 Garson^[8]法。

5. 杂交后显色

(1) 酶法显色按试剂盒操作说明。

(2) 荧光显色: 玻片上滴加 PBS-BSA 稀释的羊抗地高辛-FLUORESCEIN 荧光抗体(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 盖上盖玻片 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分钟后 PBS 洗涤 5 分钟, 置于 0.01% 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 稀释的吖啶橙中染色 1 小时。

6. R 显带

按文献^[9]稍加改动, 将水浴温度改为 42 $^{\circ}\text{C}$, 其余处理相同。

7. Giemsa 染色按常规。

结果与讨论

用地高辛标记探针经杂交、洗涤后, 以两

种方法显示杂交结果-酶法或荧光方法。经酶显色后在相差显微镜下可见蓝紫色圆点,确定染色体条数>44的作为一个统计分裂相,拍照、记录位于染色体上的杂交点,位置及点数,再经R显带的Giemsa染色步骤,确定杂交点所在染色体区带位置。图为酶显色同一分裂相杂交后、显带后照片,比较下可见杂交点

位于10q112区。

共分析了102个分裂相,共有267个位于染色体上的杂交点,其中11.6%的杂交点位于特异位置10q112区,且位于这一区的杂交点数远远高于其他位置上的点三倍以上,符合阳性点的确定原则,因此可以确定10q112为基因特异结合位置。统计结果见表1。

表1 基因定位两种显示方法统计结果(其中酶法为三次平均荧光法为两次平均结果)

方 法	特异杂交分裂相		10q112区点		平均本底	特异点随机分布率	特异杂交点数			
	总分裂相数	总杂交点	总分裂相数	总杂交点			随机分布率	随机分布率		
酶法	30/102	29.4%	31/267	11.6%	267/102	2.6	267/311	0.29	31/0.86	36
荧光法	22/69	31.9%	22/111	19.8%	111/69	1.67	111/311	0.18	22/0.36	61.1

另外还用荧光方法显示了杂交信号,结果见表1。用荧光显色在荧光显微镜下可见亮黄色杂交点,同理共分析了69个分裂相,其中19.8%的点位于同一特异区域。证实了酶显色结果。由表1可见,荧光显示系统的阳性率为19.8%,高于酶显示系统11.6%的阳性率,而平均本底低,荧光显示系统的显示效率高于酶显示系统,而特异性较高。由于荧光易褪色,故相比酶显色结果它不易保存。但这并不影响短期内的观察。所以这两种方法中以荧光法为佳。但我们使用的是抗探针标记物抗体直接显示荧光方法,即FLUORESCIEIN连在抗地高辛的抗体上,若能采用当前文献报道的荧光级联显示法,可能会得到更好的结果(可达50%),这也说明了基因定位效果不但决定于探针与基因的同源性,还取决于显示体系的效率。

地高辛标记探针进行基因定位,只需在载玻片上进行简单的操作,省却了放射性显示所需的感光及安全防护等复杂、不安全因素,而且地高辛探针较稳定,操作周期短,相比生物素探针,又没有内源性因素影响,因此地高辛标记探针无论在基因定位或组织细胞定位中均有很好的应用价值。

基因定位中有许多因素影响最终效果,其中之一是显带,由于在定位过程中要经过高温

杂交、杂交后洗涤等较剧烈的处理,染色体的形态易受破坏,因此长久以来,人们一直在寻找重复性好,带型清晰的显带方法,我们经过反复摸索,找到了一种R显带方法,能满足基因定位的需要,在这一方法中只需对制片进行一次紫外照射和Giemsa染色,处理条件温和,能维持染色体形态的稳定性,而且显带带型清晰,可重复性强,增加了基因定位的准确性和可信性。但这一次照射在杂交前和杂交后效果不同,杂交前用紫外照射的显带效果比杂交后的要好。采用杂交前的紫外照射大大提高了基因定位中的可分析分裂相率。

另外有关杂交后洗涤,文献上多采用50%甲酰胺,2×SSC条件,采用甲酰胺是为了降低杂交温度,使染色体少受高温损伤,但由于甲酰胺是一种强去垢剂,对染色体形态影响还是很大,常导致染色体变形。我们改用作用较温和的0.1%SDS代替甲酰胺,取得了较好的效果,结果见表2。由表2可见,以0.1%SSC,2×SSC洗涤,可分析分裂相率大大提高($P<0.05$),说明SDS比甲酰胺更能较好地维持染色体的形态,而且只要洗涤充分,用这一方法得到的杂交结果(平均本底2.6)与文献报道的相当,说明它能较有效地洗脱背景。经过这些改进,使杂交后可计数的分裂相增多,且

表2 洗涤条件的比较

实验次数	可分析分裂相率(46条染色体中>50%分带好的分裂相数/观察分裂相数)			
	50%甲酰胺, 2×SSC		0.1%SDS, 2×SSC	
1	9/23	39.13%	17/25	60%
2	15/35	42.86%	15/25	68%

带型清晰,能够准确指示杂交点的位置,因此可以得到更多的数据,节省时间,又能得到较好的定位效果,增加了定位结果的可信性。

因此我们提出用地高辛标记探针进行的基因定位中能取得较好基因定位效果的技术路线:人白细胞制片→紫外照射制片→地高辛标记探针在制片上杂交→SDS洗涤→荧光显示→记录→Giemsa染色→记录

摘 要

用地高辛标记探针在人染色体上进行了基因定位。使用了酶显色和荧光显色,两者得到了相同的定位结果,特异区阳性率分别为11.6%和19.8%,荧光显色特异性较高,说明基因定位效果受显示系统效率的影响,地高辛标记探针用于基因定位有比放射性探针、生物素探针更多的优越性。又讨论了几个影响效果的因素,提出以SDS代替甲酰胺洗涤;紫外照射于杂交前R显带方法能取得较好的基因

定位效果。

关键词: 地高辛标记探针 基因定位

参 考 文 献

- [1] Mukusick, V. A., 1980, *J. Hered.*, 71: 370.
- [2] Groffen, J. et al., 1983, *J. Exp. Med.*, 158: 9.
- [3] Mamanway, ME., et al., 1990, *Lancet*, 335: 808.
- [4] Zischler, H., et al., 1989, *Hum. Genet.*, 82: 227.
- [5] Hopman, A. H. N., et al., 1986, *Histochemistry*, 84: 169.
- [6] Viegas-Pequignot, E., et al., 1986, *Cytogenet Cell Genet*, 42: 105.
- [7] Heiles, B. J., et al., 1988, *Biotechniques*, 6: 978.
- [8] Garson, L. A., et al., 1987, *Nucleic Acids Res.*, 15: 4761.
- [9] 晏炬, 1985, *中华医学检验学杂志*, 8(1): 55.

DIGOXIGENIN-LABELLED PROBE APPLIED IN GENELocalIZATION OF LEUCOCYTE OF HUMAN BEING

Sui Zheng-hong Jiang Pan-hong Zhang Xue-cheng
(Biology Department, Ocean University of Qindao 266003)

ABSTRACT

We applied Digoxigenin-labelled probe in gene localization on human chromosomes. Using enzymatic and Fluorescent method to show, all of them showed the same result. The positive rate of specific region was 11.6% and 19.8% respectively, while Fluorescent method was more specific which indicated that the effect of gene localization was influenced by the efficiency of showing system. Digoxigenin-labelled probe was superior to isotopic and biotinylated probes in gene localization. Then we discussed some factors influencing the localization effect. It was suggested that using SDS in place of formamide in washing and R-banding of UV-exposure before hybridization give us better results.

Key words, Digoxigen-labelled probe Gene localization