

# 荧光原位杂交及其应用

马海飞

(中国科学院北京发育生物学研究所 100080)

荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization 缩写为 FISH)法是 80 年代才开始应用的细胞分子生物学中的一种重要的非放射性原位杂交方法。它对检测细胞内 DNA 或 RNA 的某种特定序列的存在与否最为有效。FISH 在基因定位,染色体鉴别,细胞内检测特定 DNA 或 RNA 的存在等细胞遗传学,遗传工程学以及医学等广泛研究领域中都起着越来越重要的作用。为了能使更多的人了解和掌握这种方法,笔者以自己两年多使用 FISH 的部分研究为例,把自己总结形成的一套 FISH 在培养细胞上的具体操作方法尽可能通俗易懂地在本文中做简单介绍。

FISH 是建立在许多分子生物学方法基础之上的一种高新技术,它涉及到许多基本的细胞和分子生物学操作方法,如 DNA 或 RNA 的分离回收,酶切和电泳,索氏检测以及生物光学显微镜标本的制作和观察,还需要免疫学以及与核酸复制有关的一些知识。由于篇幅所限,在此不能一一例举。有关这些操作的方法基本已经规范化,在很多生物技术的书中都有详细介绍(如文献[1])。必要的基础知识在许多教科书中也有介绍。有关原位杂交的理论依据可参考文献[2]。这里仅以果蝇培养细胞中的组蛋白基因检测实验为例,说明 FISH 的特点及操作过程等。

### 一、FISH 法的特点

在 FISH 法出现以前使用的多为放射性原位杂交法。此法的灵敏度较高,但有几个主要的缺点:首先要求具备使用放射性同位素的专用实验室。目前尚有众多单位还不具备这种条件,因此无法进行这种实验。

其次放射自显法要有一个曝光显影的过程,需要数周的时间,实验周期长而且背景深,常使结果分析复杂化。再有,用放射性同位素标记的探针不易保存,必须现用现作;实验后放射性废液的处理也很麻烦;放射性物质对环境有污染的可能性,这对工作人员本身的健康也不利。FISH 法的主要特点正是克服了放射性原位杂交的这些缺点:不需要特殊实验室,无放射污染危险,标记探针可长期保存,实验周期短并且其灵敏度与放射性原位杂交相比毫不逊色。利用荧光强度测定装置还可以进行定量检测。非放射性原位杂交的方法除 FISH 法之外常用的还有以酶特异反应显色来检测目的核酸序列的酶标原位杂交法等,但这些方法与 FISH 相比灵敏度低,目的核酸量少时效果较差,而且不能用于定量检测实验。正因如此,FISH 法日趋受到人们的重视。

### 二、FISH 法的操作过程

FISH 的整个过程可大体划分为以下几步:

- 1) 制备探针:包括探针标记和检查等;
- 2) 显微镜标本的制作及处理;
- 3) 原位分子杂交:包括杂交和冲洗过程;
- 4) 荧光免疫检测:用单克隆抗体与探针上的标记物质结合,再用 FITC 指示探针的存在与否。FITC 是一种荧光物质,可以在荧光显微镜下观察到;
- 5) 观察分析:要求有一套荧光显微镜。

#### A) 制备探针(以 DNA 探针为例)

现有果蝇的组蛋白基因 DNA(5 kb),以此 DNA 作为模板制作探针。制备探针的方法有几种,如随机引物法,缺口平移法和 PCR 法等。每种方法的原理和具体操作都不同。探针标记好之后应当对探针的大小和标记的好坏进行检查。本实验中使用的是用生物素以 PCR 法制备的单链探针。有关制备探针的详细方法将另文发表。

#### B) 显微镜标本的制片(以培养细胞为例)

##### ① 准备

果蝇培养细胞( $10^5$ — $10^6$ /ml), 低渗液:  $0.075 \text{ mol/l KCl}$ ; 琼脂糖液: 用低渗液溶解的  $0.5\%$  低熔点 ( $20$ — $30^\circ\text{C}$ ) 琼脂糖; 洁净的载玻片, 用 PAP 笔(日本 DAIDO SANG YO 株式会社) 在载玻片的中央部位画一个直径约  $1.5 \text{ cm}$  的圆圈; 潮湿盒; 固定液(甲醇: 冰醋酸 =  $3:1$ )。

## ② 操作:

取培养细胞  $1 \text{ ml}$  于微离心管中,  $1500 \text{ rpm}$  离心  $5$  分钟, 去上清, 用 PBS 洗细胞  $1$  次, 加预热至  $25^\circ\text{C}$  ( $25^\circ\text{C}$  为果蝇细胞的培养温度) 的低渗液  $150 \mu\text{l}$ , 再加  $150 \mu\text{l}$  预热至  $25^\circ\text{C}$  的琼脂糖液充分混合, 滴到几张预热至  $25^\circ\text{C}$  的载玻片上的圆圈内, 水平放在  $25^\circ\text{C}$  的潮湿盒内静置  $30$  分钟。之后, 取出载玻片使之垂直除去多余的液体, 插入固定液内在室温固定  $30$  分钟, 取出后风干备用。以新制备的标本为好。如需保存, 应放在  $-20^\circ\text{C}$  下保存, 使用前再以同样方式固定一遍。用此固定液固定分离的细胞和新鲜冷冻切片都可达到理想效果。如有必要经过石蜡包埋后再进行原位杂交的话, 那么应当使用  $4\%$  的多聚甲醛磷酸盐缓冲生理盐水进行灌注固定后再包埋。具体操作可参照文献 [2]。

## C) 原位杂交

### ① 准备

i. 细胞标本的杂交前处理: 把上述固定好的标本放在  $60^\circ\text{C}$  烤箱中干焙  $3$  小时, 之后进行下列各步操作:

a. RNA 消化处理(此处理的目的是除去细胞核内与探针 DNA 序列可能互补的 RNA, 以防止它对 DNA 间杂交的干扰):

消化液组成: RNase A  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $2 \times$  Denhardt 溶液,  $2 \times$  SSC。

实例: (4 份用量, 每份  $75 \mu\text{l}$ )

$1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase A	$30 \mu\text{l}$
$50 \times$ Denhardt 溶液	$12 \mu\text{l}$
$20 \times$ SSC	$30 \mu\text{l}$
DDW	$228 \mu\text{l}$
合计	$300 \mu\text{L}$

混合后放置在冰水中待用。

消化处理方法: 在样品细胞上加 RNA 消化液  $75 \mu\text{l}$ , 把玻片平放在潮湿盒内, 在  $37^\circ\text{C}$  反应  $1$  小时。用上述固定液固定  $30$  分钟, 风干。

b. 盐酸处理(目的是使染色体上结合的蛋白质变性并除去):

标本玻片在 PBS(不含  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  离子, 以下同) 中浸泡  $10$  分钟, 之后移入  $0.2 \text{ N}$  的 HCl 中浸泡  $20$  分钟, 用 PBS 浸洗  $3$  次, 每次  $5$  分钟。全部在室温下进行。

c. 蛋白质消化处理(目的是除去所有不必要的蛋白质以保证杂交的顺利进行和减弱背景强度, 使信号更加清晰。并使核膜上产生足够大的孔易于探针通过):

消化液组成: proteinase K  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $20 \text{ m mol/L}$  Tris-HCl(pH 7.4),  $2 \text{ m mol/L}$   $\text{CaCl}_2$ 。

实例:

$2 \text{ mg/ml}$ proteinase K	$1 \mu\text{l}$
$60 \text{ mmol/l}$ Tris-HCl(pH 7.4)	$333 \mu\text{l}$
$10 \text{ mmol/l}$ $\text{CaCl}_2$	$200 \mu\text{l}$
DDW	$466 \mu\text{l}$
合计	$1000 \mu\text{l}$

消化处理方法: 在标本玻片上加蛋白质消化液复盖细胞, 水平放在潮湿盒内,  $37^\circ\text{C}$  下反应  $15$  分钟。用  $0.1 \text{ mol/l}$  甘油- $2 \times$  SSC 溶液在室温下作用  $10$  分钟以终止反应。

d. 细胞核内 DNA 的变性处理(目的是使细胞核内的 DNA 由双链状态变为单链状态, 便于探针与其相应部位的分子杂交)。

操作方法: 用  $2 \times$  SSC 浸洗标本两次, 各  $5$  分钟; 用  $70\%$  甲酰胺- $2 \times$  SSC 溶液冲洗标本; 然后把标本放在  $71^\circ\text{C}$  预热的  $70\%$  甲酰胺- $2 \times$  SSC 溶液中加热  $5$  分钟; 迅速把标本玻片移入  $-20^\circ\text{C}$  预冷的  $70\%$  酒精中冰镇  $5$  分钟, 并换一次同样的酒精再冰镇  $5$  分钟。之后, 在  $80\%$ 、 $90\%$ 、 $95\%$ 、 $100\%$  的酒精系列中脱水各  $3$  分钟, 风干  $30$  分钟以上备用(甲酰胺要事先进行脱离子处理, 杂交反应液中亦同。脱水在室温进行)。

ii. 探针的杂交前处理:

按以下组成在  $1.5 \text{ ml}$  微离心管中配制杂交反应液:

标记探针 DNA	$2-5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
$2 \times$ SSC(pH 6.8)	
硫酸葡聚糖	$10\%$
甲酰胺	$45\%$
$1 \times$ Denhardt 溶液	
PB pH 6.8	$10 \text{ m mol/L}$
E. Coli tRNA	$500 \text{ ng}/\mu\text{l}$
鲑鱼精子 DNA	$250 \text{ ng}/\mu\text{l}$

实例(总量  $50 \mu\text{l}$ ):

20—50 ng/ $\mu$ l 标记探针	5.5 $\mu$ l
20 $\times$ SSC pH 6.8	5.0 $\mu$ l
50% 硫酸葡聚糖	10.0 $\mu$ l
脱离子甲酰胺	22.5 $\mu$ l
50 $\times$ Denhardt 溶液	1.0 $\mu$ l
0.5 mol/l PB pH 6.8	1.0 $\mu$ l
10 $\mu$ g/ $\mu$ l E.coli tRNA	2.5 $\mu$ l
5 $\mu$ g/ $\mu$ l 鲑鱼精子 DNA	2.5 $\mu$ l
探针 DNA 的变性处理:	

本实例中使用的是单链探针, 可以省略此步。如使用双链探针的话, 就必须进行探针 DNA 的变性处理。方法很简单: 上述杂交反应液配好之后, 充分混合, 瞬间离心, 盖紧盖子, 放在 80 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 接着迅速移入冰水中冷激 5 分钟以上。探针 DNA 变性处理的目的是与细胞核内 DNA 变性处理的目的相同。

## ② 杂交与冲洗的操作方法

### i. 杂交反应操作

把变性后的探针 DNA 杂交反应液加到经过变性处理的干燥标本玻片上, 加盖直径 15 mm 的圆形盖玻片。使载有细胞的一面向下, 水平扣放在潮湿盒中。潮湿盒的内底面敷一张滤纸, 用 45% 的甲酰胺-2 $\times$ SSC 溶液(可以用标本变性处理时用过的甲酰胺废液)把滤纸润湿, 滤纸上平行放两支等粗的玻璃棒, 标本玻片平摊在这两支玻璃棒上。盖紧潮湿盒的盒盖, 用胶带封住盒口, 遮光放在 37 $^{\circ}$ C 下反应两夜一天(约 40 小时)。

### ii. 杂交后冲洗

杂交反应完之后必须将残留的游离探针洗去。冲洗条件要求十分严格, 洗轻了洗不净, 造成背景太深。洗重了有可能把杂交结合在目的序列上的探针洗下来, 使得杂交失败。

操作方法: 用 37 $^{\circ}$ C 的 50% 甲酰胺-2 $\times$ SSC 溶液在水平振荡器上以 100 rpm 的速度洗涤玻片 3 次, 每次 1 小时。接着用 2 $\times$ SSC 在室温下以同样转速洗 3 次, 每次 10 分钟。最后用 1 $\times$ SSC 在室温下以同样转速洗 2 次, 每次 10 分钟(此步使用的甲酰胺无须脱离子)。

## D) 荧光免疫检测

### ① 准备

用 PBS 制备 0.1%(V/V) 的 Triton X-100 溶液(PBS/TX); 50 倍稀释的正常驴血清(NDS); 50 倍稀释的抗生物素兔 IgG; 50 倍稀释的抗兔 IgG 的生物素标记抗体(产自驴); 50 倍稀释的 Streptavidin-FITC

(以上稀释均用 PBS); 甘油与 Tris-HCl pH 8.0 的 1:1 溶液(G/T); 无色指甲油。

### ② 操作

用 PBS/TX 浸泡标本 5 分钟。除去多余的液体, 在细胞处滴加 NDS, 在潮湿盒内室温下静置 30 分钟。用 PBS/TX 冲洗一下。除去多余的液体, 滴加抗生物素兔 IgG, 加盖玻片, 样品面向下水平放在潮湿盒内, 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时。用 PBS/TX 在室温下浸洗 3 次, 每次 5 分钟。除去多余液体, 加生物素标记抗体, 加盖玻片, 样品面向下水平放在潮湿盒内, 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时。用 PBS/TX 在室温下浸洗 3 次, 每次 5 分钟, 除去多余的液体, 加 NDS, 加盖玻片, 水平放在潮湿盒内, 在室温下放置 15 分钟。在 PBS/TX 中洗去盖玻片。除去多余的液体, 加 Strept avidin-FITC, 加盖玻片, 样品面向下水平放在潮湿盒内在 37 $^{\circ}$ C 遮光静置 30 分钟。在 PBS/TX 中洗去盖玻片, 并用同种溶液换洗 3 次, 每次 5 分钟。甩去液体, 加 G/T 溶液, 加盖玻片, 用指甲油把盖玻片四周封住, 置于荧光显微镜下观察。

图版中的照片是实际观察的结果, 很亮的光点是检测到的杂交信号。细胞质已被完全除去。但细胞核的形状保持良好。在果蝇细胞中每单倍体基因组中含有 110 个拷贝的组蛋白基因。本照片是在共焦点激光显微镜(confocal optic microscope)上观察并拍摄的。为了方便说明, 在画面处理时适当提高了背景的深度, 使核的轮廓隐约可见。尽管如此, 从信号与背景强度的比上仍可看出信号十分清晰易辨, 背景中没有任何产生干扰的噪音信号。这一结果足以用于定量分析实验之中。

### E) 荧光原位杂交中需要注意的几个关键问题:

首先操作要干净, 不得有污染。各种溶液和用具都必须事先进行灭菌处理, 操作时不得用裸手触摸载玻片和盖玻片, 不得对着样品讲话等等。各步操作必须严格, 杂交时的反应温度和杂交后冲洗时的条件与探针本身的性质有关, 必须注意。除掉 FISH 中最关键的两个地方是细胞的固定和标记探针的制作。如果细胞固定不当, 核膜上开的孔太小, 则探针难以进入核内。相反, 如果核膜被破坏, 则核内的 DNA 流失, 有可能丢失目的片段。若以 RNA 为目的核酸进行 FISH 时, 则必须保持整个细胞的完整性。固定得体的获得理想结果的一个重要前提。不管是培养细胞还是组织块, 在固定时都要首先以探针的进入和与目的核酸杂交的方便为目的。同样, 标记探针制作不当也

不能获得理想的结果。最常见的问题是标记探针 DNA 分子过大,不易通过核膜进入核内,因此 FISH 中使用的探针一般要小。如探针为双链标记,较大的探针 DNA 则容易与互补链退火,有时会造成 A 段的头部与 B 段的尾部部分退火而结合起来, B 段的头又会与 C 段的尾退火……,这样缠绕在一起就更难进入细胞核内了。如果使用双链探针结果不够理想的话,那么就应当尽量制备单链探针。由于单链探针不存在互补链,因此不会互相缠绕,是最理想的探针。

### 三、FISH 的应用

前面介绍了在果蝇细胞中检测组蛋白基因的实例。FISH 法的应用在原理上都是与此相同的。例如我们可以在染色体标本上用 FISH 法对基因进行定位。由于染色体标本已不存在核膜的障碍,因此杂交的方法更为简单,但是对于不同的组织和不同目的基因,还需要加以具体操作的探索。

在目前盛行的转基因工程中, FISH 也是检查转移结果和所转基因是否表达的最直观简便的方法之一。它可以检查所转基因是否存在于受体细胞的核内,是否整合到了染色体上,是在哪一条染色体上等等。此外,如果用适当的 cDNA 链作为模板制作探针,那么利用这种探针就可以在细胞中检查目的 RNA 的存在与否并推测相应基因的转录情况。当然这时有必要先用 DNA 分解酶把 DNA 分解掉。FISH 法还可以用于细胞组织中的病毒检测。首先用病毒的核酸为模板制作标记探针,然后用这种探针在细胞或组织中进行荧光原位杂交来检测病毒的感染情况<sup>[3]</sup>。FISH 的灵敏度非常高,它可以检测到单拷贝的基因<sup>[4]</sup>。

近年来显微镜和微机画面处理性能方面都有了很大发展<sup>[5,6]</sup>,它们的结合使得 FISH 的应用前景更加广阔。使用共焦点激光显微镜可以把发荧光的 FITC 信号数字化,并在联网的计算机上进行定性定量分析,还能合成平面或立体的图形进行三维分析。笔者等通过多参数测荧光强度的方法对果蝇细胞核内组蛋白基因

DNA 进行定量,以此推测该 DNA 序列的复制时期<sup>[7]</sup>。

可以预想,今后 FISH 法将在更多的基础和实用研究以及医学诊断领域中扮演越来越重要的角色。

### 摘 要

荧光原位杂交(FISH)法是直接从组织或细胞中检测特定 DNA 或 RNA 的最有效方法。整个操作过程为:1)制备探针;2)细胞或组织显微镜标本的制作;3)原位分子杂交;4)荧光免疫检测;5)显微镜下观察。其中以1),2)步最为关键。FISH 法的最大特点是灵敏度高,并可以进行定量分析。FISH 法可应用于染色体上的基因定位,基因表达的检测,病毒感染的检查,特定核酸序列在细胞内的空间分布分析以及核酸复制过程中的定量分析等许多领域的实验中。

### 参 考 文 献

- [1] Molecular Cloning, A laboratory manual. 2nd edition, ed. by Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [2] In situ ハイブリグイゼンシ 1898. 手法, 中根一穂著, 学際企画出版, 1989.
- [3] Barbara, J. T., 1991, *TIG*, 7: 149—154.
- [4] Trask, B. J., and Hamlin, J. L., 1989, *Genetics & Development* 3: 1913—1925.
- [5] Laura, M., and Jonathan, B., 1988, *Chromosoma* (Berl), 96: 397—410.
- [6] Pinkel, D. et al., 1989, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LI: 151—157.
- [7] Ma, H.-F., and Shinomiya, T., 1990 *Mitsubishi Kasei Institute of Life Science Annual Report*, 19: 87

### (上接第38页)

大会期间,新产生的中国细胞生物学学会第五届理事会确定了理事分工,由王亚辉任理事长,翟中和、左嘉客、贾敬芬、薛绍白、郝水任副理事长,徐永华任秘书长,周郑任副秘书长,常务理事除上述几位外,还有白永延、李文安、宋今丹、陈瑞阳、杨弘远、杨抚华、黄祥辉、汤雪明、毛树坚、黄立、张小云。大会期间还确定了9个专业委员会的人员组成,原动物生物学、细胞生长与分化这两个专业委员会人选尚待进一步落实。经常务理事会讨论决定,我会93至95年度会费标准定为每年4元,三年共12元一次付清,93年开始通知征收。理事会还确定《实验生物学报》1993年第4期作为庆祝我会荣誉会员、前任理事长、学部委员庄孝德教授80寿辰专辑。会议期间,理事会还就筹措学会经费、推荐第二届 APOCB 大会中方报告人、改进期刊工作、筹备海峡两岸细胞生物学会议等问题进行了讨论。

(中国细胞生物学学会秘书处)