

- Soc. Chem. Commun.*, 517—518.
 [32] Lander, L. M. et al., 1995, *Langmuir*, 11,
 375—376.
 [33] Tabata, Y. et al., 1997, *Jpn. J. Cancer
 Res.*, 88:1108—1116.
 [34] Cataldo, F., 1994, *Carbon*, 32, 437—443.

荧光原位杂交技术及其应用

陈乐真 张杰*

(解放军总医院病理科 北京 100853 *上海市第五人民医院病理科 上海 200240)

荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)是近年来生物学领域发展起来的一项新技术。其运用细胞遗传学和分子生物学的原理,作为细胞生物学和分子生物学之间的桥梁,已被广泛用于遗传疾病、肿瘤研究及临床诊断和治疗监测,有着广泛的应用前景。FISH 技术问世于 70 年代后期,曾多用于染色体异常的研究,近年来随着 FISH 所应用的探针种类的不断增多,特别是全 Cosmid 探针及染色体原位抑制杂交技术的出现,使 FISH 技术不仅在细胞遗传学方面,而且还广泛应用于肿瘤学研究,如基因诊断、基因定位等。原有的同位素原位杂交技术存在着较多缺点,诸如每次检测均需重新标记探针、已标记的探针表现出明显的不稳定性、需要较长时间的曝光时间和对环境的污染等。与之比较 FISH 则具有①操作简便,探针标记后稳定,一次标记后可使用二年。②方法敏感,能迅速得到结果。③在同一标本上,可同时检测几种不同探针。④不仅可用于分裂期细胞染色体数量或结构变化的研究,而且还可用于间期细胞的染色体数量及基因改变的研究。本文就 FISH 技术特点及其应用作综述。

一、FISH 的技术特点

FISH 选用的标本可以是分裂期细胞染色体也可以是间期细胞。间期细胞可以是冰冻切片,也可以是细胞滴片或印片。生物素(Biotin),地高辛(digoxigenin),dinitrophenyl

(DNP),aminoacetyl fluorene(AAF)等均可用于探针标记。前两者较为常用,通常采用切口平移法(Nick translation)或随机引物法(Random Primer)对探针标记。在已知探针 DNA 结构及序列情况下也可采用 PCR 或 RNA 逆转录法标记探针。通常用于 Biotin 标记的探针应大于 1000bp 以上,这样标记易成功,这是由于 DNA 中 dTTP 含量 <20%, 小于 1kb 以下的探针,不易标记成功。对较小的探针可采用 PCR 技术来标记。如探针是具有重复序列的 DNA 或粘粒、YAC 探针,在杂交液中加上用超声断碎的人体胎盘组织 DNA 或 CotDNA,以阻断探针和染色质之间非特异性的结合。荧光信号在高压汞灯产生的短波激发光下常引起荧光信号淬灭,为防止淬灭的发生,可将 DAPI 或 PI 稀释于 P-phenylenediamine 的甘油缓冲液中^[1]。任何荧光显微镜均可用于观察 FISH 信号,但对单拷贝探针的信号需要质量较好的荧光显微镜。如采用双色或多色滤光片可以同时观察 FITC、Texas-Red 等多种颜色的 FISH 信号,不论是染色体还是单拷贝基因的 FISH 信号均可用高度敏感和高分辨率的彩色胶片摄取,也可通过 CCD(charge coupled device)的照相系统或 Laser scanning confocal imaging system(激光扫描共焦成像系统)将摄取的信号储存在计算机内,经软件处理后,将信号显示在荧光屏上。由于有多种方法标记 DNA 探针,故一次杂交可以同时观察多个探针的信号,如两个不同的探针分别用 Biotin 和 Digoxigenin 标记,杂交后用 avidin-FITC 和抗-Dig-Texas-Red 分别

与探针上的 Biotin 和 Digoxigenin 结合,应用双色滤光片,在显微镜下就可以同时看见带有绿色荧光的 FITC 和红色荧光的 Texas-Red 信号。同理,采用三种或三种以上不同的半抗原,如 Biotin、Dig 和 DNP 等标记探针,然后用多种不同颜色的荧光素,如 FITC(绿色),罗丹明(红色),AMA 或 Cascade Blue(蓝色)等结合抗体进行检测,可同时得到多种不同颜色的荧光信号,如采用不同的排列组合,最多可同时检测 7 种不同的探针^[2]。由于常规的荧光显微镜的照像系统,彩色胶片不易多次曝光,限制了这种联合标记探针的应用,使用 Digital Imaging Camera System 或 CCD 照像系统,先分别多次摄取灰色的影像并储存在计算机内,而后冠以人的颜色,运用软件系统融合各次得到的影像,最终形成一个复合的多颜色的图像^[3]。此外,对已做过 G 显带的染色体片子用 75% 酒精或甲醇褪色后,可再做 FISH,这样可更清晰的辨认各条染色体及染色体结构异常(包括某些复杂的易位,插入,倒位等)。FISH 和 G 显带技术结合不仅可以用新近 G 带处理过的片子,而且还可用陈旧的 G 带片子。因此,FISH 技术可成功的帮助细胞遗传学家做出回顾性分析。

二、FISH 的应用

FISH 的应用日渐广泛,本文旨在三个常用方面简述如下:

1. 细胞遗传学的研究

染色体 X、Y、21、18 和 13 的数量变化常与先天性疾病有关。采用染色体着丝粒重复序列 DNA 作为探针,可以确定分裂细胞或间期细胞这些染色体的数目。如采用 21 号染色体的涂抹(painting)探针,根据标记区域的大小可检测出 Down 氏综合征的发生^[4]。

实体肿瘤的染色体研究比较困难,这是由于获取足够量的分裂期肿瘤细胞比较困难。使用染色体着丝粒特异探针,对间期细胞进行染色体数量变异分析,可获得较好的结果^[5]。因此

FISH 技术十分有助于肿瘤细胞遗传学的研究。Hopman 采用 FISH 技术研究膀胱癌,发现 9 号染色体的丢失是膀胱癌早期恶变的一个标记。而且,随着疾病进展,有额外的 1 号染色体出现,同时常有四倍体改变^[6]。Dekken 研究胃癌时发现多数胃癌细胞呈现多倍体改变,而且伴有 Y 染色体丢失。FISH 检测的结果与流式细胞仪分析的结果完全一致。Waldman 等发现染色体数目的改变和肿瘤的分化及分期有着密切关系,如 7 号染色体增加常见于有较高的 Brdard 分级和有较高 PCNA 标记指数的晚期、恶性度高的肿瘤。Waldman 认为这一现象可能涉及到 7 号染色体上某些特殊基因的表达增加或被抑制。采用多种染色体探针,以不同的颜色标记,更适合于实体肿瘤细胞染色体数目改变的异质性研究^[7]。

对于 G 或 Q 显带难以确定的染色体结构改变,运用 FISH 技术可以帮助解决。许多不能归类的标记染色体,FISH 技术可以确定畸变的来源,如 Miura 等报告 21 例非小细胞肺癌(NSCLC)的染色体改变,其中一例有 2 个标记染色体,用 FISH 检测后证实是来自 9 号染色体的短臂^[8]。染色体上微细带的丢失,普通显带常不易发现,用特定的基因探针检测时,在正常应该有荧光信号的部位如不出现信号,表示有染色体的丢失。Lux 等用 Ankyrin 基因作探针,检测遗传性球形红细胞增多症病人的染色体和间期细胞,发现有这个基因的缺失。Taguchi 等采用靠近 3p21 带附近的 6 个不同位点的探针,比较异常和正常 3 号染色体,确定胸膜间皮瘤有 3p21 带的缺失并推测这个区域可能存在重要的抑癌基因,为进一步的分子生物学研究提供了重要线索。选择按一定顺序排列的基因探针,可以帮助确定染色体倒位,尤其是臂间倒位的性质,如急性白血病有 16 号染色体的倒位,选择两个分别位于断裂点近端和远端的粘粒探针,同时用 16 号染色体着丝位探针,正常细胞荧光信号的次序是:粘粒-粘粒-着丝粒,而白血病细胞的信号的次序改变为粘粒-着丝粒-粘

粒。

杂交细胞通常是含有单个人类染色体的啮齿动物细胞。这种杂交细胞常用于绘制基因图谱或生产单个染色体特异 DNA 库。杂交细胞在培养过程中, 人体染色体极易丢失或发生染色体重排, 因此, 需要对杂交细胞定期进行细胞遗传学检查, 采用人体组 DNA 作为探针或相应人体染色体涂抹探针, 可以很方便的检测这些改变。

2. 基因图谱的绘制

采用 FISH 技术, 不仅可以直接确定某一 DNA 链在染色体上的位置, 而且应用多种颜色荧光素标记探针, 还提供了一个简单的确定基因顺序的方法。可用不同颜色荧光素标记两个不同的 DNA 链, 而且他们在染色体上的距离大于 1Mbp 时, 可以依据不同探针信号的排列关系分辨他们在染色体上的顺序。采用 5-Burd 处理的细胞, 可以获得高分辨显带的染色体, 从而增加 DNA 链标记到染色体上的分辨能力。如果使用间期细胞, 两个 DNA 链的距离可以缩短至 50Kbp, 这个间距是染色体上的分辨距离的二十分之一。不同探针的次序可以通过测量其在间期细胞的距离来确定。

确定 DNA 链在染色体上精细位置, 适应于检查某些特殊的染色体易位和缺失, 如涉及 11 号染色体 q23 的易位常见于急性白血病 t(4;11) 见于急性淋巴细胞白血病(ALL), t(6;11), t(9;11) 见于急性粒细胞白血病(AML), t(11;19) 见于急淋和急粒两种白血病。

标记同一 DNA 链与不同种属细胞的染色体杂交, 可以找出不同种属之间的同源基因以及基因在染色体上的位置, 从而了解种属之间的进化关系。

3. 基因扩增的检测

DNA 扩增通常表现为异常的显带区域(ABRS)或异染色质区(HSRS)以及无着丝微小体(DM), 这些基因扩增的细胞遗传学表现出现在许多恶性肿瘤中。搞清楚肿瘤细胞中特定 DNA 链(基因)的扩增, 有助于了解肿瘤的

恶性增生过程。在肿瘤细胞中某些肿瘤基因(Oncogene)的扩增, 可作为预测肿瘤进展及预后的临床指征。如乳腺癌细胞中 Her-2-neu 基因的扩增常预示着患者预后较差。在 FISH 技术之前的所有测定基因扩增的方法, 都是采用经典的分子生物学方法(South blotting 等), 但这些方法与 FISH 相比, 不仅费时费力, 而且也不可能在细胞水平上观察到基因扩增的状态。FISH 技术的最大优点是可以在间期细胞核上观察到 DNA 扩增的直接证据, 而且间期细胞核所显示出的扩增 DNA 荧光信号其数量多少及荧光强度常与 DNA 扩增的水平有关^[9]。FISH 能有效地在染色体上定位扩增的特定 DNA, 特别是当细胞遗传学发现有 HSR 或 ABRS 时, 可根据 HSR 和 ABRS 来源及位置, 推测可能扩增的肿瘤基因, 从而有目的检测某些基因, 并能很快得到直接清晰的基因扩增的信息。Cherif 等在结肠腺癌细胞中, 采用 FISH 技术发现 C-myc 的扩增, 而且 C-myc 扩增链是重排在 19 号染色体的长臂上。染色体上微细带的丢失, 普通显带不易发现, 用特定的基因探针检测时, 在正常应该有荧光信号的部位如不出现信号, 表示有染色体的丢失。用 Ankyrin 基因作探针, 检测遗传性球形红细胞增多症病人的染色体和间期细胞, 发现有这个基因的缺失。有学者用 FISH 技术在 37 例 B 细胞淋巴瘤中发现 21 例(56.8%)存在 6q23-24 的缺失, 故认为这一改变对淋巴瘤诊断有实际应用价值^[10]。

摘要

荧光原位杂交技术(FISH)始于 70 年代后期, 曾多用于染色体异常的研究, 近年来随着 FISH 所应用的探针种类的不断增多, 特别是全 Cosmid 探针及染色体原位抑制杂交技术的出现, 使 FISH 技术不仅在细胞遗传学方面, 而且还广泛应用于肿瘤学研究, 如基因诊断、基因定位等。本文对 FISH 探针标记、信号处理等有关技术特点以及在细胞遗传学研究、基因图谱绘制、基因扩增检测等方面的应用做了具体的

综述。

参考文献

- [1] Speleman F, et al., 1991, *Cytogenet Cell Genet*, **56**:14.
- [2] Vanni R, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, **18**:155.
- [3] Sonoda G, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, **18**:115.
- [4] Kolvras S, et al., 1991, *Clinical Genetics*, **39**:278.

- [5] 张杰等, 1997, *中华病理学杂志*, **26**(6):356.
- [6] Hopman A. H. N, et al., 1991, *Cancer Research*, **52**:644.
- [7] Waldman F. M, et al., 1991, *Cancer Research*, **51**:3807.
- [8] Zhou J. Y, et al., 1993, *Cancer Genet Cytogenet*, **69**:1.
- [9] 张杰等, 1997, *中华病理学杂志*, **26**(1):46.
- [10] Zhang Y, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, **18**:310.

研究工作

P-gp 和细胞容积调节

陈丽新 王立伟

(广东医学院生理教研室 湛江 524023)

细胞容积调节对细胞代谢、分泌、增殖等功能有着广泛的影响。近年来,人们对细胞容积调节进行了广泛、深入的研究,但其调节机制目前尚不清楚。资料表明,MDR1^[1]、pI_{ch}^[2]、CIC-2^[3]、CIC-3^[4]等基因可能与细胞容积调节有关。MDR1 基因产物 P-gp (P-glycoprotein) 在眼睫状体非色素上皮 (NPE) 细胞容积调节中的作用如何仍未确定。本研究用基因阻抑技术 (Antisense knock-down Technique)^[5] 阻断 NPE 细胞的 MDR1 基因表达后,细胞容积调节受抑制,表明 MDR1 基因与细胞容积调节有关。

材料和方法

1. 细胞分离和培养

睫状体上皮细胞分离和培养的方法见文献^[6]。从当地屠宰场获得新鲜牛眼,分离出睫状体尖部,胰酶 (0.25%) 消化 30—40min, E199 (Sigma) 培养液吹吸,离心、漂洗二次。细胞悬液接种在 24 孔培养板中的玻片上,用含 10% 小牛血清的 E199 培养液,置于 37℃ 孵箱中培养 14—18h 后,更换培养液,按不同组别分别进行处理。

2. 反义寡核苷酸处理细胞

高压液相层析法提纯的两种 MDR1 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide) 由 Severn Biotech Ltd (UK) 合成。其中鼠源 MDR1 反义寡核苷酸 (简称鼠反义 MDR1) 与小鼠 MDR1 基因^[7] mRNA 起始码区 (第 101—115 碱基) 互补 (5' CTC CAT CAC CAC CTC 3'), 人源 MDR1 反义寡核苷酸 (简称人反义 MDR1) 与人类 MDR1 基因^[8] mRNA 起始码区 (第 416—430 碱基) 互补 (5' ATC CAT CCC GAC CTC 3')。为降低反义寡核苷酸对核酸酶的敏感性,减少反义寡核苷酸分解,两种 MDR1 反义寡核苷酸的两端头三个碱基加上保护基团硫代磷酸脂 (phosphorothioate)。为促进细胞对反义寡核苷酸的摄取,在反义寡核苷酸中加入阳离子脂质体 Lipofectin 20mg/L (Gibco BRL, USA)。

新鲜分离的细胞培养 14—18h 后,吸弃培养液,对照组用 E199 培养液继续培养 48h,各处理组用含药物的 E199 培养液继续培养 48h,然后进行 P-gp 免疫荧光标记和测定,或测量细胞在低渗液刺激下容积的改变。各处理组如下: Lipofectin 组 (Lipofectin 20mg/L); 鼠反义 MDR1 组 (Lipofectin 20mg/L 加 200mg/L 鼠反义 MDR1); 人反义 MDR1 组 (Lipofectin 20mg/L 加 10, 50, 100 或 200mg/L 人反义 MDR1)。

3. P-gp 免疫荧光测定

为了解反义 MDR1 作用后 MDR1 基因被阻抑的程度,用免疫荧光法检测 MDR1 基因产物 P-gp 的水