

荧光标记的染色体原位杂交及其在人类基因组研究中的应用*

吴学军 柴建华

(复旦大学遗传所, 上海 200433)

摘要 FISH 技术是 80 年代开始发展起来的一种新的定位技术, 在人类基因组研究中得到了广泛的应用. 通过中期染色体的 FISH 可以进行 SCP, Cosmid 和 YAC 的染色体定位, 嵌合克隆的鉴别; 通过间期核的 FISH 可以在 50kb 的分辨率下进行基因作图; 最新的研究进展已可以进行伸展的染色质丝 (chromatin fibre) 的 FISH, 直接测量基因的长度, 从而达到高精度基因作图的目的. 总之, 随着 FISH 技术本身的发展, 它将在人类基因组研究中发挥更大的作用.

关键词 FISH, 人类基因组研究, 染色体定位, 基因作图

荧光标记的染色体原位杂交技术提供了一种快速而有效的手段, 将 DNA 片段和特定的真核生物细胞的染色体区带联系了起来, 并将这些 DNA 片段排序, 这是研究 DNA 顺序在染色体上位置的最直接的方法. 最早, 人们根据 Gall 和 Pardue 在 1969 年的工作^[1], 于 70 年代, 建立起了同位素原位杂交技术, 但当时只是用于 DNA 顺序在多线染色体上的定位或是重复顺序在中期染色体上的定位. 1981 年, Gerhard 和 Harper^[2,3]等首先证明有可能将从个体基因中得到的单拷贝顺序 (SCP, single copy probe) 通过同位素原位杂交技术定位到中期染色体上. 在此基础上, 80 年代初起, 荧光标记的原位杂交技术开始起步并得到运用且不断地发展起来.

1 FISH 技术简介^[4,5]

FISH 技术包括下列几个步骤: a. 探针的准备和标记; b. 探针和染色体的杂交; c. 信号检测; d. 杂交信号与分带染色体的比较.

1.1 探针的准备 探针的标记有两种. 直接标记法是将荧光分子直接掺入到探针分子中, 以前这种方法用得不多, 由于有背景少的优点, 近来在一些公司的试剂盒中得到应用.

常用的间接法是将一些类似于半抗原 (hapten) 的标记分子掺入探针分子中. 用的较多的试剂有生物素, 地谷新 (digoxigenin), 二硝基苯 (dinitrophenyl, DNP), 氨基乙酰芴 (aminoacetylfluorene, AAF), 汞和磺酸盐 (sulfonate).

就掺入方式来说, 生物素, 地谷新等是以核苷酸衍生物的形式掺入的, 可用切口平移法来进行的. 现在更多的人开始用随机引物法. 用这两种方法标记好的探针大小在 200—500bp 范围内, 是用于杂交的最佳大小. 另外, 也可以在已知顺序的两个引物之间用 PCR 法来扩增, 或从合适的载体上通过 RNA 转录而来.

1.2 探针和染色体的杂交 最佳杂交条件取决于探针和目标的性质. 已标记好的变性的探针 (200—500bp) 与变性的染色体在含有甲酰胺, 盐和硫酸葡聚糖的杂交缓冲液中杂交过夜. 接着是柔和的洗涤, 以去除未杂交或错配对的探针.

1.3 信号的检测 在洗去未杂交和错配对的探针分子之后, 载片培养在免疫荧光试剂中, 使

* 国家自然科学基金和“863”计划资助项目.

收稿日期: 1994-02-15, 修回日期: 1994-05-19

其在探针杂交的位置上产生荧光信号, 偶联了荧光素分子的抗生物素蛋白被用来标记已掺入到探针分子中的生物素。地谷新, 二硝基苯, AFF 和磺酸盐则可以用相应的标上了荧光素的抗免疫球蛋白来标记。

最常用的荧光素分子有 FITC, rhodamine 和 Texas Red 等。

1.4 分带和信号定位 染色体的分带可以在杂交前, 也可以在杂交后。高分辨的染色体标本是取得好的带形的基础。常用的分带方法有: G (giemsa) 带、Q (quinacrine) 带、R (reverse) 带, 包括色霉素 chromomycin A₃/偏端霉素 distamycin A 法; hoechst33258/propidium iodide [3, 8-二氨基-5-[3-(二乙基-甲基氨)丙基] 6-苯菲碘] 法; DAPI [DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl] /propidium Iodide 法, 染色体的分带也可以直接用 Alu LIHs (LI homo sapiens) 或 Alu 之间的顺序和染色体杂交而得到类似 R 带的条带。更多的人在努力使杂交信号和分带可以同时显微镜下看到。

由于杂交和分带同时进行效果不佳, 有人采用 FL (fractional length) 来测量。以杂交信号相对于某固定位置 (如端粒) 的长度占该染色体长度的比例来表示。

在不分带的情况下, 特定的染色体可以通过着丝粒特异, 或端粒特异的探针进行共杂交来确定。复杂的探针族, 如从一个染色体特异的 DNA 文库中得来的克隆, 可以用来修饰和确认染色体, 称为染色体绘图。

影响杂交结果的参数有下列几个: 探针浓度, 杂交时间, 探针大小, 杂交温度, 染色质变性条件, 染色体的制备和硬化程度, RNase 作用条件, 用于降低背景的非特异性竞争 DNA 和醋酸酐处理。其中有几个因素影响杂交信号的强度和特异性, 具体的讲是 DNA 探针的纯度; 用于杂交反应的探针的大小。小心掌握好这些条件, 我们就能得到没有荧光背景的特异性信号。

FISH 的结果还有一个重要的方面, 就是

分辨率的问题。影响结果分辨率的因素有两个, 染色体上的特定位置和染色体的浓缩程度。着丝粒和端粒的变化比其他的染色体位置的变化要多, 在分析结果时就比较容易辨认。特定的染色体结构在其杂交结果的分辨率上起着重要的作用。制备染色体较伸展状态的展片, 如早中期染色体或中期染色体, 将会得到较高的分辨率。另外, 光学系统的进步也是提高分辨率的有效手段。

2 FISH 技术的优点

FISH 技术和同位素原位杂交相比, 有着许多的优点。

首先, 从探针的制备杂交来看, 生物素和其他标记分子没有放射性, 标记过程和杂交过程没有污染的危险, 比较安全。且用生物素或其他的标记分子标记好以后的探针分子相当稳定, 没有半衰期的限制, 可以长期保存。荧光显色时间短, 不象同位素杂交要求长时间曝光。背景简单, 灵敏度也不逊色。

另外, FISH 可以用多种颜色同时显色, 这是同位素杂交不可比拟的。这种多色作图, 可以使染色体分带和探针信号显不同的颜色而同时观察; 也可以用不同荧光标记不同的探针, 以确定探针在染色体上的相对位置。

间期核作图也是 FISH 的一个特色^[10], 因为它常常是和多色技术结合在一起的。中期染色体的 FISH 的分辨率大约为 1Mb, 而间期核作图的精度为 50kb。这一精度的变化使 FISH 有可能直接用于基因作图。可以说间期核作图技术是遗传研究和脉冲电泳结果的桥梁。与遗传图谱不同, 它不依靠多态性标志和大的家系; 也不象脉冲电泳后的稀切点酶物理图谱分析, 它不依靠稀切点酶位点的存在和甲基化程度, 并且不受 CpG 岛出现频率的影响。它的原理是间期核上 DNA 顺序间的距离与线性 DNA 分子上该两个顺序间的距离呈对应的线性关系。由于这些原因间期核作图可以作为遗传作图和物理作图分析的辅助结果来构建染色体亚区的基因图。间期细胞原位杂交还可用于

不能制备中期染色体的细胞的研究,如肿瘤细胞和非周期细胞。

信号扩增也是 FISH 所特有的。为了使杂交信号足够强,可以进行信号扩增。扩增的方法是加上一层荧光标记的标记分子的抗体,再加上一层偶联了标记分子的抗抗体,然后再加一层荧光标记的标记分子的抗体,形成三明治结构。以生物素标记为例,在加荧光标记的抗生物素蛋白 avidin 之后,加一层山羊生物素标记抗-抗生物素 D,然后再加一层荧光标记的抗生物素蛋白。

用于人染色体作图的典型探针是 cDNA 或克隆的基因组 DNA 片段,大多数的 cDNA 由单拷贝顺序组成,SCP 由单拷贝的基因组顺序组成。而大多数的克隆基因片段中除了单拷贝顺序外还有插入重复顺序 (interspersed repetitive sequence, IRS),如 Alu,据分析每 3—5Kb 就有一个 Alu 顺序。所以在用 cos 质粒和 YAC (yeast artificial chromosome, 酵母人工染色体) 做为探针时,就会有一些重复顺序干扰单一顺序产生特异性信号。通常将标记好的探针片段变性,与过量的非标记的竞争 DNA 一起复性,常用的有人总 DNA 或 Cot1 DNA。这时探针中的 IRS 就很快地与竞争 DNA 中的 IRS 结合,剩下的是已标记了的单拷贝顺序,所看到的染色体上的杂交信号就表明是单拷贝顺序所在的位置,这一过程在 FISH 中叫做抑制性杂交。抑制性杂交的使用使 FISH 的应用更加广泛,并可能在人类基因组的研究中发挥其作用。

3 FISH 在人类基因组研究中的应用

FISH 作为确定基因片段在染色体上位置最直接的方法,在人类基因组研究中的应用日益广泛深入。所研究的基因片段通常克隆在质粒, phage, cosmid 和 YAC 中,可以用 FISH 技术知道其在分带染色体上的位置,也可以以此手段进行某种遗传病的诊断。

3.1 SCP (single copy probe) 的定位 SCP 的定位是染色体骨架图构建的主要内容之一。当

SCP 用生物素标记之后,与中期染色体杂交,用免疫荧光标记的试剂检测,就可以明确地知道某个 SCP 在做好分带的中期染色体上的位置。SCP 的定位是应用 FISH 技术进行人类基因组研究中的最简单的一种。但是太小的片段在实际工作的难度较大。FISH 不仅可使 SCP 可以直接定位于染色体上,也可以定位于间期核,为高分辨的基因作图和核组织分析提供了有力的手段。

3.2 Cos 质粒的定位 cos 质粒的克隆容量约为 35—45kb,在 FISH 刚开始应用时这大小是很适合于做探针的,在使用抑制性杂交之前,是先分离 cos 质粒的插入片段中的单拷贝顺序^[6],然后才进行杂交。应用了抑制性杂交步骤之后一切就方便多了^[7]。1992 年 Fan^[8]报道了他们 50 个 cos 质粒克隆用 FISH 定位到了染色体上的结果。其中 38 个在 X 染色体上分布于长臂或短臂上,另外 10 个分布于中心粒上。这些结果促进了 X 染色体的作图,同时分布于 X 和 8 号染色体的中心粒上的那些 cos 质粒,将有利于这些区域的结构和组成的研究。1990 年, Lichter^[9]等人报道,运用数字图像技术分析 cos 质粒为探针的 FISH 结果,所用的染色体是早中期染色体,结果和杂交细胞株系列的结果一致。当 3 个或 3 个以上的 cos 质粒同时杂交时,可以得出它们在染色体上的顺序。1991 年, Trask^[10]报道,将 2 个或 3 个 cos 质粒经两种不同颜色的荧光标记之后,与间期核进行杂交,由此排出了 7 个 cos 质粒的顺序,精度在 50kb。

3.3 YAC 的定位和 YAC 重叠群 (contig) 的构建 YAC 的容量比起 cos 质粒来就更大了,最大的可达 ~2Mb。定位 YAC 的方法有三种。有些探针在染色体上的位置已知(可以用 FISH 来定位),而又可以肯定它在某个 YAC 中,那么这个 YAC 在染色体上的位置就确定了;YAC 也可以直接进行 FISH。先抽提酵母的 DNA,然后脉冲电泳分离出 YAC 的插入片段,用此插入片段进行 FISH;现在 PCR 技术越来越成熟,可以用 Alu PCR 法扩增 YAC 上

的插入部分, 将 Alu PCR 产物来进行 FISH. 在多个 YAC 分别定位的基础上, 或根据几个 YAC 经多色标记后同时与染色体杂交后的结果, 可以按 YAC 间的相对位置来构建 YAC 重叠群. 所得的结果可通过一个 YAC 经标记后与 YAC 库内的其它 YAC 进行杂交的结果来验证. 1991 年, Montanaro^[11] 报道, 他们用 FISH 的方法定位了 102 个 YAC. 这些 YAC 覆盖了 Xq24—Xq28 的 50% 的区域. 他们定位的精度是 0.5 带, 所以这 102 个 YAC 就分布在 9 个区段内 (半条带为一个区段). 这些结果综合起来为 YAC 重叠群的构建提供了一条道路.

YAC DNA 的 FISH 不仅可以为构建 YAC contig 提供数据同时也可以用这一方法来检测 YAC 中的嵌合 (chimeric) YAC^[12]. YAC 克隆可以克隆大片段的 DNA, 但是随之也带来了缺点, 其中主要的一点就是嵌合 DNA 的出现. 在染色体上处于不同位置的 DNA 片段, 在克隆过程中相互连接或转化过程中同源重组, 克隆进了一个 YAC, 应用 FISH 就是可以发现一个 YAC 经标记荧光后原位杂交可以在一个以上的染色体区域产生特异性信号. 这是发现嵌合 YAC 的最简便而直接的方法. 这对于人类基因组的研究有很重要的意义.

定位一个克隆片段在染色体上的位置的另外一个方法是探针与杂交细胞株系列 (Somatic cell hybrid Panel) 进行杂交, 因为各个细胞株所含的人染色体区段不同, 杂交结果就可以说明克隆片段在染色体上的位置. 研究结果表明 FISH 定位的结果和杂交细胞株系列的结果一致. 在今日, FISH 技术日趋成熟. 精度越来越高的情况下, 使用杂交系细胞株系列定位的人越来越少了.

4 FISH 技术的新进展

1993 年 9 月, 美国德克萨斯州癌症治疗和研究中心的 Parra 和 Windle^[13] 报道了迄今为止精度最高的 FISH. 这是一种新的作图方法, 在这一技术中, 双链 DNA 完全伸展并依附在

载片上, 与生物素或地谷新标记的探针杂交之后, 用荧光抗生物素蛋白或其它抗体检测 DNA 探针在伸展的 DNA 链上的分布是可见的, 并可以用荧光显微镜记录下来. 从这一图象, 可以作出一图谱, 称为直视杂交 DNA 图谱 (direct visual hybridization DNA Map, DIRVISH). 这一作图技术遵循这样一个原理, 一个小的 DNA 区域 (假定为 5kb), 当它伸展到一定的长度时, 这是可以在显微镜下看见的. 基于这样的数据: 对于完全伸展的双链 DNA 来讲, 每对碱基所占的长度为 0.34nm, 那么 5kb 的 DNA 长度为 1.7 μ m, 一个 40kb 的 cos 质粒将占 13.6 μ m, 一个 500kb 的 YAC 将占据 170 μ m. 在制备载片时, 先将细胞固定在载片的一端, 然后用去污剂消化, 让溶液中的 DNA 动态地流到另一端, 就得到了伸展的 DNA 双链, 结合常规 FISH 就可以得到 DIRVISH 图. 这篇文章报道了他们在两天内做出的一个结果, 一个跨度为 200kb, 含有五份拷贝的扩增的二氢叶酸还原酶基因的图谱.

在进行与疾病有关的某个基因片段的 FISH 时, 除了与中期染色体杂交外, 还以肿瘤细胞为材料. 在美国, 有人成功地进行了单个细胞的 FISH 和单个精子的 FISH. 更有甚者, 将试管中的八细胞胚胎上的一个细胞取下做 FISH, 再把七细胞胚胎植入体内.

除了在人类基因组研究中的应用之外, FISH 在其他方面也大有用武之地.

如病毒检测, 应用 FISH 方法可以了解细胞内的病毒是否已整合, 如果整合了其取向如何, 拷贝数目多少^[14].

定量分析. 用于研究表达. 如 mRNA 在细胞中的分布及量的多少. 更大而言之, 可以用此方法检测和定位某一特定核酸在组织, 细胞和基因组中的分布^[15].

在细胞分裂过程中, 异质性及其产生机制也可以用此法来研究^[16].

荧光标记的原位杂交作为一项技术已经成熟, 但是它也是在不断发展的, 其应用范围也在不断扩大. 随着杂交试剂的商品化, FISH

已成为基因定位的常规而必不可少的手段。在人类基因组的研究中更是越用越多, 现在已发展到这样的情况, 每发表一个 DNA 片段的研究结果或每报道一个基因, 就有一张相应的 FISH 图。1993 年, 在人类基因组研究神户会议上, 有人提出, 要用 24 种不同的颜色来标记 24 条不同的染色体。随着应用的广泛, FISH 也在不断得到发展。人类基因组研究新的五年计划中提出要完全人类基因组分辨率为 100kb 的 STS (sequence tagged sites) 图, 对于完整基因组将需要 30000 个 STS。到目前为止我们还只有 1500 多个, 也就是说还缺少 95% 新的 STS。每个新的 STS 都需要定位数据, 这些数据都需要用 FISH 来完成。

参 考 文 献

- Gall J G, Pardue M L. Proc Natl Acad Sci USA, 1969; **63**: 378
- Gerhard D S, Kawasaki E S, Carter Bancroft F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1981; **78**: 3755
- Harper M E, Ullrich A, Saunders G R. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; **78**: 4458
- Trask B. TIG, 1991; **7** (5): 149
- Korenberg J R, Yang-Feng T, Schreck R. TIBTECH, 1992; **10**: 27
- Landegent J E, N. Jansen in de Wal N, van Ommen G J B *et al.* Nature, 1985; **317** (12): 175
- Landegent J E, Jansen in de Wal N, Dirks R W *et al.* Hum Genet, 1987; **77**: 366
- Fan S S, Sasi R, Lee C *et al.* Genomics, 1992; **14**: 542
- Lichter P, Tang C C, Call K *et al.* Science, 1990; **247**: 64
- Trask B, Mass H, Kenwick S *et al.* Am J Genet, 1991; **48**: 1
- Montanaro V, Casamassimi A, D' Urso M *et al.* Am J Genet, 1991; **48**: 183
- Selleri L, Eubanks J H, Giovannini M *et al.* Genomics, 1992; **14**: 536
- Parra I, Windle B. Nature genetics, 1993; **5**: 17
- Lawrence J B, Villave C A, Singer R H *et al.* Cell, 1988; **52**: 51
- Lawrence J B, Singer R H. Nucleic Acids Research, 1985; **13** (5): 1777
- Callen D F, Mulley J C, Baker E G. Hum Genet, 1987; **77**: 236

FISH and its Application in Human Genome Research. Wu Xuejun, Chai Jianhua (*Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract FISH is a new technique which is used to localize a specific sequence on chromosome. It has been widely used in the research of human genome project. With FISH, a SCP, a cosmid or a YAC can be localized on the metaphase chromosome; and a chimeric YAC can also be identified. Gene mapping can be done at the resolution of 50 kb with FISH on the interphase nuclei. Now FISH of a gene on the stretched chromatic fibre can be done, the length of the gene can directly be measured and the gene can be localized at high resolution. In a word, FISH is playing a more and more important part in the human genome research.

Key words FISH, human genome research, chromosome localization, gene mapping.

定位克隆中寻找新基因的方法

张建之 柴建华

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 在克隆人类遗传病致病基因的过程中, 寻找染色体特定区段的转录序列成为主要的限速步骤。早期的努力集中在筛选 cDNA 文库, 找寻进化上保守的 DNA 序列, 以及 Northern 杂交。最近几年, 在