China).

**Abstract** Proteinase inhibitors are widely distributed in the plant kingdom and associated with the resistance of plant against insects and pathogens. Ingestion of some plant proteinase inhibitors in the artificial diet can retard the growth and development of insects, even cause the insects dead. Transgenic plants of proteinase inhibitors derived from plants definitely show effects of insect-resistance. Insects can reduce the growth and development inhibition by secreting gut proteinases that insensitive to plant proteinase inhibitors existed in the diet. The quantity and quality of food proteins are very important in dictating the anti-nutritional effects of plant proteinase inhibitors on insects. Plant proteinase inhibitors can be induced by the infection of many plant pathogens, and the growth of microorganism isolated from the spoiled tissues can be inhibited by the induced plant proteinase inhibitors. Progress in the roles of plant proteinase inhibitors in the resistant mechanism of plant against insects and pathogens was reviewed.

**Key words** proteinase inhibitors, resistance against insects, resistance against pathogens

# 多彩色荧光原位杂交技术原理及其应用

杨明杰 曹 佳

(第三军医大学预防医学系分子毒理学实验室, 重庆 400038)

**摘要** 多彩色荧光原位杂交是一门新兴的分子细胞遗传学技术, 它用几种不同颜色的荧光素单独或混合标记的探针, 进行原位杂交, 同时检测间期细胞或中期细胞中的几个特异核酸序列, 为分析癌症遗传不稳定性提供了一种简便、快速、可靠的方法, 并广泛应用于物理图谱绘制、致突变研究、肿瘤病理学和产前诊断.

**关键词** 多彩色荧光原位杂交, 染色体描绘, 多彩色原位启动标记, 比较基因组杂交

**学科分类号** Q75

多彩色荧光原位杂交 (multicolor fluorescence *in situ* hybridization) 是在荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 基础上发展起来的新技术, 它不仅具有 FISH 的优点, 而且克服了 FISH 的许多局限, 能同时检测多个基因, 分辨复杂的染色体易位和微小缺失, 区分间期细胞多倍体和超二倍体等, 是一门十分有发展前途的分子细胞遗传学技术. 如果说 80 年代出现的 FISH 及相关技术开创了分子细胞遗传学新天地的话, 那么, 90 年代初期创建的多彩色 FISH 使分子细胞遗传学发展成为了可以研究全细胞周期遗传物质多个靶位的真正意义的分子细胞遗传学. 本文拟简要介绍多彩色 FISH 的技术原理及其在实验研究和临床实践中的一些应用.

## 1 技术原理

多彩色 FISH 与 FISH 都是依据碱基互补原理, 用荧光素直接或间接标记的核酸探针, 在组织切片、间期细胞核及中期细胞染色体等标本上对待测核酸靶进行定性、定位和相对定量分析. 不同的是, 多彩色 FISH 一次杂交即能检测多个靶位, 各靶位在荧光显微镜下和照

收稿日期: 1997-05-23, 修回日期: 1997-09-20

片上的颜色不同，呈现多种色彩，因而被称为多彩色 FISH.

多彩色 FISH 常用的探针可分三类[1]：a. 染色体特异性重复序列探针 (probe to chromosome-specific repeated sequence)：指像 α 卫星、卫星 IIIDNA 一类的探针，它们的杂交靶位常大于 1Mb，不含散在重复序列，与靶结合紧密，杂交信号强，易于检测. 常用于检测间期细胞非整倍体和微小标志染色体. b. 全染色体或染色体区域特异性探针 (whole-chromosome or chromosome region-specific probes)：由一条染色体或其上某一区域的几段不同核酸片段组成，可由克隆到噬菌体 (phage) 和粘质粒 (cosmids) 上的染色体特异性大片段插入文库制取. 还可用微切 DNA 通过 PCR 大量制取[2]，且微切 DNA PCR 文库探针片段小，与邻近区域发生重叠及在制片过程中被破坏的可能性小. 这类探针可用于中期染色体重组和间期核结构分析. c. 特异位置探针 (specific-locus probe)：常由一个或几个克隆序列组成，可由 cDNA 克隆或克隆到大片段插入载体内的核酸片段制取，主要用来进行染色体克隆 DNA 序列定位和检测靶 DNA 序列拷贝数及结构变化.

探针的荧光素标记分为间接标记和直接标记. 间接标记是用生物素标记的 dUTP (biotin-dUTP) 通过缺口平移法标记探针，杂交后再用偶联有荧光素的抗生物素抗体检测. 通过几轮抗生物素蛋白-荧光素、生物素化的抗-抗生物素蛋白、抗生物素蛋白-荧光素的一系列处理，可放大被检信号，检测小至 500 bp 的靶序列[3]. 直接标记是通过荧光素直接与探针核苷或磷酸戊糖骨架共价结合、或缺口平移法标记探针时掺入荧光素核苷三磷酸标记探针. 直接标记的探针杂交后经过简单冲洗就可镜检，省去了间接标记的探针杂交后繁琐的检测步骤，但不能像间接标记的探针那样进行多步骤信号放大，因而不如间接标记的探针灵敏，但靶较大时 (数百 kb)，还是较可靠，且探针标记种数不受高亲和力配基 (high-affinity binding parter) 能力限制[4]，所以直接标记的探针在多彩色 FISH 中应用更广.

用激发光谱和吸收光谱不同的荧光素按一定调色方法标记探针，就可同时分析不同探针对应的靶 DNA. 探针荧光素颜色调配的方法有：a. 非调色法 (color uncoding)：是用 $n$ 种不同颜色的荧光素标记 $n$ 种探针. b. 混合调色法 (combination-coding)：是用 $n$ 种不同的荧光素分别标记 $2^n - 1$ 种探针，如 $n = 3$ 时，用红、绿和蓝三种荧光素把七种探针分别标记为：红、绿、蓝、红+ 绿、红+ 蓝、绿+ 蓝、红+ 绿+ 蓝七种颜色. c. 比例调色法 (ratio-coding)：即用两种以上不同荧光素按不同比例混合标记探针，如用红色和绿色两种荧光素，按红：绿比值分别为 ∞、2、1、0 的比例，把四种探针分别标记为红、橙、黄、绿四种颜色[4]. 这三种调色法中比例调色法只需要极少几种荧光素就可标记多种探针，因而更有发展潜力.

荧光显微镜配有滤光片或相应装置，透过不同滤光片可观察相应探针的荧光，如用透红光的滤光片可看到红色荧光素标记的探针，而看不到绿色荧光素标记的探针，换用透绿光的滤光片则相反；多次曝光可摄制出镜下所见，并能分辨绿色和红色两种荧光素共同标记的探针. 用透红、绿两色光线的滤光片，可同时观察红、绿、红+ 绿色荧光素标记的探针，一次曝光就能摄出镜下所见. 多色滤光片虽简化了观察和照相过程，但所见荧光不如用单色滤光片强，故灵敏度不如用单色滤光片[1]. 比例调色法标记的探针间的颜色，当比值个数大于 5 时，肉眼难以区分，数字成像显微镜 (digital imaging microscopy) 可分析探针发出或吸收光线的光谱组成而把它们区分开，且敏感性高、可视性强、可量化分析和自动化分析，已越来越多地应用于 FISH 信号检测[5]. 共焦显微镜 (confocal microscopy) 可检测悬浮细胞和石蜡切片、冰冻切片上的荧光信号，并有空间分辨力强，可屏蔽共焦平面上下的荧光干扰，只分析共焦平面上图像的优点. 共焦显微镜与数字

成像系统相结合，借助计算机，可实现细胞核层扫描，观察胞核三维结构. 目前共焦显微系统的灵敏性还低于普通荧光显微镜，样品厚度小于焦距长度的切片更适于用普通显微镜观察[1]. 但随着共焦显微技术和数字成像技术的发展，这种情况会有改观，将可实现探针图谱、基因拷贝数、染色体易位、低检出率残留细胞和转移细胞的自动化分析，并可分析基因型和表型间的关系，促进对遗传畸变所致生物学改变的深入认识.

染色体描绘 (chromosome painting)、反转染色体描绘 (reverse chromosome painting)、多彩色原位启动标记 (multicolor primed *in situ* labeling, multicolor PRINS) 和比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 是在多彩色 FISH 基础上发展起来的新技术. 染色体描绘是用全染色体或区域特异性探针，通过多彩色 FISH 使中期细胞特异染色体和间期核呈现不同荧光颜色的条带，从而分析染色体的方法，常用于识别染色体重组、断裂点分布、鉴别染色体外核物质的起源. 反转染色体描绘是用筛选出的畸变染色体与正常染色体杂交来分析畸变染色体的方法，它不仅能区分标志染色体的来源，而且能分辨间隙易位和复杂的标志染色体[6]. 多彩色 PRINS 是用寡核苷酸作为引物，原位 PCR 扩增待测序列，并在此过程中掺入荧光素直接或间接标记的核苷三磷酸，使扩增出的序列都得以标记. 通过几轮这样的扩增，使待检的几个序列的原位扩增产物标记上不同荧光素，实现同时对多个微小缺失和突变等染色体微小改变的检测. 这方法已常规用于检测特异性 α 卫星序列在染色体和间期核内的定位[7]. CGH 是先分离出正常组织和肿瘤组织中的全部 DNA，分别用不同荧光素标记，如正常 DNA 标以红色，肿瘤 DNA 标以绿色，把它们混合后，与待检染色体杂交，如结果呈黄色即为正常，如呈红色则说明有染色体缺失，如呈绿色则说明有对应序列的基因扩增. 它在碱基水平为遗传畸变分析提供了一种基因组指纹印迹 (genomic fingerprint) 检测手段[4,8].

## 2 应　　用

### 2.1 在描绘制物理图谱中的应用

多彩色 FISH 能快速、精确确定杂交后探针在染色体上的位置和探针与染色体带、端粒、着丝粒的相互关系，简化了基因物理图谱的绘制，有助于绘制精细的物理图谱[9]. 对间期核的多彩色 FISH 可确定空间位置紧密相连的探针间的顺序，对原核或染色质较松散的破裂细胞核的多彩色 FISH，可分辨相距小于 100 kb 的探针的顺序[10]. 间期探针顺序检测是对中期图谱和其他分子图谱技术的有力补充.

### 2.2 在致突变研究中的应用

多彩色 FISH 可同时检测染色体结构和数目畸变，尤其是检测染色体复杂易位、微小缺失，并能检测间期细胞和单倍体细胞的染色体断裂、非整倍体和超二倍体发生情况. 如用多彩色 FISH，Jossart 等[11]对乳头状甲状腺癌细胞系 TPC-1 进行了研究，证实该细胞系带有 10q 倒位、t (1; 10; 21) 易位和 10 号染色体 $H_4$ 基因缺失等改变；Rupa 等[12]研究了人间期淋巴细胞的超二倍体发生和染色体在 1cen-1q12 区域的断裂，指出多彩色 FISH 可实现人间期细胞超二倍体和染色体断裂的快速检测，大大简化了致癌剂和遗传毒剂暴露人群的染色体变化的检测. Van 等[13]用多彩色 FISH 同时检测人精子染色体结构和数目异常，一次杂交即可检测三倍体、1 号染色体 p 末端的复制和缺失、涉及 1 号和 8 号染色体的非整倍体等多个项目.

多彩色 FISH 还可用于微核分析，用某几号染色体的特异性探针，对微核 (micronuclei) 进行多彩色 FISH，可检测微核的染色体来源；用着丝粒和端粒 DNA 探针对微核进行多彩色 FISH，可区分微核是由无着丝粒染色体片段组成，还是由整条染色体组成[14]. 笔者所在实验室成功地应用了小鼠着丝粒主要卫星 DNA 探针 FISH 技术进行微核分析[15,16]，在此基础上正致力用小鼠着丝粒

次要卫星 DNA 探针和端粒 DNA 探针的多彩色 FISH 检测微核的研究.

此外, 多彩色 FISH 在致突变检测中具有简便、快速、准确的特点, 既能检测稳定畸变(如易位、倒位), 又能检测不稳定畸变 (如双着丝粒染色体、无着丝粒片段), 可用于生物学剂量监测[13]. 对早熟凝聚染色体的多彩色 FISH, 可研究遗传物质损伤后的修复情况[1].

### 2.3 在肿瘤病理学中的应用

目前认为肿瘤是多基因突变积累的结果, 多彩色 FISH 可检测肿瘤组织染色体数目和结构异常、以及癌基因、抑癌基因、病毒序列的有无及拷贝数, 有助于深入认识肿瘤组织的异质性和癌前病变.

一些血液系统肿瘤有相对特异的核型改变, 如慢性粒细胞性白血病的 t (9; 22) (q34; q11), 急性单核细胞白血病的 inv (16) (p13; q22) 等. 用多彩色 FISH 既可方便地检出这些畸变, 还可检测某些难以用常规方法检测的复杂染色体改变, 如 Bajalica-Lagercratz 等[17]检测了一例 T 细胞淋巴瘤病人, 开始时病人核型为 47, XX, t (2; 13) (q22; q22), + 19, 两年后又发现了一个核型为 46; xx, der (22) t (2; 22) (q31; q13) 的恶性克隆. 还可用多彩色 FISH 监测治疗效果和早期复发情况, 鉴别骨髓移植后造血细胞克隆起源、判断病变克隆起始阶段等[18].

多彩色 FISH 可直接检测分析活检实体肿瘤组织细胞中的基因突变、癌基因、抑癌基因、病毒序列等, 突破了实体肿瘤基因突变检测受培养肿瘤细胞困难的限制, 成功用于乳腺癌非整倍体、膀胱癌癌基因拷贝数、卵巢癌和膀胱癌中的乳头瘤病毒序列检测等研究[4,18].

### 2.4 在产前诊断中的应用

多彩色 FISH 可直接用孕中期羊水细胞、植入前卵裂球细胞、母亲外周血中分离出来的胎儿细胞进行核型分析[19], 检出染色体微小易位, 分辨传统细胞遗传学方法不易分辨的异常核型, 同时检测几种类型的非整倍体发生频率, 是绒毛膜细胞和羊水细胞长期培养和核型分析的有效辅助手段; 此外这一技术在检测胎儿性别方面, 尤其是男性胎儿具有较高特异性和敏感性. 虽然多彩色 FISH 在产前诊断中的应用才刚开始从实验室走向临床实践, 但因其在核型分析上独具的优越性, 可以预见它将会是产前诊断的有力手段.

## 3 结 语

多彩色 FISH 技术在检测遗传物质突变和染色体上基因定位等方面已显示了其极大优势, 随着分子生物学方法发展, 特别是新探针的不断出现、计算机辅助的共焦显微系统和数字成像系统的发展, 多彩色 FISH 的敏感性将会不断提高, 在很多方面将可能取代传统细胞遗传学方法. 多彩色 FISH 与传统细胞遗传学方法在肿瘤、遗传性疾病诊断等方面相互补充, 将更有利于人们对这些疾病的深入认识.

## 参 考 文 献


1 Gray J W, Pinkel D, Brown J M. Fluorescence *in situ* hybridization in cancer and radiation biology. Radiation Research, 1994, **137** (3): 275~289

2 Meltzer P S, Guan X Y, Burgess A *et al*. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. Nat Genet, 1992, **1** (1): 24~28

3 Heppell-parton A C, Albertson D G, Fishpool R *et al*. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization to order small, single-copy probes on metaphase chromosomes. Cytogenetic Cell Genet, 1994, **66** (1): 42~47

4 Fox J L, Hsu P H, Legator M S *et al*. Fluorescence *in situ* hybridization: Powerful molecular tool for cancer prognosis. Clin Chem, 1995, **41** (11): 1554~1559

5 Sakamoto M, Pinkel D, Masciou L *et al*. Semiautomated DNA probe mapping using digital imaging microscopy: Ⅱ. System performance. Cytometry, 1995, **19** (1): 60~69

6 Carter N P. Cytogenetic analysis by chromosome painting. Cytometry, 1994, **18** (1): 2~10

7 Volpi E V, Baldini A. MULTIPRINS: a method of multicolour primed *in situ* labelling. Chromosome Res, 1993, **1** (4): 257~260

8 Kallioniemi A, Kallioniemi O P, Sudar D *et al*. Comparative gemomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science, 1992, **258** (5083): 818~821

9 Ariyama T, Inazawa J, Ezaki T *et al*. High-resolution cytogenetic mapping of the short arm of chromosome 1 with newly isolated 411 cosmid makers by fluorescence *in situ* hybridization: the precise order of 18 markers on 1p36.1 on prophase chromosomes and "stretched" DNAs. Genomics, 1995, **25** (1): 114~123

10 Heng H, Squire J, Tsu I L C. High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89** (20): 9509~ 9513
11 Josart G H, Greulich K M, Siperstein A E *et al*. Molecular and cytogenetic characterization of a t (1; 10; 21) translocation in the human papillary thyroid cancer cell line TPC-1 expressing the ret/$H_4$ chimeric transcript. Surgery, 1995, **118** (6): 1018~ 1023
12 Rupa D S, Hasegawal L, Eastmond D A. Detection of chromosomal breakage in the 1cen-1q12 region of interphase human lymphocytes using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with tandem DNA probes. Cancer Res, 1995, **55** (3): 640~ 645
13 Van Humelen P, Lowe X R, Wytobek A *et al*. Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Hum Genet, 1996, **98** (5): 605~ 615
14 Schreiver-schwemmer G, Adler I D. Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining and fluorescent *in situ* hybridization with centromeric and telomeric DNA probes. Mutagenesis, 1994, **9** (4): 333~ 340
15 曹 佳, 胡 斌, 程天民等 (Cao J, Hu B, Cheng T M *et al*). 昆明山海棠在微核实验中非整倍体毒性的研究. 遗传 (Hereditas), 1997, **19** (1): 1~ 3
16 胡 斌, 曹 佳, 程天民等 (Hu B, Cao J, Cheng T M *et al*). 丙烯酰胺非整倍体诱发效应的荧光原位杂交和 CREST 染色的研究. 细胞生物学杂志 (Chinese Journal of Cell Biology), 1997, **19** (2): 80~ 83
17 Bajalica-Lagercrentz S, Tingaard Pedersen N, Sorensen A G. Duplication of 2q31-qter as a sole aberration in a case of non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Genet Cytogenet, 1996, **90** (2): 102~ 105
18 Mecucci C. FISH (fluorescent *in situ* hybridiztion): the second youth of cytogenetics. Haematologic, 1995, **80** (2): 95~ 97
19 Bischoff F Z, Lewis D E, Simpson J L *et al*. Detection of low-grade mosaicism in fetal cell isolated from maternal blood. Prenat Diagn, 1995, **15** (12): 1182~ 1184

**Principle and Applications of Multicolor Fluorecsence *in situ* Hybridization Technology.**

YANG Ming-jie, CAO Jia (*Molecular Toxicology Laboratory, Third Military Medical College, Chongqing* 400038, China).

**Abstract** Multicolor fluorescence *in situ* hybridization, a new promising molecular cytogenetic technique, permits the simultaneous detection several specific nucleic acid sequences in interphase as well as metaphase by using cohybridization of probes labeled with serveral fluorescent labels or label combinations. It provids a simple, fast, and reliable means to assess genetic instability in cancer. This approach is being applied generally in physical mapping, mutation research, tumor pathology and prenatal dignosis.

**Key words** multicolor fluorescence *in situ* hybridization, chromosome painting, multicolor primed *in situ* labeling, comparative genomic hybridization

# 会 议 消 息

第 13 届国际生物物理大会将于 1999 年 9 月 19~ 24 日在印度新德里召开。会议注册费 400 美元, 学生 200 美元。感兴趣者可按下列方式联系索取第一轮通知。

A/ 写信给下面地址索取:
Professor Anil Saran
Secretary, XIII International Biophysics Congress
Tata Institute of Funfamental Research
Homi Bhabha Road, Colaba
MUMBAI-400 005, India

B/ 从因特网上获取, 并通过 E-mail 寄回回执
网址: http://www.tifr.res.in:80/~iupab99/

中国生物物理学会
联系人: 李瑞雯 电话: 010-64889869
E-mail: bscoff@sun5.ibp.ac.cn 或 zhuxm@mimi.cnc.ac.cn