

## FISH-荧光原位杂交实验（原位杂交）

### 1. 实验目的

通过实验了解荧光原位杂交技术的基本原理和在生物学、医学领域的应用。掌握原位杂交技术的操作方法，熟练掌握荧光显微镜的使用方法。

### 2. 实验原理

荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization FISH）是一门新兴的分子细胞遗传学技术，是 20 世纪 80 年代末期在原有放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术。目前这项技术已经广泛应用于动植物基因组结构研究、染色体精细结构变异分析、病毒感染分析、人类产前诊断、肿瘤遗传学和基因组进化研究等许多领域。FISH 的基本原理是用已知的标记单链核酸为探针，按照碱基互补的原则，与待检材料中未知的单链核酸进行特异性结合，形成可被检测的杂交双链核酸。由于 DNA 分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列，因而可以将探针直接与染色体进行杂交从而将特定的基因在染色体上定位。与传统的放射性标记原位杂交相比，荧光原位杂交具有快速、检测信号强、杂交特性高和可以多重染色等特点，因此在分子细胞遗传学领域受到普遍关注。

杂交所用的探针大致可以分为三类：1）染色体特异重复序列探针，例如 a 卫星、卫星 III 类的探针，其杂交靶位常大于 1Mb，不含散在重复序列，与靶位结合紧密，杂交信号强，易于检测；2）全染色体或染色体区域特异性探针，其由一条染色体或染色体上某一区段上极端不同的核苷酸片段所组成，可由克隆到噬菌体和质粒中的染色体特异大片段获得；3）特异性位置探针，由一个或几个克隆序列组成。探针的荧光素标记可以采用直接和间接标记的方法。间接标记是采用生物素标记的 dUTP(biotin-dUTP)经过缺口平移法进行标记，杂交之后用耦联的荧光素的抗生物素的抗体进行检测，同时还可以利用几轮抗生物素蛋白—荧光素、生物素化的抗—抗生物素蛋白、抗生物素蛋白—荧光素的处理，将荧光信号进行放大，从而可以检测 500bp 的片段。而直接标记法是将荧光素直接与探针核苷酸磷酸戊糖骨架共价结合，或在缺口平移法标记探针时将荧光素核苷三磷酸掺入。直接标记法在检测时步骤简单，但由于不能进行信号放大，因此灵敏度不如间接标记的方法。

### 3. 实验用具及材料

Y 染色体探针、人外周血中期染色体细胞标本、恒温水浴锅、培养箱、染色缸、载玻片、Nikon E-400、荧光显微镜、盖玻片、封口膜、200mL 移液器、20mL 移液器、暗盒、指甲油、甲酰胺、氯化钠、柠檬酸钠、氢氧化钠、吐温 20。

#### 4. 实验方法及步骤

##### 1) 探针及标本的变性

###### (1) 探针变性

将探针在 75℃ 恒温水浴中温育 5min，立即置 0℃，5~10min，使双链 DNA 探针变性。

###### (2) 标本变性

①将制备好的染色体玻片标本于 50℃ 培养箱中烤片 2~3h。(经 Giemsa 染色的标本需预先在固定液中退色后再烤片)。

②取出玻片标本，将其浸在 70~75℃ 的体积分数 70% 甲酰胺/2×SSC 的变性液中变性 2~3min。

③立即按顺序将标本经体积分数 70%、体积分数 90% 和体积分数 100% 冰乙醇系列脱水，每次 5min，然后空气干燥。

##### 2) 杂交

将已变性或预退火的 DNA 探针 10mL 滴于已变性并脱水的玻片标本上，盖上 18×18 盖玻片，用 Parafilm 封片，置于源潮湿暗盒中 37℃ 要交过夜（约 15~17h）。由于杂交液较少，而且杂交温度较高，持续时间又长，因此为了保持标本的湿润状态，此过程在湿盒中进行。

##### 3) 洗脱

此步骤有助于除去非特异性结合的探针，从而降低本底。

(1) 杂交次日，将标本从 37℃ 温箱中取出，用刀片轻轻将盖玻片揭掉。

(2) 将已杂交的玻片标本放置于已预热 42~50℃ 的体积分数 50% 甲酰胺/2×SSC 中洗涤 3 次，每次 5min。

(3) 在已预热 42~50℃ 的 1×SSC 中洗涤 3 次，每次 5min。

(4) 在室温下，将玻片标本 2×SSC 中轻洗一下。

##### 4) 杂交信号的放大

(1) 在玻片的杂交部位加 150mL 封闭液 I，用保鲜膜覆盖，37℃ 温育 20min。

(2) 去掉保鲜膜，再加 150mL avidin-FITC 于标本上，用保鲜膜覆盖，37℃继续温育 40min。

(3) 取出标本，将其放入已预热 42~50℃的洗脱液中洗涤 3 次，每次 5min。

(4) 在玻片标本的杂交部位加 150mL 封闭液 II，覆盖保鲜膜，37℃温育 20min。

(5) 去掉保鲜膜，加 150mL antiavidin 于标本上，覆盖新的保鲜膜，37℃温育 40min。

(6) 取出标本，将其放入已预热 42~50℃的新洗脱液中，洗涤 3 次，每次 5min。

(7) 重复步骤 (1)、(2)、(3)，再于 2×SSC 中室温清洗一下。

(8) 取出玻片，自然干燥。

(9) 取 200mL PI/antifade 染液滴加在玻片标本上，盖上盖玻片。

#### 5) 封片

可采用不同类型的封片液。如果封片中不含有 Mowiol (可使封片液产生自封闭作用)，为防止盖片与载片之间的溶液挥发，可使用指甲油将盖片周围封闭。封好的玻片标本可以在-20~-70℃的冰箱中的暗盒中保持数月之久。

#### 6) 荧光显微镜观察 FISH 结果

先在可见光源下找到具有细胞分裂相的视野，然后打开荧光激发光源，FITC 的激发波长为 490nm。细胞被 PI 染成红色，而经 FITC 标记的探针的探针所在位置发出绿色荧光。由于本实验使用的是 Y 染色体上的特异序列，因此在男性外周血染色体标本的杂交中呈阳性，即使在未分裂的细胞中，也可以观察到明显的杂交信号。照相记录实验结果 (图 16-1)。

#### 附录 I FISH 相关溶液的配制

1) 20×SSC: 175.3g NaCl, 882.g 柠檬酸钠，加水至 1000mL (用 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.0)。

2) 去离子甲酰胺 (DF): 将 10g 混合床离子交换树脂加入 100mL 甲酰胺中。电磁搅拌 30min，用 Whatman1 号滤纸过滤。

3) 体积分数 70%甲酰胺/2×SSC: 35mL 甲酰胺，5mL 20×SSC，10mL 水。

4) 体积分数 50%甲酰胺/2×SSC: 100mL 甲酰胺，20mL 20×SSC，80mL 水。

5) 体积分数 50%硫酸葡聚糖 (DS): 65℃水浴中融化，4℃或-20℃保存。

6) 杂交液: 8mL 体积分数 25%DS, 20mL 20×SSC 混合。(或 40mL 体积分数 50%DS, 20mL 20×SSC, 40mL ddH<sub>2</sub>O 混合) 取上述混合液 50mL, 与 5mL DF 混合即成。其终浓度为体积分数 10% DS 2×SSC, 体积分数 50% DF。

7) PI/antifade 溶液

PI 原液: 先以双蒸水配置溶液, 浓度为 100mg/mL, 取出 1mL, 加 39mL 双蒸水, 使终浓度为 2.5mg/mL。

Antifade 原液: 以 PBS 缓冲液配制该溶液, 使其浓度为 10mg/mL, 用 0.5mmol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 值为 8.0。取上述溶液 1mL, 加 9mL 甘油, 混匀。

PI/antifade 溶液: PI 与 antifade 原液按体积比 1: 9 比例充分混匀, -20℃ 保存备用。

8) DAPI/antifade 溶液: 用去离子水配制 1mL/mg DAPI 储存液, 按体积比 1:300, 以 antifade 溶液稀释成工作液。

9) 封闭液 I: 体积分数 5% BSA 3mL, 20×SSC 1mL, dd H<sub>2</sub>O 1mL, Tween 20 5mL 混合。

10) 封闭液 II: 体积分数 5% BSA 3mL, 20×SSC 1mL, goat serum 250mL, dd H<sub>2</sub>O 750mL, Tween 20 5mL 混合。

11) 荧光检测试剂稀释液: 体积分数 5% BSA 1mL, 20×SSC 1mL, dd H<sub>2</sub>O 3mL, Tween 20 5mL 混合。

12) 洗脱液: 100mL 20×SSC, 加水至 500mL, 加 Tween20 500 mL。

13) TE 缓冲液: pH8.0: 10mmol/L Tris, HCl, 1mmol/L EDTA;

pH7.6: 10mmol/L Tris, HCl, 1mmol/L EDTA;

pH7.4: 10mmol/L Tris, HCl, 1mmol/L EDTA。

14) 溶液 I: 25mmol/L Tris HCl(pH 7.4), 10mmol/L EDTA。

15) 溶液 II: 10% SDS, 0.2M NaOH。

16) 溶液 III: Kac 14.7g, HAc 5.8mL, 加水至 50mL。

17) LB 培养基: 胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 加水至 1000mL, 用 5mmol/L NaOH 调 pH 值至 7.0。

附录 II DNA 探针的制备

质粒 DNA 克隆的提取、纯化和鉴定。

- 1) 用接种环挑取一小块-70℃冻存的转化菌，接种于 5mL LB 培养基中，37℃剧烈震荡过夜。
- 2) 将收集到的菌液 3000r/min 离心 10min，弃掉上清液。
- 3) 向菌体沉淀中加入溶液 I 300mL，溶液 II 350mL，混匀后将其置于冰浴中片刻，再加溶液 III 350mL 混匀，加酚和氯仿混合液（体积比为 1: 1）500mL 后充分混匀。
- 4) 12000r/min 离心 10min。
- 5) 取上清液，向其加入 600mL 异丙醇，充分混匀后以 12000r/min 离心 15~30min，弃掉上清液。
- 6) 用 1500mL 体积分数 70%乙醇洗涤沉淀 2~3 次，晾干。
- 7) 用 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。
- 8) 加水至 200mL，以 Rnase A（终浓度 200mg /mL）在 50℃水浴中消化 30min。
- 9) 加入酚、氯仿和异丙醇（三者体积比 25: 24: 1）溶液 200mL 混匀，12000r/min 离心 2min。
- 10) 取上清液，再加入氯仿和异戊醇溶液（体积比为 24: 1）200mL 混匀，12000r/min 离心 2min。
- 11) 取上清液，以 20mL 3M NaAc 及 500mL 体积分数 100%乙醇沉淀 DNA。
- 12) 可将上述溶液在-70℃放置 30min 至 1h 以充分沉淀 DNA，然后用 12000r/min 离心 15min。
- 13) 将沉淀用 1.5mL 体积分数 70%乙醇轻洗，自然晾干。
- 14) 用 TE 缓冲液溶解 DNA。
- 15) 取 1~2mL 上述纯化的 DNA 溶液，于 8.0g/L 琼脂糖/TBE 缓冲液凝胶电泳鉴定 DNA 并检测浓度。
- 16) 取 1mg DNA，用相应限制性内切酶 4~5 单位，BSA 100~200mg /mL，于 37℃水浴中酶解 2~4h。
- 17) 电泳观察，根据酶切片数量及大小，估计 DNA 克隆插入片段大小。

### 附录 III 探针的生物素标记

探针的标记可采用 PCR 或缺口平移法来制备，但多数情况下采用缺口平移法来制备。该过程包括以 DNase I 在 DNA 双链上作用产生缺口并以此作为第二

反应步骤的作用起嘧，即大肠杆菌聚合酶 I 自缺口处进行修补合成。在修补合成互补链时将生物素标记的 d-NTP 掺入，从而复制出带有生物素标记的探针。本实验采用缺口平移法，按 GIBCO 公司提供的方法以 biotin-14-dATP 标记探针。标记好的探针可以在-20℃下长期保存。

总反应体积 50mL， DNA 1mg,10×dNTP 5mL, 10×Enzyme Mix 5mL。

其中 10×dNTP 为： 500mmol/L Tris·HCl(pH 7.8)

50mmol/L MgCl<sub>2</sub>

100mmol/L β-巯基乙醇

100mg /ml 去除核酸酶的牛血清白蛋白

0.2mmol/L dCTP, 0.2mmol/L dGTP, 0.2mmol/L dTTP

0.1mmol/L dATP, 0.1mmol/L biotin-14-dATP

10×酶混合为： 0.5units/mL DNA 聚合酶 I

0.075units/mL Dnase I

50mmol/L Tris·HCl(pH 7.5)

5mmol/L 醋酸镁

1mmol/L β-巯基乙醇

0.1mmol/L 苯甲基磺酰氟

体积分数 50%甘油

100mg /mL 牛血清白蛋白

将上述混合液于 16℃作用 1h。用 8.0g/L 琼脂糖/TBE 缓冲液凝胶电检测标记产物。以 DNA 片段长约 300~500bp 为宜。如片段较大，则应加适量 Dnase I 继续酶切，直至 DNA 片段长度适中后，加 5mL 终止缓冲液（300mmol/L EDTA）终止反应。用乙醇沉淀的方法将探针与非掺入的核苷酸分开。