

同时进行原位杂交及染色体分带的基因定位新方法

浙江医科大学组胚教研室 张颖明

摘要 作者报道一种同时进行染色体原位杂交及染色体分带的基因定位新方法。它具有简单、快速、准确以及结果稳定、易重复等优点。细胞经常规培养制成染色体玻片后,进行染色体原位杂交。杂交信号经抗体检测放大后,染色体依次用色素素 A₃ 以及甲绿处理进行荧光反带分带(R带)。玻片在荧光显微镜下观察,只要调换滤片即可分别观察杂交点及染色体 R 带。两者互不干扰,结果清晰、直观,杂交点及 R 带持久而稳定。此方法尤其适用于做基因定位,及检测有关病毒基因在受感染细胞染色体上的插入部位。

关键词 杂交;染色体分带;基因定位

染色体原位杂交技术是一种利用标记的 DNA 或 RNA 探针,与细胞内相应互补的核苷酸进行杂交,以检测后者在细胞内的存在及其数量和结构改变的方法^[1,2],目前主要应用于以下三个方面:①在临床遗传学、肿瘤遗传学等方面,作染色体数目和结构畸变的检测;②病理学方面,用于检测细胞、组织内有关的病毒基因;③用于基因定位。随着肿瘤分子生物学技术的深入开展,与肿瘤发生、发展有关的一些癌基因、抑癌基因将陆续被发现,对这些基因进行染色体定位,有助于研究其功能及相邻基因之间的相互关系。

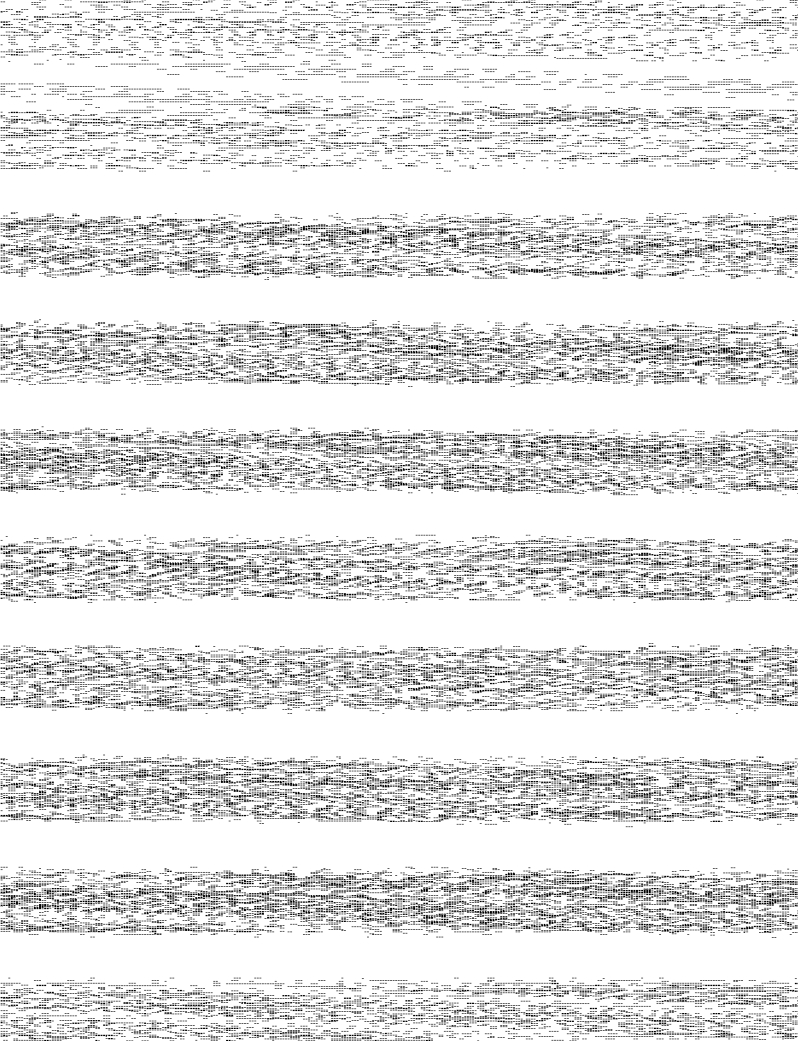
基因定位包括目的基因的标记,与细胞染色体的杂交以及相应染色体的分带。目前已有不少方法^[3-5],大多经胰酶处理制成染色体 G 带后再做原位杂交,或者先做原位杂交再进行染色体 G 带或 R 带分带。原位杂交与分带之间常有影响,且实验中要进行二次玻片定位及二次拍片,有的还要在细胞培养中加入 5-溴尿嘧啶等作同步化预处理,既费时又极不稳定。作者在上述方法基础上,改为同时进行原位杂交及染色体 R 分带。该基因

定位新方法具有简单、快速、准确及稳定等优点。现介绍如下。

1 材料与方法

正常健康人外周血淋巴细胞在含有 20%胎牛血清、10 $\mu\text{g/ml}$ 植物血凝素(PHA)以及适量抗菌素的 RPMI 1640 培养液中培养 72 h。收获前半小时加入 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的秋水仙素。细胞收获后用 37℃的 0.075 mol/L KCl 低渗处理 20 min,离心去上清液,用新鲜冰冷的 3:1 甲醇:冰醋酸固定液固定 3 次,每次 20 min。将离心后的细胞悬液滴于干净玻片上,置室温下干燥。

染色体原位杂交采用第 1 号染色体的着丝粒特异性的 DNA 探针(D1Z1, Oncor, 美国),其中包含有 1.90 kb 的 α 随体序列核苷酸。相应互补核苷酸在 1 号染色体的着丝粒处有约 100 个拷贝数^[6]。探针已经用生物素(Biotin)经缺口平移法标记。杂交液含有上述 DNA 探针 1 ng/ μl , 50% 去离子甲酰胺、10% 硫酸葡聚糖、鲑鱼精子 DNA 10 ng/ μl 以及 2 $\times$ SSC。将杂交液滴加于细胞富含区,盖玻片



使染色体已经分带仍然可以再用相应抗体检测放大杂交点,而不影响分带,反之亦然。此极有利于短小基因的定位。分带后的染色体在暗盒中存放时间延长,可以获取清晰而更稳定的R带。在甲绿中的染色时间以20 min最佳,时间太长或太短都将影响杂交信号的荧光强度。我们发现原位杂交时采用AMCA荧光素,其杂交点清晰、持久,因为它与色霉素A₃的激发光波互不影响,反之,如采用异硫氰酸盐荧光素(FITC),将因激发光波波长重叠而影响其观察,不仅持续时间短,荧光消退快,而且两者反差极小。④本实验的原位杂交和染色体分带结果可以拍录在同一底片上或经二次拍摄分别记录,尤其是前者十分有利于直观、准确的基因定位。⑤利用本方法,我们已经分别对插入到粘粒、酵母人工染色体(YAC)等的长片段的单拷贝基因(如一些癌基因、抑癌基因)做了染色体定位,均取得了满意的实验结果。在进行这类实验时应适当提高杂交液中甲酰胺浓度,增加杂交时间以及冲洗次数。

本方法除了供基因定位外,还可用于检测肿瘤的相关病毒以及它在宿主细胞遗传物质上的插入部位。有作者证实,在绝大多数恶

性淋巴瘤中有EB病毒的感染,据认为与淋巴瘤的发生、发展有密切关系^[8]。我们利用本方法,正在进行有关外周T细胞淋巴瘤中EB病毒感染及其核酸分子在受感染的肿瘤细胞染色体上的插入部位的研究工作,意欲了解EB病毒与此类淋巴瘤发生的关系。

荧光原位杂交技术具有较高的敏感性,已可以把1 kb的基因定位到染色体上。采用不同荧光素标记基因,并利用处于伸展状态的间期细胞核中的染色质丝,已可分别定位分辨相距仅20 kb的两个基因^[9]。本实验为快速、准确地进行基因定位提供了一个简便、理想的方法。

参 考 文 献

1. Gray JW, et al. *Cancer*, 1992, 69(6): 1536
 2. Lichter P, et al. *Nature*, 1990, 345(1): 93
 3. Duncan LM, et al. *Cytogenet Cell Genet*, 1993, 62(2): 228
 4. Lemieux N, et al. *Cytogenet Cell Genet*, 1992, 59(3): 311
 5. Fan YS, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(4): 6223
 6. Devilee P, et al. *Cytogenet Cell Genet*, 1986, 41(2): 193
 7. Sahar E, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(3): 5650
 8. Weiss LM, et al. *Blood*, 1992, 79(2): 1789
 9. Trask BJ, et al. *Am J Hum Genet*, 1990, 48(1): 1
- (1994年5月25日收稿,同年6月18日修回)

A NOVEL GENE MAPPING METHOD FOR SIMULTANEOUS IN-SITU HYBRIDIZATION AND CHROMOSOME BANDING

Zhang Yanming

Department of Histology & Embryology, Zhejiang Medical University

A new method for simultaneous in-situ hybridization and chromosome banding for gene mapping was reported. It was simple, rapid and stable. Cells were cultured according to the routine method. In-situ hybridization was made. After the detection of hybridization signals with antibodies, chromosome banding was performed with chromomycin A₃ and methylgreen (R banding). Under the fluorescent microscope, hybridization signals and chromosome banding were observed by changing the filters. The two steps didn't interfere with each other and the results were very clear-cut. The method is specially suitable for gene mapping and the detection of viruses and their inserting sites on chromosomes of infected host cells.

KEY WORDS Hybridization; Chromosome banding; Gene mapping