

荧光原位杂交实验 (FISH)

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 年代末期在原有的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待许多领域。

1 实验方法原理:

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 年代末期在原有的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待许多领域。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、杂交特异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类三类: 1) 染色体特异重复序列探针, 例如 α 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 DNA 探针, 杂交之后用耦联有荧光素亲和素或者链霉亲和素进行检测, 同时还可以利用亲和素-生物素-

荧光素复合物，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或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。

2 实验材料、试剂、仪器耗材：

人的 MyoD1 (MYF3)基因探、人外周血中期染色体细胞标本

指甲油、甲酰胺、氯化钠、柠檬酸钠、氢氧化钠、吐温 20 等

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、200 μ L

移液器、暗盒等

3 实验步骤：

一、实验材料准备

1. 实验用具及材料

2. 相关溶液的配制

(1) 20 \times SSC：175.3 g NaCl, 88.2 g 柠檬酸钠，加水至 1 000 mL (用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0) 。

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

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

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

(5) 体积分数 50%硫酸葡聚糖 (DS)：65 $^{\circ}$ C水浴中融化，4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C保存。

(6) 杂交液: 8 μL 体积分数 25%DS, 20 μL 20 \times SSC 混合。(或 40 μL 体积分数 50% DS, 20 μL 20 \times SSC, 40 μL ddH₂O 混合) 取上述混合液 50 μL , 与 5 μL DF 混合即成。其终浓度为体积分数 10% DS, 2 \times 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 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取出 1 mL, 加 39 mL 双蒸水, 使终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Antifade 原液: 以 PBS 缓冲液配制该溶液, 使其浓度为 10 mg/mL , 用 0.5 mmol/L 的 NaHCO₃ 调 pH 值为 8.0。取上述溶液 1 mL, 加 9 mL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 3 mL, 20 \times SSC 1 mL, ddH₂O 1mL, Tween20 5 μL 混合。

(10) 封闭液 II: 体积分数 5% BSA 3mL, 20 \times SSC 1mL, goat serum 250 μL , ddH₂O 750 μL , Tween20 5 μL 混合。

(11) 荧光检测试剂稀释液: 体积分数 5% BSA 1mL, 20 \times SSC 1mL, ddH₂O 3mL, Tween20 5 μL 混合。

(12) 洗脱液: 100 mL 20 \times SSC, 加水至 500 mL, 加 Tween20 500 μL 。

二、实验方法及步骤

1. 探针变性

将探针在 75 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中温育 5 min, 立即置 0 $^{\circ}\text{C}$, 5 ~ 10 min, 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 2~3 h。(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 2~3 min。

(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 5 min, 然后空气干燥。

3. 杂交

将已变性或预退火的 DNA 探针 10 μL 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, 置于潮湿暗盒中 37℃杂交过夜 (约 15~17 h)。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。

4. 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 5 min。

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

(4) 在室温下, 将玻片标本于 2×SSC 中轻洗一下。

(5) 取出玻片, 自然干燥。

(6) 取 200 μL 复染溶液 (PI/antifade 或 DAPI/antifade 染液) 滴加在玻片标本上, 盖上盖玻片。

5. 杂交信号的放大 (适用于使用生物素标记的探针)

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

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

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

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

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

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

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

(8) 取出玻片, 自然干燥。

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

6. 封片

可采用不同类型的封片液。如果封片液中不含有 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°C 的冰箱中的暗盒中保持数月之久。

7. 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 490 nm。细胞被 PI 染成红色, 而经 FITC 标记的探针所在的位置发出绿色荧光。

所用不同荧光材料的激发光和发射光波长及滤光镜选择。