



生命科学实验指南系列

Molecular Cytogenetics
Protocols and Applications

分子细胞遗传学

—— 技术与应用

〔加〕范耀山 著
刘青杰 等 译



科学出版社

www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

分子细胞遗传学——技术与应用

Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications

〔加〕范耀山 著

刘青杰 等译

科学出版社

北 京

图字: 01-2005-6305 号

内 容 简 介

本书是美国 *Methods in Molecular Biology* 系列丛书第 204 卷的中译本。书中详细介绍了以荧光原位杂交 (FISH) 为代表的分子细胞遗传学相关技术 (如染色体显微切割、引物介导的原位标记、SKY、M-FISH、CGH、彩色显带、纤维 FISH、阵列 CGH 等) 的原理、基本技术、实验材料、方法和注意事项, 以及这些技术在染色体病诊断和产前诊断、肿瘤学研究中的应用。

本书适于生物医学领域, 特别可作为儿科学、医学遗传学、围产医学、生殖医学、发育生物学、病理学、血液学和肿瘤学等领域的医疗、教学、科研人员和相关学科的博士生、硕士生实验或诊疗过程中快速查阅的指导手册, 也可作为细胞遗传学、血液学、分子病理学等技术培训和初学者的重要教材。

The original English language work has been published by HUMANA PRESS Totowa, New Jersey, U. S. A. ©2002 by Humana Press. All rights reserved.

图书在版编目(CIP)数据

分子细胞遗传学——技术与应用/(加) 范耀山著; 刘青杰等译. —北京: 科学出版社, 2007

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-017977-7

I. 分… II. ①范…②刘… III. 分子遗传学: 细胞遗传学 IV. ①Q75②Q343

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 103249 号

责任编辑: 李 悦 彭克里 席 慧/责任校对: 李奕莹

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 耕者

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 4 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2007 年 4 月第一次印刷 印张: 27 1/4 插页: 6

印数: 1—3 000 字数: 530 000

定价: 68.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

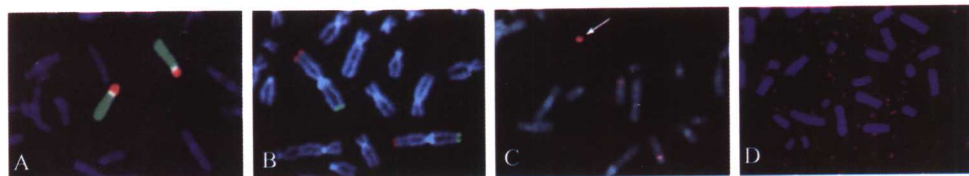


图 5-1 (A) 用显微切割制备的 12p(红色)和 12q(绿色)臂特异性涂染探针。(B) 用显微切割构建的区带特异性探针的例子: 图中所示的是 1p(红色)和 1q(绿色)末端区带的探针。(C) 用显微切割确定的一个小环状染色体。切割的 DNA (红色) 杂交到小环状染色体(箭头所示)和 14 号染色体的着丝粒。(D) 用显微切割确定的双微小体。切割的 DNA (红色) 特异性杂交到双微小体。

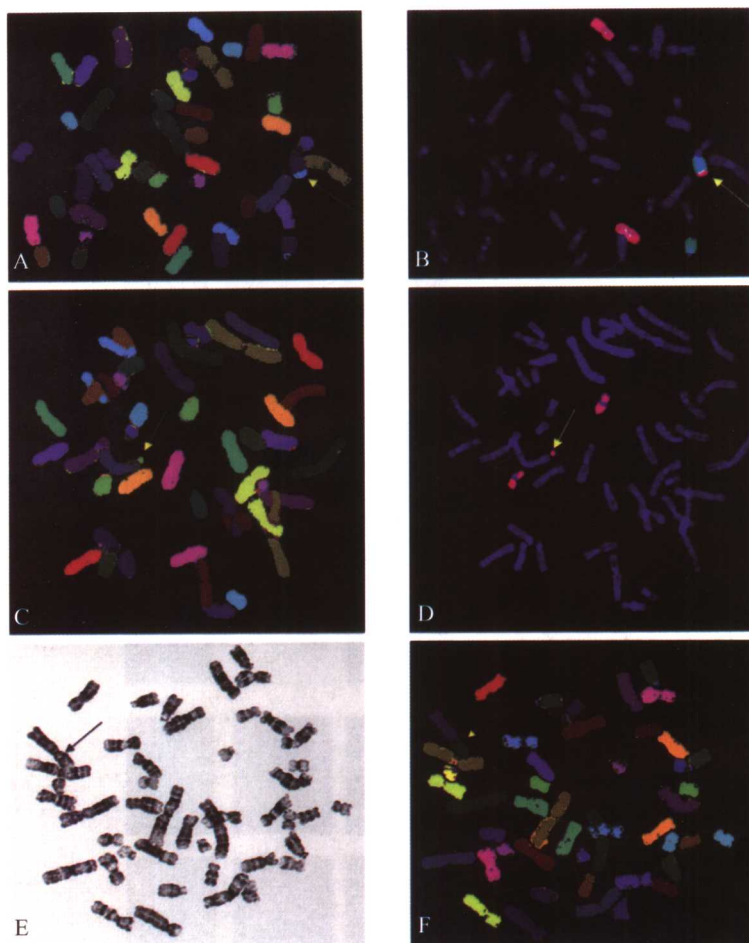


图 8-1 (A) 羊水培养物的 M-FISH 分析得出易位到一条异常 15 号染色体的片段来源于 9 号染色体。(B) 通过使用 9 号 wcp 探针证实了 M-FISH 分析结果。(C) 羊水培养物的 M-FISH 分析得出一个小环状染色体来自 19 号染色体。(D) 通过使用 19 号 wcp 探针证实了 M-FISH 分析结果。(E, F) 对从自然流产得来的成纤维母细胞培养物依次进行 G 带和 M-FISH 分析得出一个片段从 2 号染色体易位至 4 号染色体。

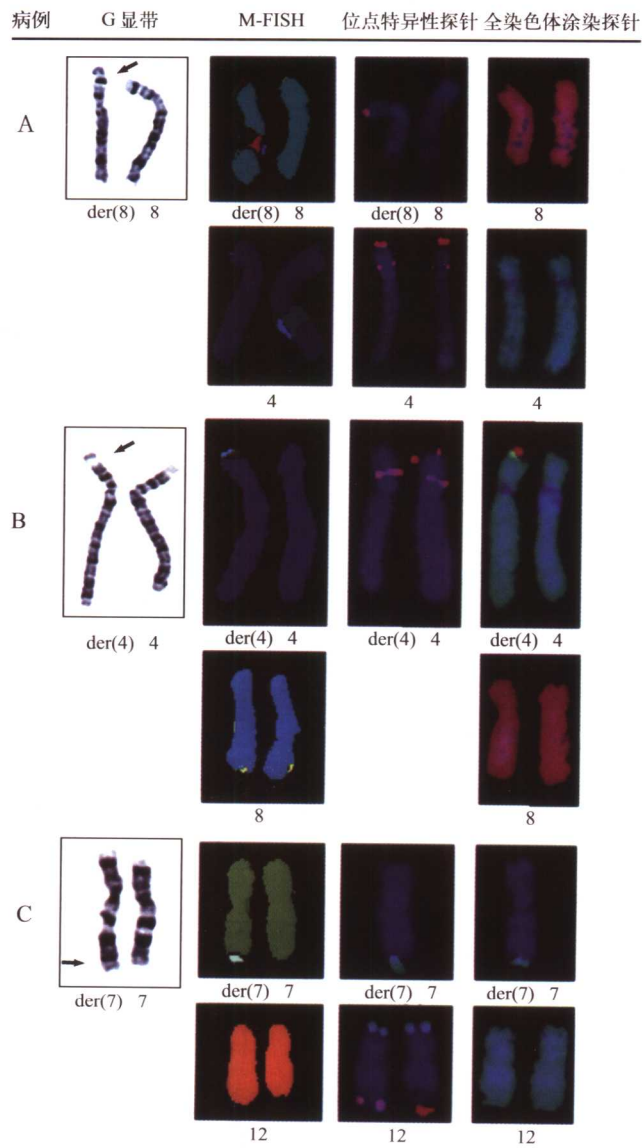


图 8-2 对两兄弟的全血培养物进行 M-FISH 分析得出：两条小的衍生染色体自一条平衡易位染色体 t(4,8)(p16.1;p23.1)分离而来。(A) 使用 4 号 wcp 探针及存在 4p16.3 位点特异探针信号证实了在 der(8)中的易位片段来自 4 号染色体。(B) 使用 8 号 wcp 探针和不存在 4p16.3 位点特异探针信号证实了在 der(4)中的易位片段来自 8 号染色体。(C) 对核型为 add(7)(q34)的全血培养物进行 M-FISH 分析得出微小易位片段来自 12 号染色体，并由 12 号 wcp 探针和 12 号染色体短臂端粒特异性探针 FISH 得到证实。

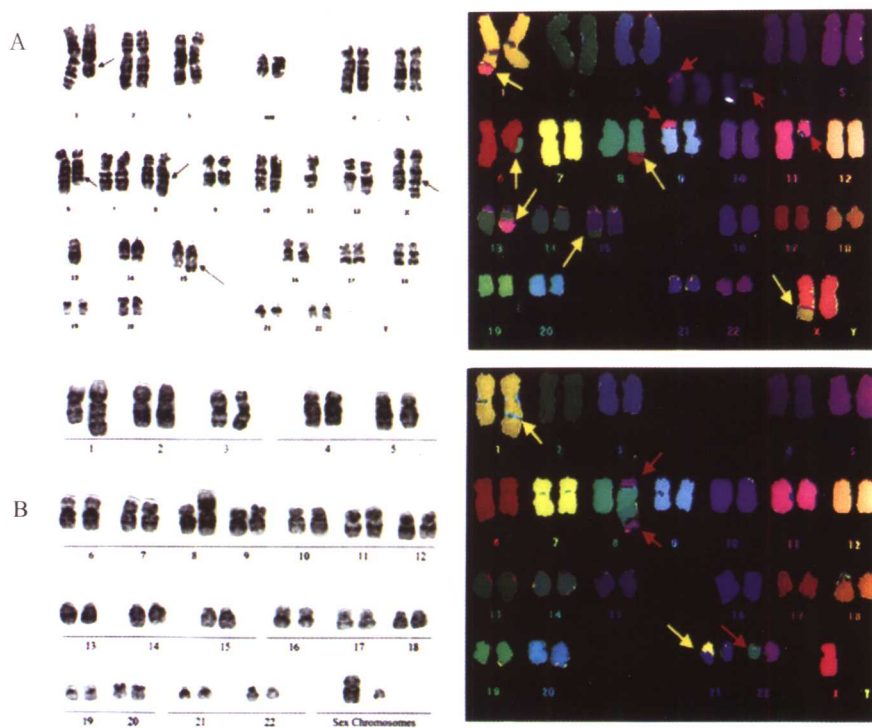


图 8-3 在复杂核型中可进行 M-FISH 分析以检测关键染色体重排（红箭头标出）和其他的染色体异常（黄箭头标出），这些染色体形态一般较差，大多取自患血液病患者的骨髓样本。（A）病例 1 中 G 带方法未查出的 $t(9;11)$ ，用 MLL 位点重排进行了鉴别和确认；对 G 带方法查出的 $t(X;1)$ ， $t(6;8)$ ，用 M-FISH 方法进行了证实并证明两个标记染色体为 $der(13)t(11;13)$ 和 $der(15)t(13;15)$ 。（B）病例 2 中的关键重排包括 $add(8)$ ，经 M-FISH 方法确认为 $ider(8q)(q10)t(8;22)(q24;q11)$ ，而且，经确认 $add(1)(q24)$ 为 $dup(1)$ ， $add(14)$ 为 $der(14)t(3;14)$ 。

图版 IV

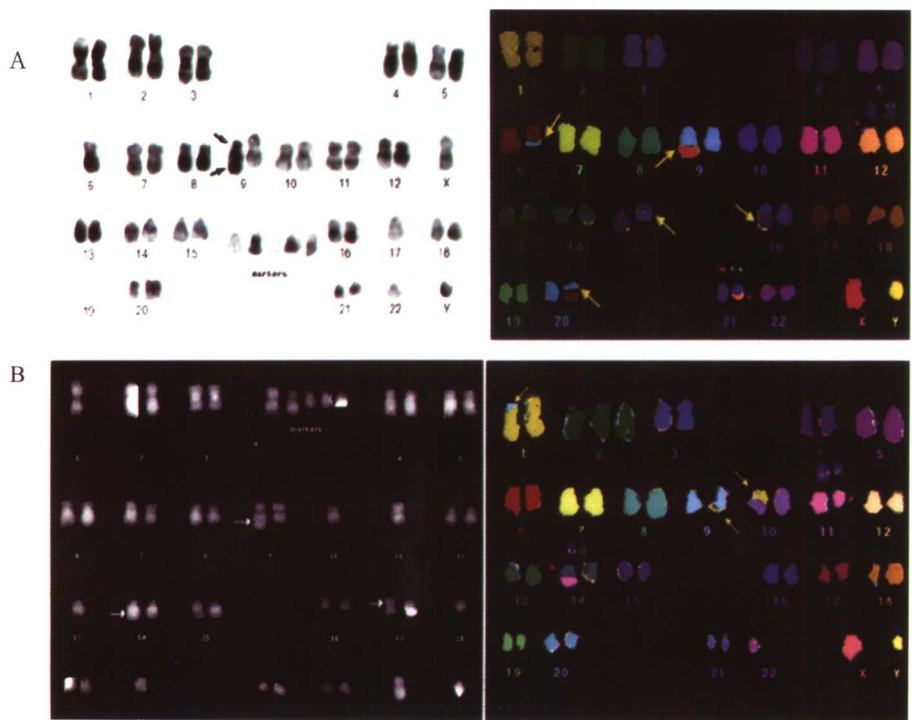


图 8-4 在复杂核型中可进行 M-FISH 分析以检测关键性染色体重排（红箭头标出）和其他的染色体异常（黄箭头标出），这些染色体形态一般较差，大多为取自患血液病患者的骨髓样本。（A）病例 3 中 G 带方法未查出的 $t(12;21)(p13;q21)$ ，用 M-FISH 方法得以鉴别，并由 TEL-AML1 融合进行了证实；对 G 带方法无法确定的 $der(6), add(9), -17, -19, -19, -22, +5mar$ ，用 M-FISH 方法进行了确认。（B）病例 4 中 G 带方法未查出的 $t(11;14)(q13;q32)$ ，用 M-FISH 方法得以鉴别，并由 cyclin D1 和 IgH 位点融合进行了证实；其他标记染色体被确认为 $t(1;9)$ 和 $der(10)t(1;10)$ 。

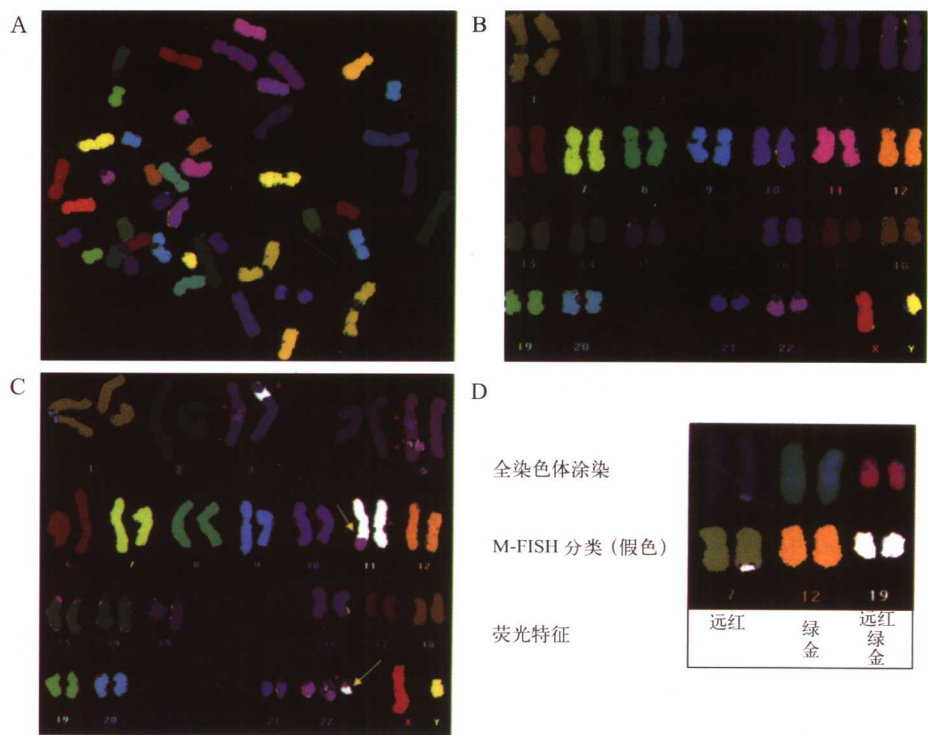


图 8-5 (A, B) 对 PHA 刺激的全血培养物进行 M-FISH 分析, 显示了中期染色体分裂相和正常男性的核型。(C) 对成纤维细胞培养物进行 M-FISH 分析显示 t(11;22) 和额外的 22 号染色体。黄箭头标示出易位, 红箭头标示出染色体重叠区域。(D) 对携带 7 号和 12 号染色体非平衡易位的全血培养物进行 M-FISH 分析, 发现易位到 7 号染色体的片段由于信号重叠的原因看似来源于 19 号染色体, 但单独使用 12 号 wcp 探针发现该片段实际上来源于 12 号染色体。

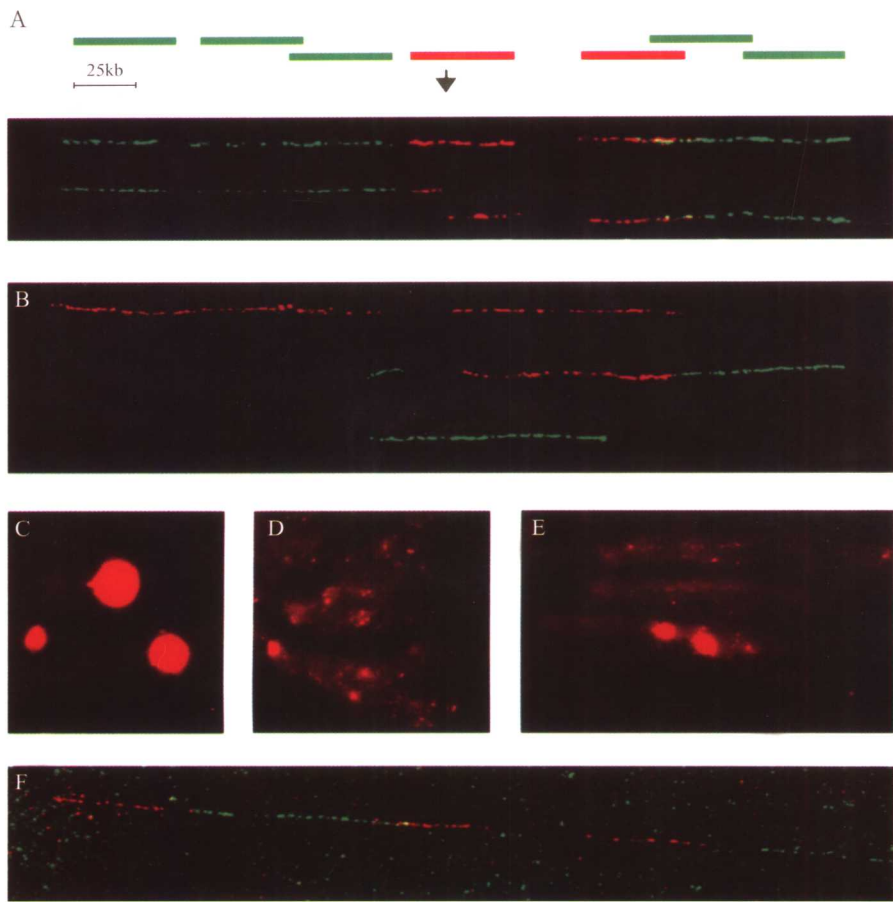


图 11-1 (A) 纤维 FISH 定位 ETV6(12p13)基因 t(9:12)(q34:p13)的断裂点图。正常的 300kb 条形码由 7 个黏粒探针组成, 重叠的黏粒图谱如图所示。上面的纤维代表正常的等位基因, 示正常条形码图谱的杂交图。第二条和第三条纤维示断裂点产物的互补图谱。白血病细胞中的断裂点定位在中间黏粒上(箭头所示)。(B) 使用包括 200kb 插入片段基因的两个特异的条形码同时进行杂交。上面的纤维示一个基因 (*MLL* 基因位于 11q23) 的正常条形码; 而下面的纤维示配体基因 (*AF4* 基因位于 4q21) 的正常条形码; 中间的那条纤维表明了肿瘤 DNA 中两位点的连接。本例中 *MLL* 基因条形码的一部分插入到 *AF4* 基因中^[20]。值得注意的是, 一个简单的单色条形码也能够准确定位断裂点。(C) 用碘化丙啶染色纤维, 载玻片上的细胞核如果呈现为亮红色的球状, 表明细胞裂解不充分。(D) 用碘化丙啶染色纤维, 如果载玻片看起来为云雾状并有发亮的晶体出现, 如本照片所示, 表明细胞用量太大。(E) 用碘化丙啶染色纤维, 本图中的细胞裂解充分并沿载玻片均匀地分布, DNA 晕圈呈彗星状结构。(F) 采用 250kb 双色 (红色和绿色) 黏粒条形码进行纤维 FISH 杂交。使用双色或三色滤光片观察纤维, 很容易识别线性排列的串珠状纤维信号和单一背景信号。

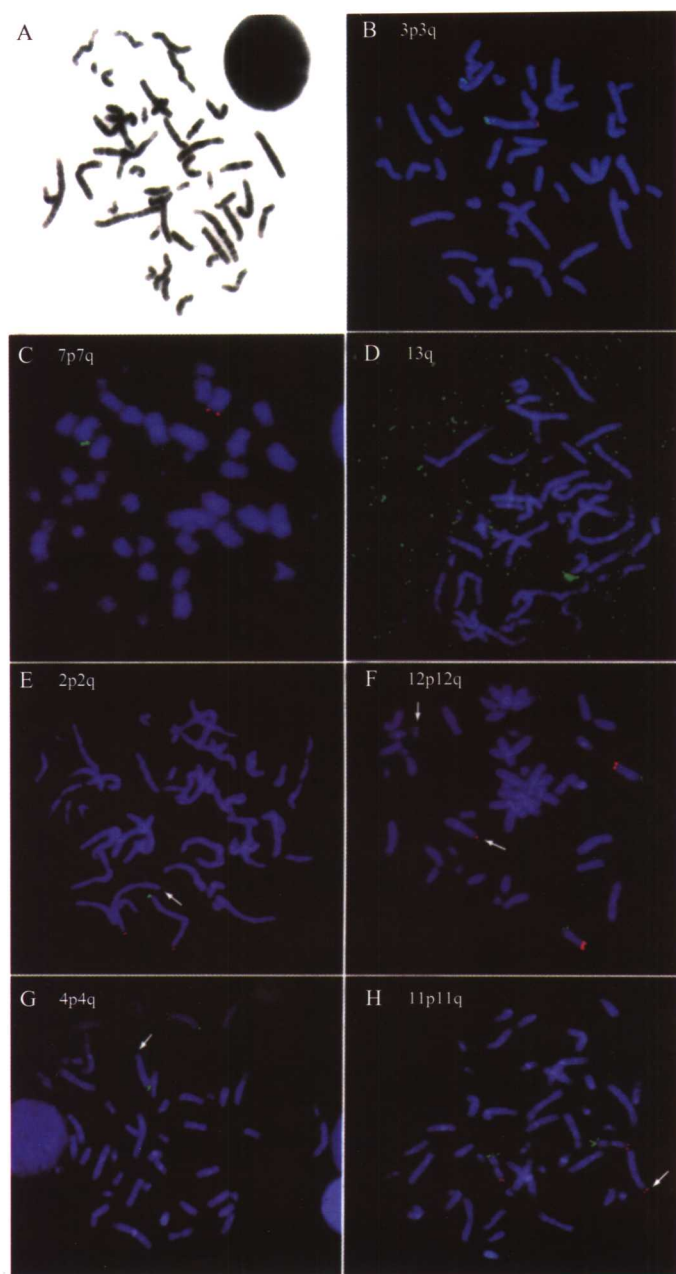


图 12-2 (A) 一个适合杂交的中期染色体分散度图例; (B) 用 3p3q 端粒特异性的 PAC 探针的正常杂交结果; (C) 过度变性的染色体胀大形态, 这张图中 7p 缺失很清楚; (D) 片子上出现很多斑点是抗体用量过大的典型特征, 洗脱不充分也可出现类似的外观; (E) 2p2q 多态性, 这张图上箭头所指 2q 上的信号几乎看不到; (F) 12p 黏粒探针与 6p 和 20q 的亚端粒区域发生了交叉杂交; (G) 和 (H) 在一个智力发育延迟个体的同一张片子上的方块 4 和 11 杂交结果揭示出具有临床意义的非平衡易位 (4p 单体与 11p 三体)。这些杂交图例中, 短臂信号为红色, 长臂信号为绿色。

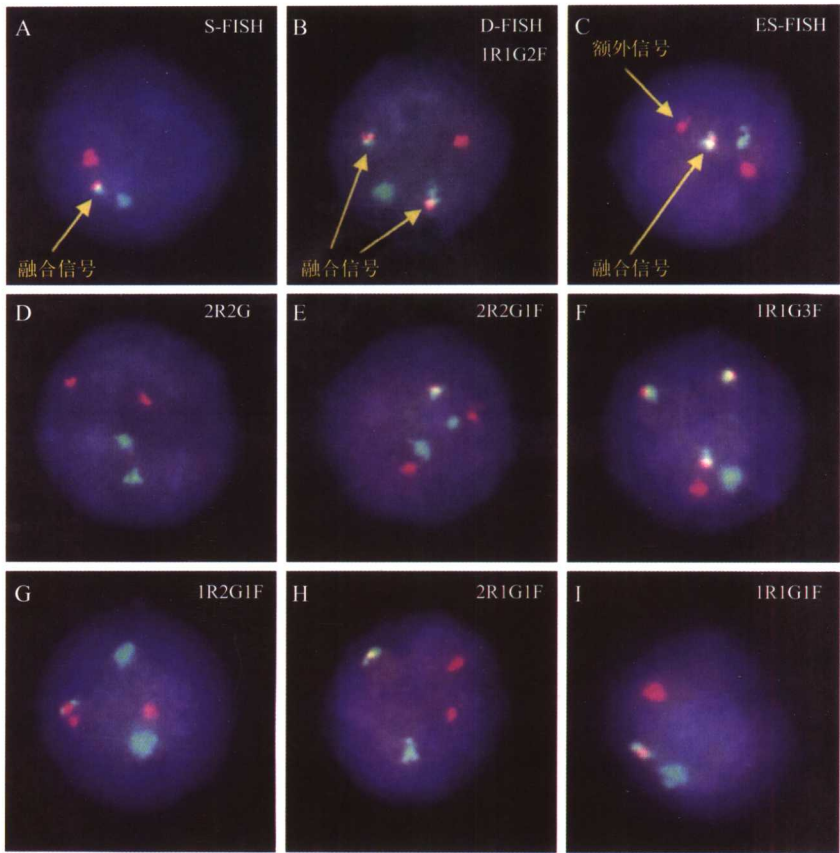


图 22-2 三个商业化 FISH 策略在 CML 患者的肿瘤细胞中能够检测到 *BCR* 和 *ABL* 融合。(A) 在带有 *t*(9;22)(q34;q11.2) 的细胞核中, S-FISH 产生一个红色、一个绿色和一个黄色融合信号。(B) D-FISH 产生 1R1G2F 信号。(C) ES-FISH 产生一个红色、一个绿色、一个小红色和一个黄色融合信号。代表不同 CML 患者间期细胞核的 *BCR* 和 *ABL* 的 Vysis™ D-FISH 类型。(D) 正常核有 2R2G 信号。(E) 带有复杂 Ph 染色体的细胞核有 2R2G1F 信号。(F) 带有 *t*(9;22)(q34;q11.2) 和一个额外 Ph 染色体的细胞核有 1R1G3F 信号。图 (G~I) 中描述的是通过细胞遗传机制产生的带有不典型 D-FISH 类型的细胞核。

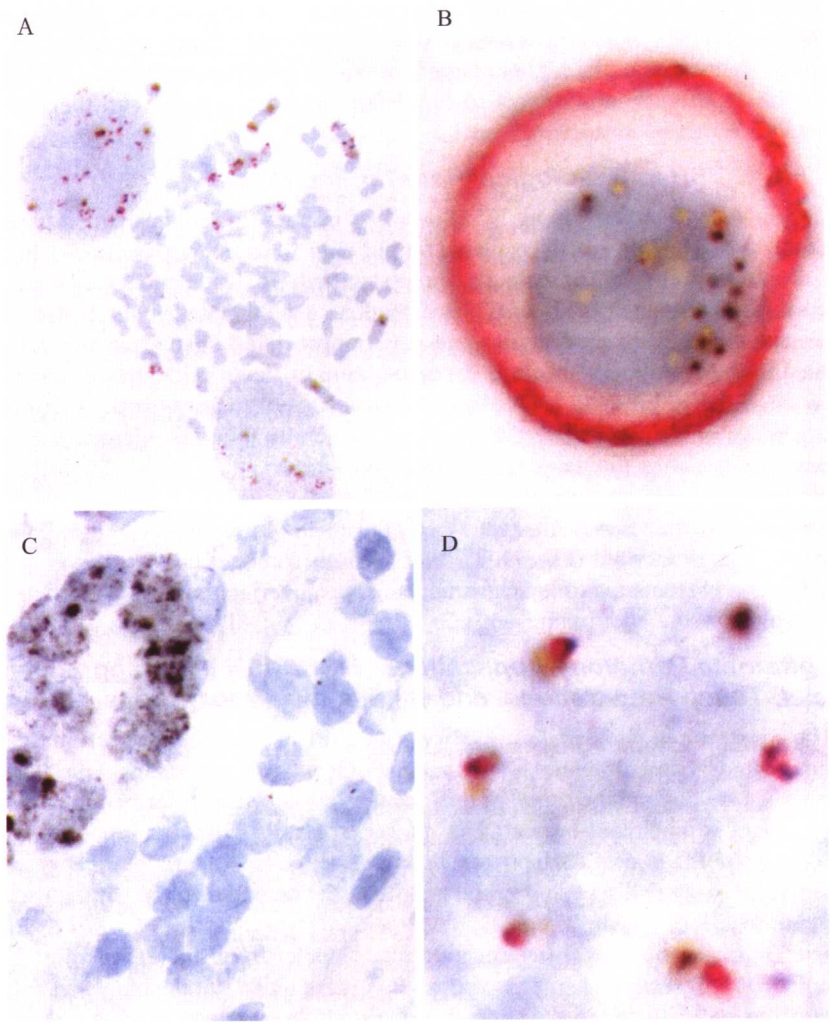


图 23-1 (A) 用双色 FISH 分析乳腺癌细胞系 17 号染色体着丝粒 (DAB) 和 *ERBB2*(*HER2/NEU*) (深红色), 表明 17 号染色体部分非整倍体和高水平 *ERB2* 扩增。(B) 免疫组化和 CISH 共分析浸润性乳腺癌细胞块的 *ERBB2*(*HER2/NEU*) 蛋白质 (深红色) 和基因组位点 (*DAB*)。膜相关 *ERBB2* 强表达是由于高水平基因组扩增引起。(C) 在神经母细胞瘤石蜡切片中高水平 *MYCN* (*N-myc*) 基因组扩增。*MYCN* 扩增的异质性是明显的, 在视野右侧部分的肿瘤细胞无扩增。(D) 用双色 FISH 分析 Burkitt 淋巴瘤石蜡切片表明染色体 8q24 的易位导致 *MYC* 基因重排。相互邻近的红色和棕色信号对代表未发生重排的 8 号染色体, 而独立的红色或棕色信号 (右上角) 代表易位染色体。

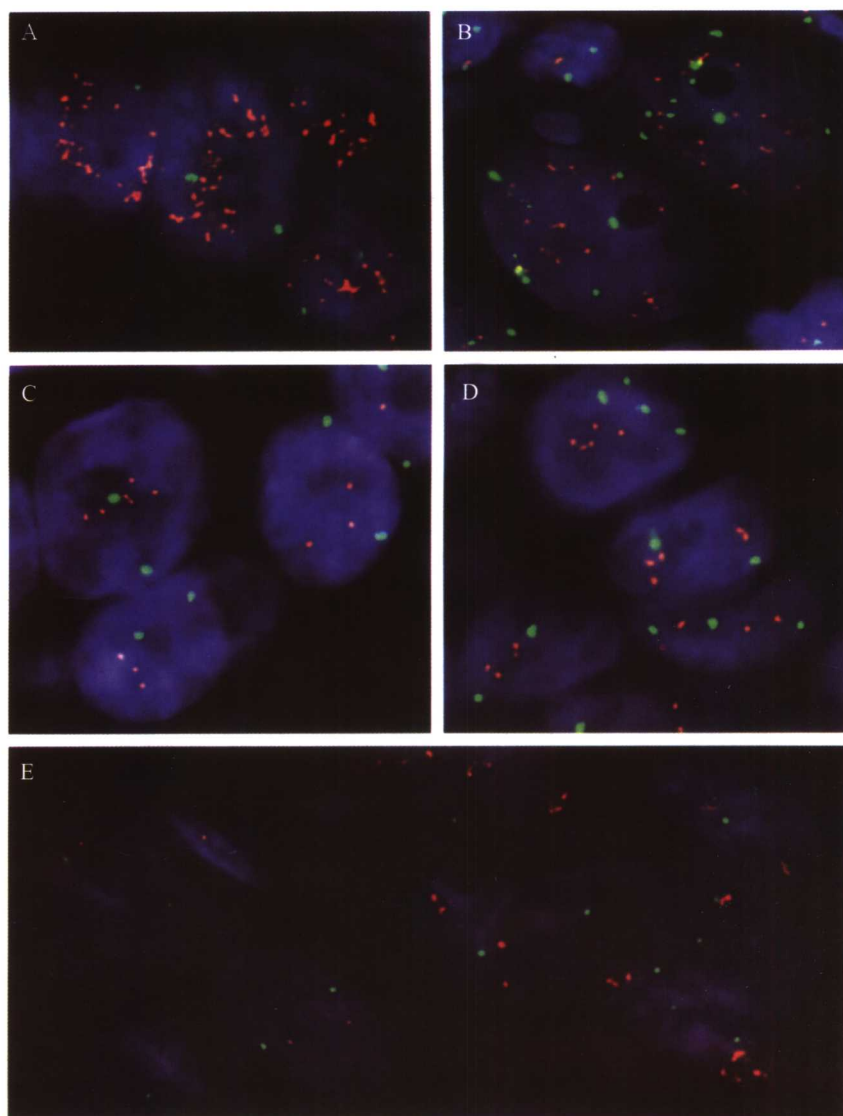


图 24-1 乳腺肿瘤间期细胞核的 HER2 FISH 检测。HER2 探针标记为红色，17 号染色体着丝粒探针标记为绿色 (Path Vysion HER-2 DNA 探针试剂盒, Vysis, Downers Grove, IL)。用美国 Applied Imaging, Santa Clara, CA 的 CytoVision 软件采集图像。(A) HER2 高度扩增，17 号染色体呈正常的双拷贝。(B) HER2 高度扩增，17 号染色体呈多拷贝。(C) HER2 多于双拷贝，17 号染色体呈正常的双拷贝。(D) 每个细胞的 HER2 为 5 个拷贝，17 号染色体呈多体性。(E) 肿瘤内异质性，DCIS 细胞有 HER2 扩增 (右)，浸润性肿瘤细胞无扩增 (左)。

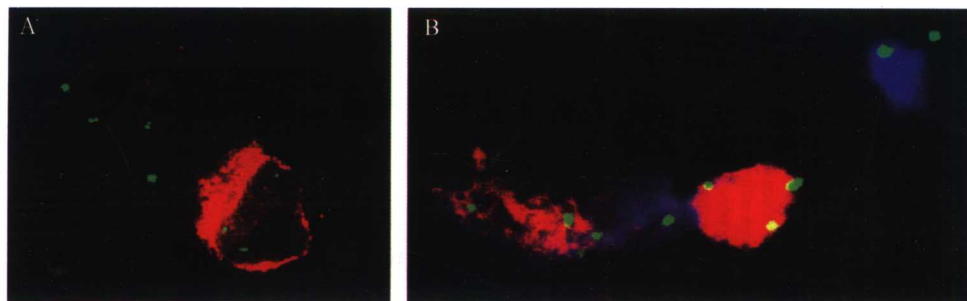


图 26-1 在自然杀伤细胞白血病中, 进行荧光免疫表型和 FISH 共分析。(A) 免疫表型用单克隆鼠抗人 CD56 识别自然杀伤细胞。鼠抗人 CD56 在 Cy3 (红) 滤光片下可以观察到。生物素标记 D7Z1 DNA 的 7 号染色体着丝粒探针, 在 FITC 滤光片下可以观察到。CD56 阳性自然杀伤细胞显示出 3 个 D7Z1 杂交信号, 为 7 号三体; 而相邻的 CD56 阴性自然杀伤细胞只有 2 个正常的 D7Z1 信号。故自然杀伤细胞白血病的肿瘤克隆限制在 CD56 阳性自然杀伤细胞群中。(B) 免疫表型实验中, 单克隆鼠抗人 Ki-67 抗体在 Cy3 (红) 滤光片下可以观察到。生物素标记 7 号染色体着丝粒探针, 在 FITC 滤光片下可以观察到。细胞用 DAPI(蓝)复染。两个细胞显示 3 个 D7Z1 杂交信号, 说明为 7 号三体。这些肿瘤细胞也显示很强的鼠抗人 Ki-67 抗体荧光染色 (红色), 说明增殖水平很高。相邻的细胞只有 2 个正常 D7Z1 信号, 鼠抗人 Ki-67 抗体荧光染色很低或阴性。故在自然杀伤细胞白血病和淋巴瘤中, 染色体异常局限在 CD56 阳性肿瘤细胞群, 而肿瘤细胞群比起正常细胞有较高的增殖水平。

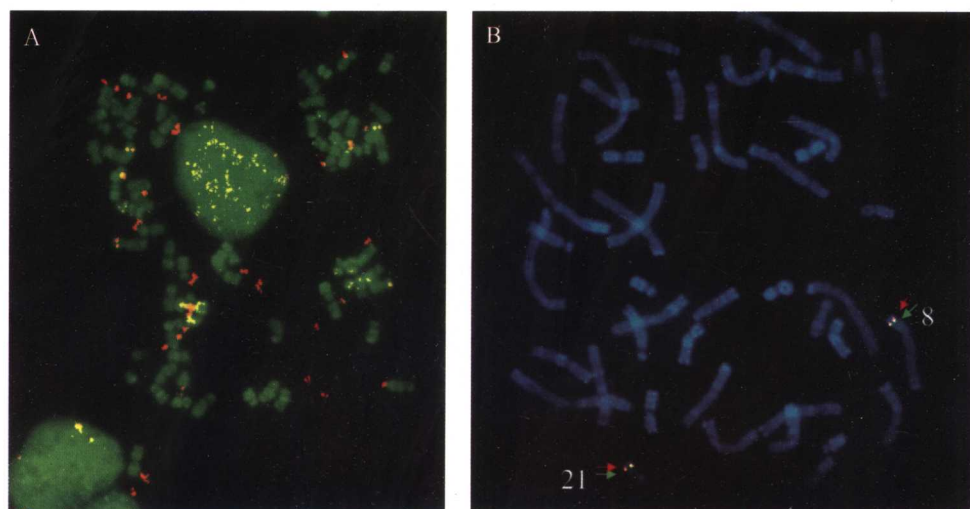


图 27-2 (A) BAC 1D9 在甲状腺滤泡癌细胞系 WRO 中的 FISH 图像。除了检测到 2p21 的 FITC 信号 (黄色点) 为 3 个拷贝的正常 2 号染色体以外, 在双微染色体和相近的间期核中也可看到很明显的信号簇, 代表 2p21 的扩增。(B) 用整合 BAC 资源库中与 STS 相连的 BAC 克隆进行双色 FISH, 分析 21 号和 8 号染色体之间的易位^[1]。BAC D21S348 (用生物素-14-dATP 标记) 和 D21S231 (用地高辛-11-dUTP 标记) 同时进行与中期染色体分裂相杂交, 分别用 FITC (绿色信号) 和罗丹明 (红色信号) 检测。两个标记物均揭示出从 21q22.3 到 8p23.3 的易位。

翻译人员名单

(按姓名拼音排列)

陈 艳	黄 英	刘青杰
马 芬	王晓维	韦 丽
吴 畏	袁海昕	曾 瑄
赵宝锋		

校对人员名单

(按姓名拼音排列)

陈德清	陈晓宁	范耀山
刘青杰	王明荣	曾 瑄

译者序

荧光原位杂交 (FISH) 技术是在 20 世纪 80 年代末期建立起来的。FISH 的应用研究证实: 该技术成为衔接细胞遗传学和分子遗传学之间的一道桥梁, 并开创了一门新的学科——分子细胞遗传学 (molecular cytogenetics)。目前 FISH 技术在国际上广泛应用于基因定位、肿瘤遗传学、辐射生物学、遗传病诊断和产前诊断、试管婴儿植入前诊断等领域。

我国的分子细胞遗传学开始于 20 世纪 90 年代初, 由于探针、荧光显微镜及图像分析系统都比较昂贵, 仅有几家大型医疗和科研机构能进行 FISH 实验及结果分析。随着我国经济的发展和科研经费投入的增加, 各大医院、科研机构相关实验室以及具有辅助生殖技术的中心开始关注 FISH 及相关技术, 并配备了仪器设备。在十几年间, 分子细胞遗传学相关技术也在全国各地的实验室相继建立。随着对 FISH 等技术应用需求的增加, 对相关技术的培训要求也增加, 但目前国内没有一本专著详细介绍分子细胞遗传学相关技术及其应用。许多科技人员和临床医生苦于不知道如何开始在自己的实验室建立 FISH 相关实验方法, 实验中出现问题也不知如何解决。

在 2003 年 *Am. J. Hum. Genet.* 和 *J. Pathol.* 的两篇书评中我们了解到 Humana Press 出版的 *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications* 一书是 *Methods in Molecular Biology* 系列丛书的第 204 卷, 正好可以满足国内学者按步骤进行分子细胞遗传学技术操作的需求。该书是一部有关分子细胞遗传学相关技术的权威性著作, 全面概括了当代分子细胞遗传学相关技术从基本原理、技术方法到实际应用的各个方面, 实为关于 FISH 相关技术原理、操作及应用的代表性著作。我们希望本书的翻译出版, 将有助于推动我国分子细胞遗传学技术的发展和普及。

本书的翻译人员均为医学临床或科研相关专业的一线科技人员、博士、硕士, 每位审校专家均在密切相关的研究、临床工作中积累了丰富的经验。在翻译过程中, 我们力求保持原书的本意, 逐句对应翻译, 有些新的名词在中文中还未确定如何翻译, 我们尽量将英文保留, 使读者在阅读过程中不会因为我们的不确切翻译而引起误解。但是原著中明显的错误我们经过科学查证后尽量给予改正, 以求更加合理。

在本书出版之际, 首先要感谢原著主编美国迈阿密大学的范耀山博士为我们提供了原著, 审校了部分章节并为中译本作序。中国医学科学院基础医学研究所

沈岩院士对本书的翻译给予了热情关心和大力支持，在此表示衷心的感谢！我们还要感谢中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所、国家人类基因组北方研究中心、北京协和医院、南京医科大学江苏省人民医院生殖中心、天津医科大学附属肿瘤医院、首都医科大学朝阳医院遗传中心和军事医学科学院基础医学研究所等单位的支持！

感谢科学出版社马学海博士和李悦编辑给予的支持，由于他们出色的工作本书才得以翻译和出版。

由于我们的知识、能力和水平的限制，对于某些技术的细节缺乏感性认识，在本书翻译过程中难免有错误和不妥之处，希望得到国内同道专家和读者的批评指正！

刘青杰

2006年6月