



FISH

荧光原位杂交技术

〔美〕 Barbara Beatty

〔加〕 Sabine Mai

〔加〕 Jeremy Squire

王 瑛 张诗武 主译

孙保存 审校

天津科技翻译出版公司

荧光原位杂交技术

编著:[美]Barbara Beatty

[加]Sabine Mai

[加]Jeremy Squire

主译:王瑛 张诗武

译者:王 瑛 张诗武 贾春实 高松源 臧凤琳

孙 燕 申 彦 李 翀 张 凡

审校:孙保存

天津科技翻译出版公司

图书在版编目(CIP)数据

荧光原位杂交技术/(美)贝蒂(Beatty, B.)等编著;王瑛,张诗武译.
—天津:天津科技翻译出版公司,2003.10

ISBN 7-5433-1658-7

I. 荧... II. ①贝...②王...③张... III. 染色体畸变-研究
IV. Q319

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 032579 号

出 版: 天津科技翻译出版公司

地 址: 天津市南开区白堤路 244 号

邮政编码: 300192

电 话: (022)24314802

传 真: (022)24310345

E - mail: tsttbc @ public.tpt.tj.cn

印 刷: 天津市宝坻区第二印刷厂印刷

发 行: 全国新华书店

版本记录: 787×1092 16 开本 17.75 印张 315 千字

2003 年 10 月第 1 版 2003 年 10 月第 1 次印刷

印数:2000 册

定价:58.00 元

(如发现印装问题,可与出版社调换)

序

随着细胞遗传学的飞速发展及在医学、生物学领域的广泛应用,各种新的技术不断问世,荧光原位杂交(FISH)即是其中一种,它是在细胞遗传学同DNA技术相结合的基础上而产生的一种在诊断遗传性疾病和恶性肿瘤方面具有十分重要价值的一项技术,该技术可以提供某些单独使用染色体核型分析为基础的传统细胞遗传学分析无法获得的重要信息,WHO已经将FISH技术作为诊断软组织肉瘤和淋巴造血系统肿瘤的重要手段之一。

目前在国内FISH技术尚未普及,FISH技术操作的一些关键环节也不十分成熟,因而急需一本详细介绍FISH技术的专著。本书是几位多年从事分子细胞遗传学研究的美国和加拿大科研人员联合编写而成,主要介绍了FISH技术的概况以及由其派生和发展的多色FISH(mFISH),比较基因组杂交(CGH)等技术及应用领域,此外,本书不仅提供明确、详细的操作方案,还阐述了FISH技术在各种具体实例上的应用。本书对国内实验室开展这项技术有着十分重要的参考和指导价值,对于从事生命科学研究的来说也不失为一本重要的参考书籍。

目前国内还没有一本详细介绍FISH技术的专著,基于这种情况,我们翻译出版了这本书,相信该书会对从事分子生物学、细胞遗传学的医师及研究人员有所帮助,对推动染色体基因诊断的发展会做出积极贡献。由于译者水平有限,且这项技术刚刚起步,一些专业术语翻译尚不明确,书中错误之处在所难免,希望同行批评指正。

译者

2003年8月15日

前 言

本书写作的目的是为那些需要使用 FISH 技术来研究细胞内基因水平变化的临床、基础的研究人员提供重要的操作方法。本书不仅提供明确、详细的操作方案,还阐述了 FISH 技术应用于各种具体实例的区别,这些实例均来源于作者实验室研究与临床实验。本书主要从提供基本原则,易于遵循操作方案及针对问题部分的角度介绍 FISH 技术,包括探针标记、cDNA 微阵列及 DNA 芯片上多色 FISH 技术应用等。本书多数章节的实验数据来源于动物器官模型,例如鼠模型以及相关的网站资料。

撰写这本书的动机是目前还没有一本介绍 FISH 技术在实践应用方面的书籍。此外,FISH 技术还有许多其他的用途,但由于其价格昂贵且在实验研究和临床中常用的 FISH 方法的多变性还没有克服而未得到广泛应用。这本书里提供的信息主要为学生、技术人员及实验室研究人员设计,并希望应用这种先进的技术能做出更多的富有挑战性的实验。

衷心感谢热忱编写本书优秀章节以及帮助该书出版的同仁。希望本书对诸位的研究有所帮助,并为将来的再版提出意见和建议。

2002 年 2 月

B.B

S.M

J.S.

缩 写

BAC	细菌人工染色体	PAC	P1 人工染色体
BrdU	5-溴尿嘧啶	PBS	磷酸盐缓冲液
BSA	牛血清蛋白	PCR	聚合酶链反应
CCD	冷光源相机	PFA	多聚甲醛
CGH	比较基因组杂交	PHA	光血凝素
CLSM	激光共聚焦扫描显微镜	PI	碘化丙啶
DIG	地高辛	PMT	光子放大器
DMSO	二甲基亚砷	PNA	肽核苷酸
DNP	二硝基酚	PSF	点延伸功能
DOP	退化寡核苷酸引物	RBC	血红蛋白
EST	表达序列标记	RI	曲光指数
FCS	胎儿牛血清	SAGE	基因表达连续分析
FISH	荧光原位杂交	SCOMP	单细胞比较基因组杂交
FITC	异硫氰酸荧光素	SKY	光谱核型分析
HSR	同源染色区	SSC	枸橼酸钠盐
M-FISH	多色-FISH	YAC	酵母人工染色体

目 录

方法和步骤目录	ix
编写	xiv
第一章 概述	1
参考文献	4
第二章 FISH 探针和标记技术	5
1 概述	5
2 荧光素发光原理	5
荧光素和半抗原	6
常用的荧光素	7
滤光片的选择	8
3 核酸探针	8
探针类型	8
探针克隆的制备	9
酶促扩增探针	15
合成寡核苷酸探针	17
4 荧光素或半抗原与核苷酸的结合	17
5 探针标记	20
缺口平移	20
随机引物标记	22
RNA 转录标记	23
PCR 标记	25
6 DNA 标记后的处理和纯化	26
DNA 酶处理(适用于 FISH 和其他杂交方法)	26
探针沉淀之前反应混合体系中未结合的核苷酸与 BSA 的去除	27
7 其他标记系统	27
荧光素或半抗原与氨基修饰的核苷酸的结合	27
其他化学结合系统	27
荧光素、半抗原与蛋白质的直接化学结合	27
参考文献	29
第三章 单拷贝基因的人类染色体定位	30

1	概述	30
2	用于 FISH 定位的 DNA 探针	30
	网站上 FISH 探针的选择鉴别	30
	FISH 定位探针制备	33
3	靶 DNA 制备	35
	中期染色体	35
	间期核定位	38
	低渗处理和固定	39
4	样本的准备	40
	靶玻片的预处理	42
5	探针和靶 DNA 的变性和杂交	43
6	杂交后洗涤	45
7	免疫检测	46
8	染色体复染和显带	48
9	显微镜和图像分析	49
10	FISH 定位过程中应该考虑的要点	50
	中期染色体单探针的 FISH 定位	50
	多探针的相关定位	51
	参考文献	54
第四章	鼠染色体制备	57
1	用于显带和原位杂交鼠染色体的制备	57
	概述	57
2	鼠染色体姬姆萨 - 胰蛋白酶显带	64
3	鼠染色体分子细胞遗传学研究方法	66
	参考文献	76
第五章	使用染色质和 DNA 纤维的高分辨率 FISH 定位	78
1	概述	78
2	染色质纤维制备中的实际问题	79
3	染色质纤维 FISH 所需的常规设备	79
4	染色质纤维制备	79
5	DNA 纤维制备	84
6	FISH	86
	DNA 探针标记	86
	杂交	88
	洗涤	90
	检测与扩增	91

	复染和抗褪色	92
7	照相	93
	参考文献	94
第六章	RNA FISH 技术在观察基因表达和核结构中的应用	96
1	概述	96
2	细胞制备	98
	清洗剂抽提细胞样本	99
	细胞遗传学准备	100
3	探针制备	101
4	与 RNA 杂交	103
	RNA 杂交基本程序	104
	寡核苷酸杂交	105
5	与 DNA 杂交	106
	检测热变性的细胞 DNA	107
	应用 NaOH 变性和 RNA 水解的 DNA FISH	108
6	多重标记技术及其应用	108
	RNA 和 DNA 的同时检测	108
	应用 FISH 同时检测蛋白质	109
	染色体着色和 RNA FISH	111
	用内含子和 cDNA 探针区分转录产物	112
	外显子抑制杂交:特异竞争应用实例	113
7	观察分析结果	116
	显微镜	116
	数码图像	117
8	结语	119
	参考文献	120
第七章	三维核 FISH	122
1	概述	122
2	细胞的制备和固定	126
	载玻片的准备	126
	贴壁细胞的培养和固定	128
	悬浮细胞的制备、贴壁和固定	129
3	外周血细胞的分离	130
4	杂交前预处理	131
5	建立杂交体系	134
	探针标记	134

探针制备	135
DNA 变性 & 杂交	135
6 杂交后洗涤, 检测, 核复染和封片	137
杂交后洗涤	137
杂交探针检测	137
核复染及抗褪色介质中封固细胞	141
7 3D FISH 和复制标记	142
复制标记	142
FISH 操作后卤化脱氧尿嘧啶核苷酸的检测	143
8 蛋白质免疫检测与 3D FISH 联合应用	145
9 3D FISH 过程中染色质结构的保持	146
10 共聚焦显微镜	148
滤光片的选择	149
采图条件	151
仪器校订	152
显示	153
计量和去折叠	155
参考文献	158
第八章 分裂中期染色体和 DNA 芯片的比较基因组杂交	161
1 概述	161
2 中期染色体的制备	163
3 基因组 DNA 的分离	163
4 单细胞群分离的显微操作	169
5 通用 PCR 对小细胞群基因组 DNA 的扩增	170
6 探针标记	173
7 比较基因组杂交	176
中期染色体变性	176
探针混合物	177
原位杂交和信号检测	178
8 图像采集与评价	179
9 CGH 实验中一些问题的解决方法	180
10 CGH 实验与通用 PCR 联合应用时所遇问题的解决方法	181
11 新进展: 阵列 CGH	181
参考文献	183
第九章 FISH 在临床细胞遗传学中的应用	185
1 概述	185

2	临床实验中常用的 FISH 探针	185
3	用于 FISH 分析的临床样本制备	186
	用于 FISH 分析中期染色体的制备	187
	FISH 分析临床样本间期细胞核的制备	189
4	评价和报告 FISH 结果的标准	195
	显微镜下挑选细胞进行 FISH 的注意事项	196
	间期 FISH 信号评价和计数标准	196
	关于间期 FISH 结果解释的注意事项	198
5	临床细胞遗传学中常用的一些 FISH 探针	198
	微缺失综合征的 FISH 分析	198
	三色融合(易位/倒位)探针的使用	200
	FISH 探针在评价基因扩增中的应用	202
6	附录(分子细胞遗传学临床资源的相关网站)	203
	参考文献	203
第十章 多色 FISH 和光谱核型分析		205
1	概述	205
2	光谱核型分析(SKY)	206
3	M - FISH	206
4	M - FISH 及 SKY 的方法和步骤	208
5	图像采集和分析的注意事项	214
	SKY 图像分析	215
	M - FISH 图像分析	215
6	解决问题的方法	216
	参考文献	218
第十一章 应用 cDNA 微阵列进行基因表达的荧光杂交分析		222
1	概述	222
	基因表达序列分析	222
	寡核苷酸芯片	222
	cDNA 芯片	223
2	cDNA 芯片的制备	223
	培养 cDNA 细菌克隆	225
	芯片点样	231
3	靶产品	232
4	杂交	236
5	图像采集	237
6	图像分析和标准化	238

7	敏感性 & 特异性	239
8	数据处理 & 统计学分析	239
9	小结	239
	参考文献	240
	供应商目录	242

方法和步骤

目 录

核酸探针	8
制备质粒 DNA 标准碱溶液	9
噬菌体 DNA 的制备	10
自粘粒、PAC 克隆和 BAC 克隆分离 DNA	12
制备酵母菌基因组 DNA	14
制备 DOP-PCR 探针文库	16
荧光素或半抗原与核苷酸的结合	17
荧光素或半抗原与 dUTP 结合	18
探针标记	20
缺口平移	21
随机引物标记	22
RNA 转录标记	24
PCR 标记	25
其他标记体系	27
蛋白质的琥珀酰酯标记	28
用于 FISH 定位的 DNA 探针	30
标记探针 DNA 的乙醇沉淀	34
靶 DNA 制备	35
外周血淋巴细胞的培养和收获	36
细胞分裂周期同步化与 BrdU 的结合	37
成纤维细胞 G0-G1 间期核的制备	38
低渗处理和细胞固定	39
样本的准备	40
载玻片制备	41
靶玻片的预处理	42
探针和靶 DNA 的变性和杂交	43
DNA 变性和杂交	44
杂交后洗涤	45
杂交后洗涤	45
免疫检测	46

生物素或地高辛标记探针的检测	47
用于显带和原位杂交鼠染色体的制备	57
鼠骨髓细胞染色体制备	58
离心沉淀物固定 ^a	59
细胞悬液固定 ^a	60
其他悬液固定法 ^a	60
鼠脾细胞的染色体制备	61
小鼠胸腺细胞(或者淋巴细胞)染色体制备 ^a	61
鼠浆细胞瘤染色体制备	62
用于分子细胞遗传学研究的鼠染色体铺片制备	63
测定用于染色体制备的细胞分裂指数	63
鼠染色体姬姆萨-胰蛋白酶显带	64
小鼠染色体姬姆萨-胰蛋白酶显带	65
用 H ₂ O ₂ 预处理,老化载玻片	66
鼠染色体分子细胞遗传学研究方法	66
FISH 探针标记、标记效率的评价以及探针滴定 ^a	68
标记质量的判定(杂交实验)	70
荧光原位杂交	71
FISH 杂交信号的检测	72
染色体着色	74
光谱核型分析(SKY)	74
SKY 显带	76
染色质纤维制备	79
药物处理培养的淋巴细胞制备染色质纤维	80
碱性缓冲液制备染色质纤维	82
细胞离心制备染色质纤维	83
DNA 纤维制备	84
DNA 纤维制备	84
使用凝胶块制备染色质纤维	85
FISH	86
探针标记	86
探针变性和预杂交	88
杂交玻片的制备	89
杂交	90
洗涤	90
信号放大检测 ^a	91

复染和抗褪色	92
细胞制备	98
单层细胞提取	99
细胞遗传学的细胞及染色体的制备	101
探针制备	101
DNA 探针缺口平移	102
与 RNA 杂交	103
RNA 杂交基本程序	104
与 DNA 杂交	106
DNA 热变性	107
DNA 碱变性	108
多重标记技术及其应用	108
RNA 和 DNA 序列检测	109
蛋白质的免疫染色	110
染色体杂交	112
外显子抑制	115
细胞的制备和固定	126
载玻片的准备	127
贴壁细胞的传代培养和固定	128
悬浮液中细胞的制备和固定	129
外周血细胞的分离	130
外周血中单核细胞的分离	130
杂交前预处理	131
固定后处理	133
建立杂交体系	134
探针装载、变性和杂交	136
杂交后洗涤、检测、核复染和封片	137
杂交后洗涤	137
杂交探针上半抗原检测	139
核复染和抗褪色剂封片	141
3D FISH 和复制标记	142
溴化脱氧尿嘧啶(BrdU)标记复制	142
3D FISH 后溴化脱氧尿嘧啶(BrdU)标记检测	144
共聚焦显微镜	148
带荧光小滴载玻片的制备	153
染色质移位的测量	154

基因组 DNA 的分离	163
外周血细胞中期染色体的制备	165
血液中基因组 DNA 的分离	166
实体组织样本基因组 DNA 的分离	168
石蜡包埋组织中基因组 DNA 的分离	168
单细胞群分离的显微操作	169
单细胞群的显微操作	169
通用 PCR 对小细胞群基因组 DNA 的扩增	170
应用 DOP - PCR 扩增少量基因组 DNA	170
应用 SCOMP - PCR 扩增单细胞群基因组 DNA(13) ^a	171
探针标记	173
缺口平移法标记探针 DNA	174
比较基因组杂交	176
玻片上的染色体 DNA 变性	176
探针混合和变性	177
原位杂交	178
用于 FISH 分析的临床样本制备	186
分裂期铺片上 FISH	189
石蜡切片上 FISH	192
用于 FISH 分析石蜡包埋组织完整细胞核的分离	194
评价和报告 FISH 结果的标准	195
杂交效率筛选前评价及确定	195
用于 FISH 分析显微镜的选择标准	196
进行间期 FISH 检测的通用标准	197
M - FISH 及 SKY 的方法和步骤	208
探针标记	208
SKY 中期染色体铺片的预处理和变性	208
M - FISH 分裂中期染色体铺片的预处理和变性	209
SKY 探针沉淀及其与变性预处理载玻片杂交	211
M - FISH 探针沉淀及其与变性预处理载玻片杂交	212
SKY 杂交后洗涤和半抗原检测	212
M - FISH 杂交后洗涤和半抗原检测	214
cDNA 芯片的制备	223
用于微阵列的培养克隆	225
质粒 DNA 的分离	226
克隆 PCR 扩增	227

PCR 产物的量化	228
PCR 产物的纯化	229
多聚赖氨酸预处理玻片	230
琥珀酸酐印迹后封闭玻片	231
靶产品	232
RNA 提取*	233
荧光素直接标记 cDNA	234
靶的纯化	235
杂交	236
芯片杂交	236
杂交后玻片洗涤	237