



原位杂交和原位 PCR 技术在 鱼类基因定位中的应用

黄 梅^{1,2} 袁仕取² 朱作言¹

(1. 中国科学院水生生物研究所;淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072;

2. 陕西师范大学生命科学院,西安 710062)

APPLICATION OF IN SITU HYBRIDIZATION AND IN SITU PCR ON LOCATION OF GENE IN FISHES

HUANG Mei^{1,2} YUAN Shi-qu² and ZHU Zuo-yan¹

(1. *The State Key Laboratory of Fresh Water Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;* 2. *Life Science College ShanXi Normal University, Xi'an 710062*)

关键词: 原位杂交;原位 PCR;转植基因;转基因鱼

Key words: In situ hybridization; In situ PCR; Transgene; Transgenic fish

中图分类号: Q343.1⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0195-07

染色体原位杂交(in situ hybridization, ISH)是基因物理定位的主要方法之一,它根据核酸分子碱基互补配对的原理,将标记的外源核酸探针与染色体上变性处理后的单链DNA互补配对,再经检测而将靶顺序在染色体上的位置显示出来。

原位PCR技术是将原位杂交与PCR技术有机的结合,在原位扩增目的DNA片段,并在原位检测其扩增产物,因而兼有PCR及原位杂交技术二者的优越性:既可以同时获得组织及细胞的形态结构信息与分子信息,进行定性、定位分析,又具有比原位杂交更好的敏感性与专一性。

染色体原位杂交和原位PCR这两种技术是基因定位中简便而直接的方法,随着基因组研究和转基因生物研究的深入与发展,阐明各种基因在染色体上的具体位置愈加重要。本文拟从原位杂交和原位PCR的发展、原理、方法和在鱼类基因的染色体定位等方面进行评述和讨论。

收稿日期:2000-01-29;修订日期:2000-04-17

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:39730290)

作者简介:黄 梅(1971—),女,重庆市人;硕士;从事分子遗传学研究

通讯作者:朱作言

1 原位杂交技术的原理、方法和应用

1.1 原位杂交技术的研究概况

1969 年 Gall 和 Pardue^[1] 利用染色体原位杂交技术成功地定位了爪蟾中的多拷贝顺序, 标志着这一技术的建立。初期的原位杂交技术多用于对基因组中重复顺序的定位, 随着重组 DNA 技术和各种高效标记技术的完善以及可以显著提高杂交效率的硫酸葡聚糖 (Dextran sulfate) 的应用, Garhard^[2] 和 Harper^[3] 等成功地将这一技术应用于单拷贝基因和 DNA 片段的定位。早期的标记方法多采用放射性同位素, 其优点是灵敏度高, 杂交信号强, 尤其是对单拷贝 DNA 顺序定位十分有用。但是, 其缺点也十分明显, 如实验周期长、不稳定、不安全、统计工作繁琐等。因此, 非放射性标记的染色体原位杂交技术应运而生。1982 年 Langer 等^[4] 首先采用了生物素标记的探针进行染色体原位杂交, 标志着非放射性原位杂交技术的建立。后来, 随着技术的改进, 更多的半抗原物质被作为标记, 如 2,4-二硝基苯酸 (DM)、硫酸盐、N-2 酰氨苄 (AAF) 和地高辛等。尤其是地高辛配基的采用, 大大提高了灵敏度。非放射性原位杂交具有以下优点: 标记的探针稳定, 非特异杂交信号污染少, 检测简便、快速和安全等。原位杂交技术的应用不仅促进了生物学及医学研究的发展^[5], 而且在人类、灵长类、鼠等多种哺乳动物的基因定位研究中发挥了重要作用^[6,7]。相对而言, 原位杂交技术在鱼类基因及 DNA 顺序定位研究中的应用起步较晚, 这与鱼类基因组研究相对滞后和鱼类染色体制片难度较大有关。

1.2 鱼类染色体的原位杂交

1.2.1 DNA 探针标记 DNA 探针标记是原位杂交必备的工作之一。最初的原位杂交是用放射性同位素标记。用此类标记探针进行的原位杂交虽然灵敏度高, 但检测时间长, 空间分辨率有限, 而且存在放射性的防护和安全问题, 故后来被非放射性标记所取代。非放射性标记最常使用的标记分子是生物素、地高辛和荧光素, 标记方法有 DNA 缺口平移法, 随机引物法或多聚酶链反应 (PCR) 法^[8-10]。由于含功能基团的寡核苷酸的化学合成在八十年代已有报道, 故也可以通过寡核苷酸进行末端标记的方法来标记探针。

1.2.2 染色体制片 高质量的染色体制片是染色体原位杂交成功的基础。鱼类染色体原位杂交所用的染色体制片绝大多数为有丝分裂中期相, 多由血细胞培养法与肾细胞悬液法制备^[11]。但也有作者用黄鳝的减数分裂染色体制片进行原位杂交并取得成功的报道^[12]。

1.2.3 分子杂交与洗涤 染色体原位杂交的基本原理与 DNA Southern 氏印迹杂交或 DNA 斑点杂交的原理相同, 因此二者在操作与反应条件上存在着相似之处。

染色体原位杂交前必须对染色体 DNA 进行变性处理, 这种处理通常是用对变性液中的染色体制片进行加热, 即将配好的变性液置于 72℃ 的变性液中变性 2.5min 来完成 (变性温度和时间对杂交结果至关重要)。变性液一般含甲酰胺与 SSC (50%—80% 甲酰胺 2×SSC)。变性条件通常涉及三个因素, 即甲酰胺浓度, 溶液温度与变性时间。到目前为止, 鱼类染色体原位杂交所使用的变性条件比较接近。变性时间基本上采用 2—3min^[11,13], 甲酰胺浓度大都采用 50%^[11,14], 也有采用 70%^[13] 和 80%^[15]。这种变性条件的差异可能与所使用的材料, 待检测的基因及染色体制片保存的“片龄”等有关。

染色体原位杂交是在含有甲酰胺,盐,葡聚糖硫酸酯及封闭 DNA(Blocking DNA)的缓冲液中进行的。其中,杂交液中甲酰胺与盐的相对浓度决定杂交反应的严格度。原位杂交所用的甲酰胺浓度大多为 50%—80%^[11,13]。鱼类染色体原位杂交所用的甲酰胺浓度大多为 50%,杂交温度一般为 37℃^[8,11],42℃^[13,15],65℃^[12,14],68℃^[16]等,杂交时间为 16—20h^[10,11]。有用 42℃ 作为杂交温度,在这一条件下,杂交时间应为 12h 为宜^[13],杂交时间过长会出现非特异性信号。

杂交液中的封闭 DNA 是用来减少标记探针 DNA 的非特异性结合的。对哺乳动物染色体而言,通常将鲱鱼精巢 DNA 用作封闭 DNA;而对于鱼的染色体,用人胎盘 DNA 作为封闭剂也可取得良好的效果^[15]。

杂交反应后,必须对载片进行洗涤以除去未杂交的探针。洗涤条件类似于杂交反应条件,但有一点例外,即洗涤温度应随探针 DNA 的基因组拷贝数与所要求的严格度而变化。对鱼类染色体原位杂交而言,杂交后洗涤通常在常规严格度条件下进行,但也有作者出于特殊的实验目的而在或高或低两种不同严格度下进行^[8]。

1.2.4 杂交信号的检测 杂交信号检测的方法视标记探针而定。对于放射性标记的探针,可用核示踪乳剂(Nuclear track emulsions)进行检测^[6,7];对于地高辛标记的探针,可用免疫化学法进行检测^[13];对于荧光素标记的探针,既可直接进行检测,又可用免疫化学法进行检测,但直接检测法的灵敏度较低^[17];而对于生物素标记的探针,则有两种检测系统,即抗生物素抗体系统与生物素-卵白素(Avidin)系统^[17]。鱼类染色体原位杂交广泛使用的方法是荧光原位杂交。此类杂交信号的检测需要在带有合适滤光镜的荧光显微镜下进行。

1.2.5 染色体复染与显带 为使杂交信号易于辨认,须对染色体进行复染,对于非荧光染色体原位杂交而言,通常只须用 Giemsa 复染即可^[11],而对于荧光染色体原位杂交而言,须用荧光素如 Hoescht33258、DAPI 与碘丙啉(Propidium iodide,PI)等对染色体进行复染^[17]。为提高基因定位的精确性或鉴别特异性的染色体,可对染色体进行显带处理。在非放射性标记的染色体原位杂交中,常用的显带技术有杂交前的 GTG 显带和杂交后的 R 带(复制带)显带^[18]。在哺乳动物特异染色体鉴别中所使用的显带方法有用 DAPI 显示的 G 带,或用 5-溴脱氧尿苷(5-Brdu)处理后 Hoescht 染色显示的 R 带,或用 AluI 重复顺序或 LINE 重复顺序进行荧光原位杂交分别 R 带与 G 带^[19]。鱼类中使用较多的显带方法是 C 带、Q 带和 RE 带^[9]。尽管鱼类染色体显带工作难度较大,Peudas 等在大西洋鲑鱼有丝分裂染色体荧光原位杂交后用 DAPI 复染 C 带样带型^[8],李奎等在黄鳝减数分裂染色体原位杂交后成功地进行了 G 带显示研究^[12]。

1.3 染色体原位杂交在鱼类基因定位中的应用

相对哺乳动物基因定位工作而言,鱼类的相关研究开展得较晚。自 1989 年张锡元等将人类绒毛膜促性腺激素(HCG)基因类似顺序定位于草鱼 m 组一染色体短臂末端后^[11],鱼类染色体基因定位工作取得了一定进展。原位杂交技术主要用于鱼类特异重复 DNA 的定位^[12],多拷贝基因的定位^[18],鱼类染色体的重排与丢失^[19],鱼类染色体特异探针的制备与应用^[20]。鱼类外源基因的成功定位还未见有报道。最近,王泽群等用地高辛标记的鲤鱼基因组 DNA 重复顺序 CR1,对兴国红鲤的染色体进行原位杂交,将 CR1 基因

定位于兴国红鲤一些染色体的着丝粒区,对鱼类染色体的原位杂交技术做了初步的探讨,并在由兴国红鲤激动发育的“异育银鲫”染色体制片上找到了 CR1 的杂交信号^[12]。

1.4 染色体原位杂交技术的发展

染色体原位杂交技术建立二十多年来,在基因定位中得到广泛应用,促进了生物学及医学基础理论研究的发展,染色体原位杂交技术已经得到很大的拓展,以提高检出率、缩短实验周期、加快作图过程等为主要目的的各种技术不断发展与完善。其中较为突出的有荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)^[20],引物原位延伸标记技术(Primed in situ labeling, PRINS)^[21]和原位 PCR 技术^[22]。荧光原位杂交是用特殊的荧光抗体结合到带有抗原的探针上。荧光素如 Hoescht 33258, DAPI 与碘丙啶(PI)进行复染,荧光原位杂交具有本底低,信号清晰等优点,而受到众多研究者的青睐。用荧光原位杂交已定位了鱼类的高度重复 rDNAs 和鲑鱼的组蛋白多拷贝基因^[19,20];PRINS 是原位 PCR 技术的第一步,用特异的引物通过一个 PCR 延伸检测到人染色体组中卫星 DNA,用 PRINS 技术定位黄鳝二价体中的基因片段^[23]。PRINS 技术具有染色本底低、分析时间短和信号强度高等特点,已被广泛用于染色体作图、显带、核酸序列分析和基因组结构研究中。在 PRINS 技术基础上发展了循环原位延伸的直接原位 PCR 技术,在单拷贝和低拷贝基因物理定位中显示了强大的生命力。

2 原位 PCR 技术的原理、方法和应用

2.1 染色体原位 PCR 的原理及研究现状

原位杂交技术已经成为许多实验室常规的研究手段,用来将专一核酸顺序定位到染色体,细胞和组织的特殊位点上。但对许多需要高灵敏度的实验,常规的原位杂交技术显得力不从心。原位 PCR 技术是原位杂交与 PCR 技术的结合,它使与靶序列 DNA 特异结合的标记 DNA 的众多拷贝同时集中在合成位点处,导致信号强度大大提高,因而显著提高了检出率,可用于低拷贝数甚至单拷贝的基因的定位。因而可以说原位 PCR 技术是现行常规原位杂交基因定位的潜在替代者。

Troyer 等^[24]用原位 PCR 技术成功地将猪 α -干扰素基因的一个短片段定位于猪的 1 号染色体长臂上,表明了原位 PCR 技术在基因定位方面的应用前景。迄今为止,原位 PCR 技术在鱼类的应用还没有报道,作者利用前人的方法和手段并加以改进,已经成功地将鲤鱼中的中度重复序列定位于兴国红鲤染色体组中,找到一种鱼类基因定位的最佳条件,下一步将会定位转基因鱼中的外源基因,为转基因鱼的定向育种提供实验依据(待发表)。

2.2 鱼类染色体原位 PCR 的基本方法

2.2.1 原位 PCR 的材料和样品制备 鱼类染色体原位 PCR 的材料来源与染色体原位杂交相同,多为有丝分裂中期相,可采用的方法有肾淋巴细胞直接制片,外周血短期培养后低渗滴片,尾鳍细胞短期培养后敲片,胚胎细胞制片^[25],前两种方法较多采用。染色体片龄对实验结果影响很大,最好采用新鲜制备的不超过一月的染色体标本。

2.2.2 原位 PCR 反应体系 原位 PCR 反应体系较一般的溶液 PCR 有些改变,如, Mg^{2+} 和原位 PCR 反应液中 Taq 酶浓度一般要增加 1 至数倍,引物和 dNTP 浓度也应达到一般

的溶液 PCR 的最大浓度,反应中的变性,退火延伸时间需要相应延长^[26]。这可能是由于原位 PCR 的特殊性,如固相环境中分子运动速度慢,导热慢,染色体样品对 PCR 反应组分的吸附能力较溶液 PCR 弱以及可能存在的某些抑制因素等。如不相应的改变反应条件,PCR 反应就难以进行。

2.2.3 原位 PCR 的结果检测 原位 PCR 扩增后信号容易扩散,一些研究在 PCR 后对材料进行后固定,但多数忽略此步骤。Nuovo 等^[27]认为后固定对减轻产物扩散并无明显效果。对于直接原位 PCR(DISC-PCR),可以根据不同的标记方法而选择不同的检测方法,用放射性同位素标记的 dNTP,可用核乳胶进行检测,对于非放射性标记(地高辛,生物素及 BrdU 标记)的 dNTP,可以通过相应的免疫化学方法显色后镜检,或通过荧光显色,直接用荧光显微镜镜检。对于间接原位 PCR,在原位扩增后还要进行染色体原位杂交,根据杂交探针的不同标记方法而选择不同的检测方法。

2.2.4 影响原位 PCR 结果的主要问题 假阳性问题:尽管一些研究认为,在 PCR 中,假阳性问题并不多见,但笔者的实验认为,在直接原位 PCR 中,假阳性问题普遍存在,改善结果的可靠性的方法是采用多种对照。在 DISC-in situ PCR 中,采用热启动也可以减少假阳性信号。另外,限制循环次数也有一定作用^[28]。

扩增产物的扩散问题:扩散产物的扩散与扩增片段的长度有关,片段过小,则易于引起扩散^[28];片段过大则不易扩散,有些研究表明地高辛及生物素标记的 dNTP 的掺入会导致扩增分子体积的增大,使扩增产物形成团块,从而显著降低小分子扩增产物的扩散^[27]。也有研究认为,扩增产物的扩散决定于片段扩增程度而非片段大小^[29]。

2.3 原位 PCR 在基因定位中的应用

原位 PCR 可以检测到常规原位杂交技术不易检测到的低拷贝或单拷贝核酸顺序,大大提高了原位杂交的灵敏度。自该技术发明以来,曾在组织细胞样品中检测到 HIV、HPV、MMTV、CMV、HBV、HSV 等病毒核酸,也在细胞水平上用过直接原位扩增,研究细胞染色体的 DNA 顺序。但基因定位方面成功的报道并不多见。1993 年开始,有人用直接原位 PCR 在人染色体组上定位了一卫星 DNA,原位 PCR 技术在染色体基因定位方面的工作才开始起步,这一技术在基因定位方面具有广阔的应用前景。目前,在鱼类基因定位方面的研究正在作者的实验室开展,除了利用原位杂交技术定位转基因鱼中多拷贝数的外源基因以外,还准备利用原位 PCR 技术定位其中单拷贝或低拷贝的外源基因,以期找出外源基因在转基因鱼中的整合图式。

3 原位杂交和原位 PCR 技术在鱼类外源基因定位中的应用展望

转基因鱼的研究开始于 20 世纪 80 年代中期,首先是将人生长激素(hGH)基因导入鲫鱼受精卵中,证明了外源基因在受体胚胎发育过程中的复制、整合和表达,发挥其生物学效应,而且可以传递给后代。通过对外源基因的转换,整合,表达,生物学效应到外源基因的遗传等各个方面进行了系统研究,建立了一个完整的转基因鱼模型^[30,31]。

转基因鱼模型的研究认为,外源基因在转基因鱼中的整合是随机的,整合位点不同,表达效应不同。有的整合属有效整合。转植基因得以表达;有的整合属沉默整合,个体不具外源基因赋予的表现型;有的整合扰乱受体“管家基因”和主要“旺势基因”这种整合称

之为毒性整合,个体生长发育受阻、畸形甚至夭折。因此,要找到外源基因在转基因鱼中的优势整合位点,以得到稳定遗传的转基因鱼,培育出一种新的养殖对象,就成为急待解决的问题。原位杂交和原位 PCR 技术既然可用于鱼类内源基因的定位,同样也可以用于外源基因的定位。对于一些拷贝数较多的外源基因,可以通过原位杂交清晰地检测到,而对于一些拷贝数较低或单拷贝的外源基因,则需利用原位 PCR 将特异 DNA 顺序扩增后才能检测到,为外源基因在转基因鱼中的整合图式提出一个具体而可靠的依据。以定向育种为目的的纯和转基因鱼正在研制之中,原位杂交和原位 PCR 将在鉴别稳定的纯和转基因鱼品系中发挥不可替代的作用。

参考文献:

- [1] Gall J, G, Pardue H L, Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations [J]. *Pro. Natl. Acad Sci U. S. A*, 1969, **63**:378—381
- [2] Gerhard D S, Kawasaki E. S, Bancroft F. C, et al, Localization of a unique gene by direct hybridization in situ [J]. *Pro. Natl. Acad Sci U. S. A*, 1981, **78**:3755—3759
- [3] Harper M E, Sarunders G F. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11 [J]. *Pro. Natl. Acad Sci. U. S. A*, 1981 **78**:4458—4460
- [4] Langer-Safer P R, Levine M, Ward D C. Immunological method for mapping genes on drosophila polytene chromosomes [J]. *Pro. Natl. Acad Sci U. S. A*, 1982, **79**:4381—4385
- [5] Cannizzaro L A, Emanuel B S. In situ hybridization and translocation breakpoint mapping. [J] *Cytogenet. Cell. Genet.* 1985, **39**:179—183
- [6] Bostock C J, Clark E M. Satellite DNA in large marker chromosomes of methotrecate-resistant mouse cells. [J] *Cell*, 1980, **19**:709—715
- [7] John H. A, Singh L. RNA-DNA hybrids at the cytological level [J] *Nature*, 1969, **223**:582—587
- [8] Pendas A. M, Moran P, Eva Garcia-Vazquez. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in Brown Trout, Atlantic Salmon and Rainbow Trout. [J] *Chromosoma*, 1994 **103**:147—152
- [9] Reed K M, Phillips R B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly reeacted DNAs of Lake Trout, Salvelinus Namaycush. [J]. *Chromosoma*, 1995, **104**:242—251
- [10] Reed K M, Phillips R B. Molecular cytogenetic analysis of the double-cma3 chromosome of Lake Trout, Salvelinus Namaycush [J]. *Cytogenet. Cell Genet.* 1995, **70**:104—107
- [11] 张锡元, 董素红, 蒋建桥. 草鱼的 bHCG 基因同类物及其染色体定位 [J]. 遗传学报, 1989, **16**(4):299—304
- [12] 李 奎, 余其兴, 毛 勇, 等. 用地高辛标记原位杂交技术定位黄鳝 rRNA 基因于二价染色体 3q12-q24 和 7q14-q26 [J]. 遗传学报, 1995, **22**(2):97—102
- [13] 王泽群, 朱作言. 鲤鱼基因组 DNA 重复序列 CR1 的染色体原位杂交定位 [J]. 科学通报, 1999, **44**(20):2182—2186
- [14] 李书鸿, 郭绍东, 孙方臻. 用整体原位杂交法研究微管蛋白基因在斑马鱼胚胎中的表达 [J]. 科学通报, 1998, **43**(17):1855—1858
- [15] Chollet A, Kawashima E M. Biotin labelled synthetic oligodeoxy ribonucleotides synthesis and uses as hybridization probes [J]. *Nuclear Acid Research.*, 1985, **13**:1529—1541
- [16] Garrido-Ramos M A, Kawasaki E S, Bancroft F C. Cloning and Characterization of a fish centromeric satellite DNA [J]. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1994, **65**:233—237
- [17] Pendas A M, Moran P, Eva Garcia-Vazque. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5s-Rdna [J]. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1994, **64**:31—36
- [18] Smith V T H B M, Rose M R. Combined GTG-banding and nonradioactive in situ hybridization improves characteriza-

- tion of complex karyotypes [J]. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1990, **54**:20—23
- [19] Speleman F, Ihssen P E, Pieper F R. Characterization of a de novo duplication of 11p14-p13, using fluorescent in situ hybridization and southern hybridization [J]. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991, **56**:129—131
- [20] Phillips R B, Reed K M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review [J]. *Aquaculture*, 1996, **140**:197—216
- [21] Koch J E, Kolvraa S, Peeterssen K B, et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA in situ [J], *Chromosoma*, 1989, **98**:259—265
- [22] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro the polymerase chain reaction [J]. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1986, **51**:263—273
- [23] 杜丽萍, 余其兴, 郭一清. 黄鳍二价上 Px 基因外显特异引物原位 DNA 合成 [J]. *遗传学报*, 1998, (25)(1):28—33
- [24] Troyer D L, Goad D W, Xie H, et al. Use of direction in situ single-copy (DISC) PCR to physically map five porcine microsatellites [J]. *Cytogenet Cell Genet* 1994, **67**:199—204
- [25] 余先觉. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京: 科学出版社, 1989
- [26] Zhang X Y, Jiang H B, Li L J. In situ amplification of DNA fragments specific for human Y chromosome in cellular nuclei by PCR [J]. *Science In China (Series C)* 1996, **39**(1):45—52
- [27] Nuovo G J, Macconnell P, Forde A. et al. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction [J]. *Am. J. Pathol.* 1991, **139**:847—854
- [28] Long A. A, Komminoth P, Lee E. Comparison of indirect and direct in situ polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections [J]. *Histochemistry* 99:151—162
- [29] Nuovo G J, Lidonnici K, Mac Connell P, et al. Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA [J]. *Am J Surg Pathol.* 1993, **17**(7):683—690
- [30] 朱作言, 许克圣, 李国华, 等. 转基因鱼模型的建立 [J]. *中国科学*, 1989(B)2:147—155
- [31] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758) [J]. *Z angew Ichthyol*, 1985, **1**:31—34