

- 10 Prescott DM. *Microbiol Rev*, 1994; 58 233
- 11 Lingner J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93 10 712
- 12 Singer MS et al. *Science*, 1994; 266 404
- 13 Meyerson M et al. *Cell*, 1997; 90 785-795
- 14 Nakamura TM et al. *Science*, 1997; 277 955-959
- 15 Avilion AA et al. *Cancer Res*, 1996; 56 645-650
- 16 Blasco MA et al. *Nat Genet*, 1996; 12 200-204
- 17 Feng J et al. *Science*, 1995; 269 1236-1241
- 18 Crompton M EA. *Cell Mol Life Sci*, 1997; 53 568-575

(收稿日期: 1998-01-12)

比较基因组杂交技术及其应用

北京放射医学研究所(北京, 100850) 周 晓综述 程书钧* 吴德昌审校

摘 要: 比较基因组杂交技术是一种研究细胞系或生物标本的整个基因组 DNA 获得与缺失的非常有应用前途的分子细胞遗传学方法, 本文详细介绍了该项技术的具体操作方法, 并深入讨论了其在乳腺癌、前列腺癌、肺癌等临床肿瘤的诊断、预后、分子遗传学特性分析等方面的研究, 以及在放射生物学研究领域的应用前景。

关键词: 比较基因组杂交 DNA 拷贝数 肿瘤

1968年染色体显带技术的发明, 为全面分析染色体组成提供了强有力的工具^[1], 但由于用临床标本和肿瘤标本很难制备出高质量的、能够用于分析的中期细胞分裂相, 肿瘤细胞的染色体变化通常又比较复杂, 从而使核型分析难度加大, 阻碍了有关研究的发展; 分子生物学技术的兴起促进了肿瘤分子遗传学研究, 但由于所采用的探针或标记只针对某一特异染色体区域或基因, 这些方法一次只能检测某一特定的基因或染色体区域的等位缺失、突变或扩增, 而不能检测大部分基因组的变化。能否不经过肿瘤细胞核型的分析, 仍可了解到整个基因组 DNA 的变化? 1992年 Kallioniemi 及其同事^[2]发明了一种新的细胞遗传学方法——比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 技术可以达到此目的。本文就 CGH 技术的概念、主要操作环节及其应用作一综述。

1 比较基因组杂交技术

CGH 是一种将消减杂交和荧光原位杂

交 (FISH) 相结合, 用于检测两个基因组间相对 DNA 拷贝数变化 (缺失、复制、扩增), 并将这些异常在染色体上定位的一种新的分子细胞遗传学方法, 也可以说它是一种 DNA “拷贝数核型” (copy number karyotype)。它主要是将被检组织 (通常为肿瘤组织) DNA 和正常对照组 DNA 分别用不同颜色的荧光标记, 以相同比例与正常淋巴细胞中期分裂相进行原位杂交, 再通过检测两种颜色的荧光强度, 根据两种颜色的比率情况来显示基因组的结构状况, 如发现两种颜色比率改变, 则说明该区域存在 DNA 序列的缺失或扩增。CGH 在一次实验中即可对整个基因组进行检测, 与需要分离 DNA 并且检测染色体上的等位基因缺失 (LOH)、突变、扩增等传统分子遗传学检测手段相比, 该方法既节省了操作步骤, 又能将检测出的异常 DNA 序列在染色体上定位, 便于进一步通过 FISH 分析和定位克隆等技术筛选出相关基因。CGH 能够检测数百 kb 至数 Mb 的 DNA 扩增或缺失, 但它不能显示出染色体易位、倒位

* 中国医学科学院肿瘤研究所病因室(北京, 100022)

及其它不改变 DNA 拷贝数目的异常变化,不能追踪肿瘤的克隆进化^[2,3]。

2 CGH 技术具体方法

CGH 的基本原理同 FISH 类似,它经历了从单色基因组杂交到双色杂交的发展过程,现将 CGH 的几个主要环节分述如下^[2-5]。

2.1 正常中期分裂相的制备

采用常规方法制备正常外周血淋巴细胞中期分裂相。由于这些分裂相是 CGH 杂交的靶,因此它们的质量直接决定着 CGH 的结果;一次可以制备大量片子保存备用,以保证整个实验都使用同一批片子;杂交时应选择染色体重叠少、形态保持好、染色体较长、分裂相多的玻片。

2.2 标本的选择及高分子量基因组 DNA 的提取

选择具有典型的肿瘤组织学特征和恶性细胞比例高的组织标本极其重要。应该将有炎症的坏死组织和区域弃除,因其中常包含有降解的 DNA 与正常细胞。从细胞系与新鲜肿瘤标本提取的高分子量 DNA 均可用于 CGH 杂交;经福尔马林固定和石蜡包埋的组织通常也能得到相对高分子量的 DNA,但杂交结果一般稍差。可采用常规的方法提取高分子量 DNA。

2.3 DNA 的标记

检测 DNA 与参照 DNA 被标记上不同的颜色,这一步对实验的成功也十分重要。标记 DNA 的大小在 500~2000bp 时,可得到良好的杂交结果。基因组 DNA 的标记可采用缺口翻译法(nick translation)、随机引物法(random priming)和简并引物 PCR(degenerate primer PCR)等技术。可采用间接标记法,即用生物素化的脱氧核苷酸标记肿瘤基因组 DNA,用与地高辛结合的脱氧核苷酸标记正常基因组 DNA,在杂交后需二次免疫标记才能显色;也可用荧光素结合核苷酸的

直接标记法,如 FITC-dUTP 和 Texas Red-dUTP 直接法在杂交后不需要进一步处理,从而提高了杂交信号强度,目前被普遍采用。

2.4 杂交与染色

CGH 的杂交与染色基本遵从染色体涂染(chromosome painting)和 FISH 的操作要求。杂交中将等量的不同标记的检测与参照 DNA 同人 Cot-1 DNA 混合,以封闭重复序列对结果的干扰。标记 DNA 同正常淋巴细胞中期分裂相杂交 3~4 天,杂交前染色体充分变性以使标记 DNA 与之结合,按照标准的 FISH 方法将未结合的 DNA 洗掉。间接法标记探针时,杂交后还需进行免疫化学染色,如用抗生物素-FITC,用抗地高辛的罗丹明。

2.5 荧光镜检和图像分析

杂交后的荧光信号需借助于带有双色或单色滤光片的荧光显微镜来观察,通过数字图像分析系统与计算机软件程序将荧光信号进行定量处理,最终 CGH 的分析主要依据沿染色体长轴分布的两种荧光信号强度的相对比值进行评价,某一染色体区域的检测 DNA 荧光强度信号明显增强,表明检测 DNA 相对于参照 DNA 序列的获得;而参照 DNA 的荧光信号相对增强,表明检测 DNA 的缺失。CGH 可定量区分至少增加或减少 1~4 拷贝的染色体变化。

3 CGH 技术的应用

3.1 肿瘤 DNA 的获得与缺失

目前已用 CGH 技术检测了乳腺癌^[6]、前列腺癌^[7,8]、肺癌^[9]、恶性胶质细胞瘤^[10]、血液病^[11-14]等肿瘤细胞 DNA 的获得与缺失。

3.1.1 乳腺癌

传统的细胞遗传学研究认为,染色体均染区(HSR)、双微体是代表基因扩增的细胞遗传学结构,研究表明 6% 原发乳腺癌中有 HSR。尽管遗传学分析发现乳腺癌中有许多原癌基因的扩增,诸如 *erbB2*(17q12)、*myc*(8q24)、*prad1/cyclinD*(11q13)、*flg*(8p12)、

bek(10q24) igf1/fes(15q24-q25)等,但多数情况下,这些基因的扩增不能说明大的 HSR 存在。Kallioniemi 等人采用 CGH 技术比较研究了 5 个乳腺癌细胞系和 33 例原发肿瘤基因组拷贝数的变化情况,发现在三分之二的肿瘤标本与 5 个细胞系中均观察到涉及 26 个染色体亚区的 DNA 序列拷贝数增加,其中的多数位点与目前已知的扩增序列不同,17q22-q24 和 20q13 代表的序列呈现极高频率的扩增^[6]。

3.1.2 前列腺癌

由于前列腺癌细胞难于体外增殖,使前列腺癌的细胞遗传学研究进展缓慢,只是在少数前列腺癌病例中发现克隆数目或结构异常,但还没发现哪一种改变出现的频率很高。分子生物学的发展促进了前列腺癌的遗传学研究,但由于所采用的探针或标记只针对某一特异染色体区域或基因,只能检测特定的等位缺失、突变或扩增。研究发现,在 8 号染色体的 8p22 可能含有前列腺癌的肿瘤抑制基因,Cher 等人^[7]将 18 例前列腺癌标本的 CGH 结果与通过 PCR/RFLP 作图所得到的 8 号染色体上 29 个位点的等位基因不平衡的检测结果相比较,两种结果具有高度的一致性,说明在某些前列腺癌中有 8p 等位丢失和 8q 等位增加。

3.1.3 肺癌

对 13 例小细胞肺癌 (SCLC) 标本的 CGH 检测结果表明:有 3p 5q 10q 13q 17p 的丢失和 3q 5p 8q 17q 的获得,这些肿瘤中的扩增位点包含 22 个染色体区带,表明其基因组的高度不稳定性。其中出现频率最高的是 19q13.1,到目前为止还没有将哪一基因定位到这一区段^[9],而 1p32 2p23 7q11.2 8q24 13q33-34 分别在两个病例中出现。

3.2 肿瘤 DNA 获得与缺失的分子遗传学特性分析

既然 CGH 不仅能用于分析实体瘤标本中肿瘤细胞 DNA 序列的获得与缺失,还能

同时确定相应的染色体变化部位,就可借助于分子遗传学方法分析这些染色体位点的特征。如上所述,通过 CGH 技术发现在乳腺癌中有 8q24 扩增^[6],在 SCLC 中有 13q 17q 缺失^[9],这些位点包含某些已知基因 myc rbl p53 等,它们在肿瘤的发生和演进中起到一定的作用。除已知基因的变化外,CGH 分析还揭示出许多新的染色体位点拷贝数的变化,其中许多变化在肿瘤中出现的频率很高,值得进一步分析。例如,乳腺癌研究中发现的 17q22-q24 和 20q13 高频率、高水平扩增,说明这两个区域可能包含有尚未了解的基因,这些基因的过度表达在乳腺癌的发生中起到重要作用,由于这两个区域均横跨约 10Mb,因此每个区域可能包含有不止一个基因,进一步可通过定位克隆技术确定出新的乳腺癌相关基因。

3.3 肿瘤的诊断及预后评价

CGH 技术可用于各种肿瘤的前瞻性或回顾性研究。像通过细胞遗传学与分子遗传学实验可对淋巴瘤与白血病进行诊断和预后预测一样,用 CGH 技术检测保存的标本可得到各种肿瘤的“拷贝数核型”,从而有助于了解相似疾病的 DNA 变化特点,判断其预后。但是,这些保存下来的标本得到的信息量要比从新鲜冰冻的肿瘤标本或细胞系得到的少。而采用 CGH 检测不同进展阶段的肿瘤标本,如研究从原发癌或从癌前病变到转移癌的肿瘤标本,可以确定与肿瘤进展相关的特异染色体区域拷贝数的变化。

由于 CGH 需要的 DNA 样品量很少 (1 μ g),因此可以利用针刺活检或穿刺所收集到的样品进行研究。经 CGH 得到“拷贝数核型”后,如果观察到某些分子遗传学改变,这些改变又具有诊断价值,则可为进一步的医学处置提供依据。非肿瘤细胞的污染将会冲淡拷贝数变化的结果,因此需要进行严格的质量控制^[4]。

3.4 临床遗传学研究

亚染色体区域缺失被看作是新生儿畸形的病因,有些病人可通过细胞遗传学检测出染色体缺失,但有些病人的染色体缺失就不能通过核型分析鉴定,这时可用 CGH 技术检测患儿的 DNA 中染色体缺失的来源。有人用 CGH 技术从一例患有先天性心脏病、脑发育异常的男婴外周血淋巴细胞中鉴定了传统细胞遗传学不能发现的一个额外小片段的来源,在没有数字成像装置的普通显微镜下,就观察到染色体 6q 远端荧光强度增强,进一步通过 6 号染色体涂染和 6q26-q27 的亚端粒酵母人工染色体克隆 FISH,将这一额外小体的来源诊断为染色体 6q23-qter 衍生物。此结果证明,CGH 是鉴定小的遗传不平衡的极有效方法^[15]。

3.5 放射医学研究

CGH 技术亦可应用于放射医学的研究领域。辐射损伤作用的靶位点是 DNA,辐射可造成染色体单、双链的断裂,产生大量的染色体片段及其它形式的染色体畸变,在目前的照射剂量重建中,常规染色体畸变分析是一种重要的生物剂量估算方法,但由于辐射形成的核型相当复杂,G 显带核型分析方法存在许多困难,无法完全准确地分析染色体畸变,而采用 CGH 技术,通过一次杂交,就可以检测到基因组内所有的 DNA 缺失或扩增,显著提高了工作效率和结果的准确度,而且还可以发现常规方法无法检测到的小片段缺失^[16]。因此,CGH 结合常规核型分析技术,可以发展成为一种更为迅速可靠的生物剂量测定方法。

4 展望

CGH 技术是一种研究细胞系或生物标

本的整个基因组 DNA 获得与缺失的非常有应用前途的分子遗传学方法,具有传统细胞遗传学不可替代的作用。在肿瘤研究中,它从总体上全面分析染色体拷贝数的变化,对研究肿瘤的病因、诊断与预后具有重要的意义。研究表明,CGH 技术是比肿瘤细胞核型分析更敏感的检测基因组获得与缺失的方法,结合其它分子遗传学技术,它将成为分离肿瘤相关基因的一种新的策略。但是,它不能检测染色体易位、倒位等不改变 DNA 拷贝数的异常变化。

参考文献

- 1 Caspersson T et al. *Exp Cell Res*, 1968; 49: 219-226
- 2 Kallioniemi A et al. *Science*, 1992; 258: 818-821
- 3 Kallioniemi O P et al. *Genes Chrom Cancer*, 1994; 10: 231-243
- 4 Houldsworth J, Chaganti RSK. *Am J Pathol*, 1994; 145(6): 1253-1260
- 5 Manoir S et al. *Hum Genet*, 1992; 90: 590-610
- 6 Kallioniemi A et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994; 91: 2156-2160
- 7 Cher M L et al. *Genes Chrom Cancer*, 1994; 11: 153-162
- 8 Visakorpi T et al. *Cancer Res*, 1995; 55: 342-347
- 9 Ried T et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 1801-1806
- 10 Schrock E et al. *Am J Pathol*, 1994; 144(6): 1203-1217
- 11 Monni B O et al. *Blood*, 1996; 87(12): 5269-5278
- 12 Avet-Loiseau H et al. *Genes Chrom Cancer*, 1997; 19: 124-133
- 13 Karhu R et al. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997; 95: 123-129
- 14 Dierlamm J et al. *Leukemia*, 1997; 11: 747-758
- 15 Erdel M et al. *Hum Genet*, 1997; 99: 596-601
- 16 Carlson KM et al. *Genes Chromo Cancer*, 1997; 20(4): 419-424

(收稿日期: 1998-02-23)