

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別:進修)

婦癌及乳房病理、發展與婦癌有關的分子病理技術，參與婦癌病理研究

服務機關：台北榮民總醫院

出國人職 稱：主治醫師

姓 名：許志怡

出國地區：美國

出國期間：92年5月15日至93年3月29日

報告日期：93年4月27日

J3/
C09302464

公務出國報告提要

頁數: 24 含附件: 否

報告名稱: 婦癌及乳房病理發展與婦癌有關的分子病理技術參與婦癌病理研究

主辦機關: 行政院輔導會臺北榮民總醫院

聯絡人/電話: /28757115

出國人員: 許志怡 行政院輔導會臺北榮民總醫院 病理檢驗部 主治醫師

出國類別: 進修

出國地區: 美國

出國期間: 民國 92 年 09 月 30 日 -民國 93 年 03 月 18 日

報告日期: 民國 93 年 07 月 08 日

分類號/目: J3/醫療 J3/醫療

關鍵詞: 婦癌及乳房病理發展與婦癌有關的分子病理技術參與婦癌病理研究

內容摘要: 2003 年五月前往美國 Johns Hopkins 病理部進修婦科及乳房疾病病理, 參與病理日常診斷工作、參加討論會議, 觀摩婦科病理實驗室。也實際操做 Tissue microarray, 螢光原位雜交試驗, 參與 trophoblastic disease 教育網頁製作。Johns Hopkins 人員編制龐大, 各有專精, 分工極細, 但講求團隊合作。病理案例多, 且有很多轉診或徵尋專家意見的個案, 能做的特別染色很多且使用頻繁, 對於困難案例也會用到分子病理幫忙診斷, 且這些費用保險均給付, 以求病理診斷之完整與正確性。而進修時的研究發現卵巢 High grade serous carcinoma 細胞核較大(大都大於 $37\mu^2$), 表現 MAPK 的比例低於 Low grade serous carcinoma, taxol sensitive 之 high grade serous carcinoma 若表現 MAPK, 其預後將優於沒有表現 MAPK 的個案。進修期間除學習婦科病理新的觀念, 也對於免疫化學的進步, 分子生物學及免疫學的快速發展, 有更深刻的感受。病理學的這些進步也使病理應用新的方法和技術, 不斷更新觀念和知識, 不僅影響了腫瘤的分類, 也使病理應用的範圍擴及疾病的預防及治療。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

摘要

2003 年五月前往美國 Johns Hopkins 病理部進修婦科及乳房疾病病理，參與病理日常診斷工作、參加討論會議，觀摩婦科病理實驗室。也實際操做 Tissue microarray，螢光原位雜交試驗，參與 trophoblastic disease 教育網頁製作。Johns Hopkins 人員編制龐大，各有專精，分工極細，但講求團隊合作。病理案例多，且有很多轉診或徵尋專家意見的個案，能做的特別染色很多且使用頻繁，對於困難案例也會用到分子病理幫忙診斷，且這些費用保險均給付，以求病理診斷之完整與正確性。

而進修時的研究發現卵巢 High grade serous carcinoma 細胞核較大(大都大於 $37 \mu^2$)，表現 MAPK 的比例低於 Low grade serous carcinoma，taxol sensitive 之 high grade serous carcinoma 若表現 MAPK，其預後將優於沒有表現 MAPK 的個案。

進修期間除學習婦科病理新的觀念，也對於免疫化學的進步，分子生物學及免疫學的快速發展，有更深刻的感受。病理學的這些進步也使病理應用新的方法和技術，不斷更新觀念和知識，不僅影響了腫瘤的分類，也使病理應用的範圍擴及疾病的預防及治療。

目次

摘要	2
目的	4
過程	6
心得	16
建議	18
附錄	19

目的

惡性腫瘤已連續 17 年蟬連國人十大死因第一位，而其中嚴重威脅台灣婦女健康的子宮頸癌、乳癌、子宮內膜癌、卵巢癌，在病理上都相當的重要。近年於免疫化學的進步，分子生物學及免疫學的快速發展，不僅在腫瘤的分類上，有很大發展，尤其與預防及治療上的結合，使病理應用新的方法和技術，不斷更新觀念和知識，例如結合病理與免疫學發展子宮頸癌疫苗，現已進入臨床試驗階段，真對 Her-2/neu oncogen 之免疫療法 Herceptin，更已得到 FDA 證實應用於轉移之乳癌，現正擴大在手術後化學藥物治療之臨床評估試驗。Her-2/neu 對病理影響很大，以往病理主要應用於診斷，或是在於預後因子。原本 Her-2/neu 陽性之乳癌，臨床病理上證實其預後較差，對化學治療之效果較不好，因 Herceptin 的問市，要使用 Herceptin 治療的先決要件就是 Her-2/neu 要為陽性，這使得在醫院中從事臨床診斷的病理醫師，需要準確的評估腫瘤的 Her-2/neu 是否過度表現，該病患是否適合使用 Herceptin。病理醫師的判斷直接影響藥物的使用，所以其正確性非常重要。不僅如此其它的腫瘤因子，也在研究人員的努力下，往預防及治療方面研究發展，臨床醫師若不隨時充實這方面的知識及技術，將很難跟上研究人員的腳步。

本院病理檢驗部目前除一般常規組織切片染色外，也備有自動免疫染

色設備及螢光原位雜交，染色體實驗室，而分子基因檢驗也正積極發展中。但檢驗之成敗不僅只於設備，人員訓練也相當重要。對分子病理來說，完成各單項檢驗，若無法統合判讀並無法完成最後正確之診斷。而各項檢驗結果的統合，需要有同時熟悉各項檢驗的方法的人做最後的診斷的判定。所以有人說病理缺乏分子生物技術是無法進步，但分子生物技術沒有病理的引導也等於是盲目的摸索。目前本院病理檢驗部乳房疾病的診斷由^職許志怡醫師負責，本次出國進修之目的主要在於增強婦科及乳房疾病診斷能力，加強研究技術，統合傳統顯微鏡檢查、及各項免疫染色分子生物檢驗方法檢查結果，以完成正確之診斷，提供病患完整的預後因子參考，並給與選擇治療藥物的正確訊息。所選擇的地點為 Johns Hopkins Medical Institutions。Johns Hopkins 不僅歷史悠久，在各項醫療照護、研究發展的成就也是有目共睹，且已連續十幾年榮獲全美十大最佳醫院。期望能熟悉國外主流病理實驗室的運作方法。學習到他們顯微鏡下細胞形態及組織免疫染色的判讀，熟悉單株抗體的處理及應用，免疫組織染色方法，研習分子基因的方法及結果判讀並學習各項方法的品質管理。

過程

抵達美國後，安頓下來，到 Johns Hopkins 完成了報到手續，接著前往吳子丑教授實驗室。教授在子宮頸疫苗的研究上非常有成就，也從事一些婦科病理診斷工作。教授的疫苗研究，主要在研究增強疫苗強度，其中包括預防性及治療性疫苗。絕大多數的子宮頸癌已証實與 human papillovirovirus 有關，尤其一些高危險的病種如 type 16, type 18, type 31, 與子宮頸癌前期病變與子宮頸癌的發生直接相關。預防性的疫苗其標的為病毒感染早期會呈現的細胞膜蛋白質 L1、L2, 感染細胞會呈現此種蛋白質，將引來抗原呈現細胞調理呈現抗原及吞嚥細胞吞嚥，甚至有 IgA 的分泌中和，達到預防感染及感染控制。而在子宮頸癌發生過程中，病毒感染後會進入宿主細胞核，並且病毒的 DNA、E6、E7 將嵌入宿主染色體，其中 E6 使 p53 發生異常，E7 連結 pRb, 影響細胞分裂及細胞週期，p16 活化，造成細胞異生而發生癌變。當然癌細胞的發展，一方面要突破細胞分裂及細胞週期的管制，也要逃避宿主的免疫對不正常細胞之清除。正常情況下，NK cell 會清除此不同的異常細胞，或經由 T cell 的 MHC(HLA)與 T cell receptor 辨認此種異常細胞，引發 T cell immunity, 消滅異常細胞。腫瘤細胞也用各種方法逃避身體內的免疫反應，如部份抗原統若要殺死。發展中的 HPV DNA vaccine 包含預防性及治療性疫苗，DNA 疫

苗進入體內，經由抗體呈現細胞如 dendritic cell，將抗原傳遞給 T cell，或是吞嗜細胞將吞入含有抗原的死亡細胞後，再將抗原傳遞給 T cell。而透過增強 MHC class I (如 heat shock protein 70, calreticulin, traslocation domain of pseudomonas aeruginosa exotosin)使 CD8 T cell 或 MHC class II (lysosome associated membrane protein LMP-1)使 CD4 T cell 反應增強，來使疫苗的效果增加。另外也可透過細胞間傳遞，例如 herpes simplex virus VP22，使 DNA 疫苗的效價增加。另外，設法延長 dendritic cell 的壽命(如 XIAP)也可增強疫苗的效果。

前幾個月的活動主要參與婦科病理形態學診斷。每天早上住院醫師預先準備好個案，查好臨床資料，並先自己的閱片練習判讀，再與負責簽發報告的主治醫師一同於多頭顯微鏡閱片。對於住院醫師學習來說，能事先自己先閱片可加強自己診斷的能力，是一不錯的方式。唯一的缺點是對於報告的速度會被拖延，若講求報告迅速，服務病患，這就無法兼顧。

在 Johns Hopkins 婦科病理每天約有二十幾個個案，為院內自己的個案外，每天由住院醫師與主治醫師輪流負責閱片及簽發報告。簽發報告的主治醫師共有五位和一位臨床研究醫師，每個月每個人大約負責 2-4 天。除每天院內的個案外，另也有一些是其它單位或醫院委請專家診斷的個案，由臨床研究醫師與 Dr. Kurman 或 Dr. Ronnett 一

同負責。Dr. Kurman 為世界知名的婦科病理專家，所以其個案來自世界各地，相當精彩。轉診、轉檢、委請專家診斷或做第二個診斷意見的情況在美國相當常見，這應是國內外醫療體系的不同所致。這些轉診有來自臨床醫師，其它病理醫師病患本身的委託，或病患本身的委託，轉診所需的費用並不低，除閱片基本的費用外，加做特別染色或其它的項目也需付費。而大部份保險會給付這部份的費用，因為一個正確的診斷是最重要的。美國的醫療訴訟很多，醫療診斷時相當的謹慎。謹慎這在某種程度上是好的，但過分的謹慎保守，易形成防禦性醫療(defensive medicine)，而影響到整個醫療行為與醫病關係，某種程度上也增加了醫療支出與費用，這引起整個美國醫學界的重視。相同的在病理上診斷也是趨向保守，且各種極少可能的鑑別診斷也需注意這也該算是受到一些影響。於切片診斷時，仍不能有非常確定的診斷，或有一點不放心或不很確定時，一般都會做免疫染色或分子病理。不僅切片、免疫染色這些費用保險會給付外，分子病理的費用保險也都涵蓋包括。畢竟在病理上做出確定且正確的診斷，還是最重要的。

乳房病理在 Hopkins 由外科病理各醫師負責，未集中個案單獨閱片簽發報告。其中，較困難的個案，會在下午的科內討論會中提出，徵詢其它醫師的意見。而 Dr. Agani 是 Hopkins 乳房病理的負責人，

困難的個案常會徵詢它的意見。乳房一般常見的案例為 ductal carcinoma，其它的腫瘤較少見，偶爾也有 lobular tumor、medullary carcinoma、papillary lesion、或 phyllodes tumor。其中較有趣的是 myoepithelial tumor，我在台灣很少見到。乳房病理上使用的工具主要以 H&E 切片為主，ER、PR、Her-2/neu 為治療所需之 marker，每個癌症個案都會做。Hopkins 還有做 MIB-1 proliferating index 提供臨床醫師參考。而 lobular carcinoma 的 marker (E-cadherin) 也有使用。染色的部份，我們大多都可以做，只是限於健保 case payment，除治療上所必需的 marker 外，或一些鑑別診斷所必需的染色，我們做的染色比 Hopkins 少。

Johns Hopkins 的病理一共有一百多位 faculty，婦科病理有五位主治醫師以上的醫師及教授，一位 bay view 分院的主治醫師，兩位臨床研究醫師。日常的診斷遇到困難的案例，或精彩的案例會於每天下午舉行科內討論會，就這些個案進行討論。這不僅可避免個人的盲點，很多個案經過討論後，更容易清楚掌握。另外對年青醫師於會議上也是一個很好的學習，這對於教學上非常有幫助。而這種會議對於診斷的品質的提昇也有很大的功能，大家都非常認真的進行。外科病理也有這種討論會，通常所有的主治醫師及教授都會參加。十一月 Johns Hopkins 病理接受評鑑，審查委員也非常重視此項會議的內容

及記錄。除下午的會議外，病理醫師每週也與婦產科及腫瘤科臨床醫師一起開個案討論會，雙方可更進一步的了解個案的內容，對於診斷及臨床的處置有不少幫助。另外，Johns Hopkins 病理部也有一些教學活動及研討會可以參加，例如，週一中午有 Unknown case conference，週二週三上午有住院醫師的教學活動，週四是 Grand round，週五有臨床病理的教學，內容相當充實。

Johns Hopkins 可以做的免疫化學染色非常多，使用也很頻繁。在婦科病理上較常用的如 MIB-1 與 p16 常用於子宮頸的病變，PTEN、p53、ER、PR 常用於子宮內膜腫瘤，CD10 可用於 endometrial stromal tumor，CK7、CK20 用於鑑別大腸與卵巢癌。乳房疾病方面，乳癌除 ER、PR、Neu 外，也做 MIB-1，myoepithelial markers 有 smooth muscle actin、p63。限於成本及使用率，國內也很少有實驗室能備齊每一種抗體，但在醫學中心相當於轉診的最終醫院是應該有能力做出較完備的診斷，有時為了正確診斷是很難兼顧成本。

In situ hybridization 於婦產科病理常用的是 Human papillovirus typing。Johns Hopkins 每週做一次，一次要兩個工作天，約有 5-8 個案例，其過程如附。HPV in situ hybridization 技術需要注意時間及沖洗，並且 positive 及 negative control 更是不可少。依他們的經驗，其敏感度不是很高，約為 6-7 成。

Johns Hopkins 病理有 Tissue microarray core lab，吳教授要我與 Dr. Ronnett 做子宮頸癌的 Tissue microarray，雖然台灣也有 Tissue microarray，但與 Hopkins 的方法不一樣，剛好可比較一下。Tissue microarray 將很多的 tissue core 重新包埋成矩陣，在 Hopkins 的 array 有三種規格，每一點的直徑有 0.6mm、1mm 及 1.5mm，常用的是直徑 1.5mm，十一行九列一共 99 點的這一種，而 0.6mm 的有 20x20 共 400 點，1mm 的有 13x16 共 208 點。首先，我找出 10 年的子宮頸癌個案，共約一百多個，調閱其舊的玻片，找出具代表性的腫瘤玻片，標示於切片上，再找出相對應的蠟塊，標示於臘塊上。這部份沒什麼特別，但最耗費時間。Hopkins 目前仍是手工填單調閱，而本院早已電腦化。Hopkins 的檔案管理尚可，但仍有一些切片調不到，也不知下落。Hopkins 有專門的電腦程式設計 Tissue microarray，其實就是將每一行每一列的每一點是為那一個個案一一輸入，存入資料庫。通常第一行為 control，放一些正常組織，其餘 90 點為個案。一般一個個案有三點，這樣比較具有代表性。若點數太少，可能會有取樣的問題。而玻片與臘塊在對應時，其大小也有一點點差別，對於大塊的腫瘤，這點差別並不會有影響，但對於小腫瘤或很小的病變，很小的誤差就無法取到正確的位置。將整理好的切片及臘塊，連同設計好的 array map，送到 Tissue microarray core lab，由一位專門的技數員，將標示

好的蠟塊一點一點逐一用 1.5mm 的鋼針取出組織，依所設計的 array map 塞入準備好的 array block 的正確位置。這部份用的儀器是由於 Tissue microarray 日後的個案辨示完全依賴其矩陣的相對位置，所以要非常小心謹慎避免誤殖。Array block 完成後也就幾乎大功告成，剩下來的切片染色與一般病理的石蠟切片染色相同，只是切片要切得好且完整，染色也要均勻，因為每一小點都是很重要的資訊。我在 Hopkins 做了 10 個 array block，包括 5 個 cervical squamous cell carcinoma，1 個 cervical adenocarcinoma，2 個 cervical intraepithelial lesion 及 3 個 endometrial carcinoma。Hopkins Tissue microarray core lab 的收費非常的高，製作一個 array block 連同 20 張空白片，需要七百多美元，合台幣 25000 元，這僅是在 core lab 的部份。還不包括我先前提到的查資料、調片、閱片、挑蠟塊及圈選位置。Tissue microarray 將很多個案重新整理於一個蠟塊中，方便了日後的染色與研究，但閱片時也蠻費事的，隨時要對應 array map，若不小心算錯了行讀錯點，所做的結果也都錯了。尤其是在看螢光染色時，更是吃力。

除 Tissue microarray 外，也跟 Dr. Shih 學習 trophoblastic disease。Dr. Shih 為世界知名的 trophoblastic disease 專家，不僅有各國的 consultation，也是醫學期刊的主要審查委員，Textbook 這一個部份與章節的主編。畢竟 trophoblastic disease 並非常見之疾病，尤其在經濟

發達之已開發國家更為少見，為方便全世界病理醫師了解此類疾病，Dr. Shih 要建立 trophoblastic disease 的病理網頁，介紹此類疾病。我也參與顯微照像與內容說明的整理。透過這個機會，我也對 trophoblastic disease 有較深入的認識，在我完成切片照像，說明整理的工作，將整理好的資料交給網頁製作人，網頁的美工及程式都由網頁製作人負責。現該網站已完成，其網址為 <http://pathology2.jhu.edu/trophoblast/index.cfm>。其中除 hydatidiform mole 與 choriocarcinoma 外，epithelioid trophoblastic tumor 與 placenta site trophoblastic tumor 是很少見的，在以前也不了解這種疾病。尤其是轉移到肺的 epithelioid trophoblastic tumor，與肺的 squamous cell carcinoma 非常相似，對於生育年齡的女性鑑別診斷上要特別注意。網頁繼續教育非常方便，目前 Johns Hopkins 很多教育訓練也常透過網錄來進行，例如的研究倫理，醫療資訊使用與保密等課程，都透過網路來進行。每個相關人員於期限內應完成所需的課程，從網頁發給證書。

Dr. Shih 的實驗室主要研究 ovarian tumor，應用分子病理的技術研究 ovarian tumor 的 pathogenesis，也研發診斷卵巢癌的分離診斷工具。其中比較重要的如 Micropapillary serous carcinoma 與 high grade serous carcinoma 的區別，micropapillary serous carcinoma 與 high grade

之基因變化不同，micropapillary 有較多的 BRAF 與 KRAS mutation 而 high grade 沒有。兩者的預後不同，診斷上要特別注意。Dr. Shih 實驗室裡應用的分子病理技術有免疫磁珠腫瘤細胞分離，可將腫瘤上皮細胞與間質細胞分離， digital karyotyping， digital PCR analysis， serial analysis for gene expression (SAGE)、 high throughput mutation detection....等。我對其 FISH 較有興趣，便參與其 Fluorescence in situ hybridization (FISH)與免疫染色的部份。這兩種技術我們國內都有，但在 Dr. Shih 的實驗室因研究腫瘤基因需要，需自己製作 probe，無法由廠商購得。由網路資料庫查尋 DNA 片斷，設計 probe，購買含有該段 DNA 的菌種，培養，分離，純化，添加 biotin 等連結物，方可用於標記，過程相當繁瑣，詳細步驟如附件一。自己發展探針，可用於較新的腫瘤基因研究，其品質控管也非常重要，不僅每個步驟非常小心，一有小問題就檢討並重覆操作，以確保結果之正確性。

在儀器管理上值得一提的是 Johns Hopkins 有一些 core lab，提供共用的儀器及技術。例如，Hopkins 有一個 Image center，有專人負責管理各種顯微鏡，例如高級的顯微照像設備、螢光、相位差、立體、共軛焦、雷射顯微切割等，這些設備相當昂貴，集中起來由專人管理、保養、並負責指導使用，節省了各實驗室重覆購置、管理、低使用率等問題。

最後也跟 Dr. Shih 做一些卵巢癌的免疫染色研究。比較 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 於 ovarian serous tumor 的表現，結果發現，High grade serous carcinoma 表現 MAPK 的比例低於 Low grade serous carcinoma (invasive micropapillary serous carcinoma)、non-invasive micropapillary serous carcinoma、atypical proliferative serous tumor 及 serous cyst。而 taxol sensitive 之 high grade serous carcinoma 若表現 MAPK，其預後將優於沒有表現 MAPK 的個案。另外一個研究是關於細胞核的大小，發現 high grade serous carcinoma 其細胞核大都大於 $37 \mu^2$ ，而 low grade serous carcinoma 或 micropapillary serous carcinoma 則小於 $37 \mu^2$ 。

心得

此次在 Johns Hopkins 看到其病理部陣容相當龐大，分工相當細，光 Faculty 有一百多人，有些以臨床工作為主，有些主要從事研究工作，完全不做臨床服務，各盡所能各展所長，其中最強調的一點就是團隊合作。畢竟一個人要兼顧服務、教學、研究，是很難面面俱到。並且，一項工作的完成需要各種角色的人扮演各自的角色，一個人限於能力與時間，很難獨力完成。尤其各種新的知識與技術，借助外力或與其它單位合作，較容易達成。Johns Hopkins 的研究成果是有目共睹的，其各實驗室內，實驗室間，與其它研究單位，甚至國外的單位合作相當普遍。反觀這種合作也需要制度配合，例如成果的評量應著重於參與。研究論文為作者們共同努力的成果，其中每個人每個環節都很重要，若要計較論文上作者的順位，這就不容易密切合作。尤其是順位直接影響點數升遷，將造成大家要爭第一作者，爭排名，是無法促成良好的合作關係。

免疫化學染色為病理常用且必需的工具，所需的抗體多，使用也很頻繁，並且一直有新的抗體被發現與使用。身為醫學中心，為正確的診斷，很難兼顧成本與使用率。

分子病理技術對於病理診斷有很大幫助，且目前很多尚且在於研究實驗階段，值得進一步推廣應用於日常診斷。當然除了技術設備上

的努力外，檢查所需要的費用問題，更有待病理界的努力與突破。

核心實驗室(core lab)的營運模式，由專人來負責與管理昂貴或精密儀器設備，提供專業的協助與服務，不僅可減少重覆購置的浪費，提高使用率，提供良好的保養維護，更可發揮其最大的功能。

透過網路提供在職教育的作法非常經濟且有彈性，不僅個人可利用空閒時間進行，且電腦教學可反覆練習與進行，最後在通過測驗發給證書，醫院也可完全掌握所有人員完成的狀態。

轉診、轉檢、委請專家診斷或做第二意見的方式，或許可應用於國內醫療資源較欠缺的地方，畢竟是沒有辦法每個醫院都有完整的病理次專科。並且病理診斷時需相當相當的謹慎，除要綜合前述的各項資料外，有任何問題一定要進一步做其它檢測，或与其它醫師討論。這不僅可避免個人的盲點，很多個案經過討論後，更容易清楚掌握。畢竟在病理上做出確定且正確的診斷，是最重要的。

建議

此次出國進修為身平第一次長時間留在國外，開始時忙於租屋安頓，離開前忙於處理各種用品，出國在外一切都靠自己打點，耗費不少心力。或許這也是進修訓練的一部份，但若本院與國外著名的醫院醫學院有合作，可透過交換學者或研究人員的方式，對方能提供一些住宿安排，或許可省去這些麻煩。另外，隨著每年的物價波動，台幣匯率變動，到美國每月一千美元的公費，租屋居住就所剩無幾。加上沒有績效，收入明顯減少，美國物價高，花費又增加，真希望能有其它補助。

也期待健保機關及審查單位能了解，病理需要各種免疫化學染色甚至分子病理，才能有明確及更進一步的診斷，早日將免疫化學染色的限制免除，並將分子病理納入保險給付之中。

附錄

FISH Protocol

Labeling Probe

10x Nick translation buffer (NT)	10 ul
0.1 M beta-ME (ME)	10 ul
1 mM dAGC	5 ul
1 mM Biotin 11-dUTP or Digoxigenin-11-dUTP	5 ul
ddH ₂ O	* ul
1 ug/ml DNase I (dilute 1 mg/ml stock with 1 ml ddH ₂ O)	4-5ul
E coli. DNA polymerase (10U/ul)	1 ul
Target DNA (2 ug)	8 ul
<hr/>	
Total Volume	100 ul

Incubate 2 hour 15 minutes at 15 oC

Place on ice. Check DNA size by running 3 ul reaction mix on the 2% agarose gel.

Good size will be ~150-450 bp.

If probe is bigger than 500 bp, add 2-5 ul DnaseI and incubate for another 1-3 hours.

Add 5 ul 0.5M EDTA to stop reaction, purify probe by passing through min Quick spin column (Roche Cat No. 1-814-419).

Follow protocol in the manuel except before apply labeled probe, equilibrate column with 200 ul buffer containing 50 mM Tris pH 7.5 , 1 mM EDTA, 0.1% SDS.

Precipitate the probe

30 ul labeled probe (0.65 ug)

20 ul human Cot DNA (1 mg/ml)

1 ul Salmon sperm DAN

5 ul NaOAc 3M

137.5 ul 100% ETOH

mix, dry ice 30 minutes or overnight at -20oC

Spin at 4oC for 30 minutes

Wash two times with 1 ml 70% ETOH

Dry pellet 5 min

Dissolve in 23 ul Hybridization Buffer.

3. For the probe, place the probe in 42oC heat block for ~30 min, vortex to mix every 10 min.
4. Denature the tissues on the slides: for paraffin-treated specimen, heat in the Denaturing Buffer at 72oC for 7 min (2 min for single-layer cell culture).
5. Dehydrate the slides 2-3 min each with room temperature 70% ETOH, -20oC 90% ETOH, and -20oC 100% ETOH, air dry slides at 42oC on a heat block.
6. Increase the waterbath temperature to 75oC.
7. Denature the probe- by heating the 23 μ l labeled probe at 75oC waterbath for 5 min, then incubate at 37oC oven for 10 min. (If need to add Vysis 18 cen probe, heat 2-3 μ l probe at 75oC for 3 min and add to the 18 μ l denatured mix right before hybridization)
8. While slide is still on the 42oC heat block, spot 23 ul probe, coverslip with 20X20 mm glass coverslip, and seal with rubber cement. Try to avoid bubbles!
9. Place slides in the moisture chamber, screw tight and incubate at 37oC oven overnight.

Wash and Detection

1. Next day, prepare two waterbaths: one at ~45oC, the other at 60oC.
2. Prepare three different buffers:
 - A. **50% formamide in 2X SSC**: mix 125 ml formamide, 25 ml 20X SSC and 100 ml dH₂O, adjust pH to 7.0 by adding ~120 μ l HCl. Pre-warm it in a 45oC waterbath.
 - B. **0.1X SSC**: mix 0.25 ml 20X SSC in 50 ml dH₂O. Pre-warm in 60oC waterbath.
 - C. **Washing Buffer**: mix 200 ml 20X SSC, 800 ml dH₂O, and 1ml Tween-20 (final concentration: 4X SSC, 0.1% Tween-20)
3. Take slides out from the moisture chamber, soak them in 2X SSC. Use forceps to

remove the rubber mount. Immediately place slide back into 2X SSC (not let it dry out!).

4. Wash slides with pre-warmed formamide buffer in the jar for one quick rinse and three more incubation by shaking at room temperature for 5 min each time.
5. Wash slides with 60°C 0.1X SSC buffer: quick rinse once and three more incubation by shaking at room temperature for 5 min each time.
6. Place slides in 2X SSC while waiting for applying blocking buffer.
7. Apply 300 µl of 3% BSA, 4X SSC solution to each slide. Place slides in the moisture box. One can coverslip the slides to prevent drying. Incubate at room temperature for 30 min.
8. For double labeling, incubate with avidin-FITC (1:200) and sheep anti-digoxigenin (1:100). For example: dilute 5 µl avidin-FITC and 10 µl sheep anti-digoxigenin in 1000 µl washing buffer. Place slides into moisture box. Incubate at room temperature for 1-2 hour.
9. Wash with Washing Buffer: quick rinse once, 3 times 5 min shaking on orbital shaker.
10. Incubate with biotinylated-anti-avidin (BAA, 1:200) and TRITC-conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit anti-sheep (1:100). For example: dilute 5 µl BAA and 10 µl rabbit anti-sheep in 1000 µl Washing Buffer. Place slides into moisture box. Incubate at room temperature for 1-2 hour.
11. Wash with Washing Buffer: quick rinse once, 3 times 5 min shaking on orbital shaker.
12. Incubate with avidin-FITC (1:200) and TRITC-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit (1:100). For example: dilute 5 µl avidin-FITC and 10 µl goat anti-rabbit in 1000 µl Washing Buffer. Place slides into moisture box. Incubate at room temperature for 1-2 hour.

13. Place into moisture box. Incubate at room temperature for 1- 2 hour.
14. Wash with Washing Buffer: quick rinse once, 3 times 5 min shaking on orbital shaker.
15. Counterstain with DAPI: dilute 1 μ l DAPI in 10 ml 2X SSC and stain the slides for 3 min.
16. Place slides in Washing Buffer. Quick rinse with running ddH₂O for about 30 seconds.
17. Air-dry slides for 30 min in dark.
18. Apply one drop of anti-fade (see appendix for recipe), apply 22 X 40 mm glass coverslip and examine under microscope.

Reagents:

10X Nick Translation Buffer

<u>Stock</u>	<u>Total: 40 ml</u>	<u>Final Conc.</u>
1M Tris-HCl (pH 7.8)	20 ml	0.5 M
1M MgCl ₂	2 ml	50 mM
BSA	20 mg	0.5 mg/ml
dH ₂ O	18 ml	

Reagents

Human Cot1 DNA 1 mg/ml (Invitrogen, Cat no. 15279-011)

Biotin-16-dUTP 50 nmole (Roche, Cat no. 1-093070)

Digoxigenin-11-dUTP 125 nmole (Roche, Cat no. 1-558-706)

10% Formalin (Sigma, Cat no. HT-50-1-640)

DNA polymerase I 10U/ul (Invitrogen, Cat no. 18010-025)

Formamide Di (American Bioanalytical, Cat AB00600), phone 800-443-0600,
568-655-4336

20X SSC (Invitrogen Cat no. 15557-028)

HCl concentrated 36.5%-38%

DNA mini-spin column (Roche Cat No. 1-814-419; new cat no. 11814419001)

Coppin Jar

Xylene (Baker)

Paraffin pretreatment reagent kit II (Vysis, 32-801210)

avidin-FITC (Vector, A-2011)

Biotinylated anti-avidin (Vector, BA-0300)

Sheep anti-digoxigenin, Fab-fragment (Roche, 1214667)

TRITC-conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit anti-sheep (Jackson Immunoresearch,
313-026-047)

TRITC-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit (Jackson Immunoresearch,
111-026-047)

Anti-fade

DABCO (1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, Sigma D2522 0.233 gram

dH₂O 800 µl

1M Tris-HCl, pH 8.0 200 µl

glycerol 9 ml

Total Volume 10 ml

Store aliquots in -20oC