

cRNA 探针在原位杂交组织化学

Angerer 及其同事们首先应用 RNA 探针于原位杂交（见 Cox et al 1984），核酸探针为单链的 RNA 分子，产生自具有质粒逆转录系统的 cDNA 克隆（图 20-2）。由于它是单链的，不像双链的 DNA 探针，在溶液中不会再退火（reanneal），因此，较大百分比的探针可参与杂交反应，较 cDNA 探针的信号强。除此之外，在溶液中产生的 cRNA-mRNA 杂交体比相应的 cDNA-mRNA 杂交体稳定，但在原位杂交中是否如此尚未证明。cRNA 探针不足之处在于有时比 DNA 探针粘性强（stickier）。可与组织产生较高的非特异性结合，但此缺陷可在杂交后漂洗液中加入酶漂洗来解决。最近，Wolf 等（1987）建议插入确定长度的寡核苷酸至载体内产生 cRNA 分子，这种 cRNA 分子称为“寡核苷酸核酸探针”（oligoriboprobes）已被成功的用于原位杂交实验。

图 20-2 示 cDNA 转录为 cRNA，可标记以不同的标记物，然后与细胞中的 mRNA 相结合。Biotin(生物素), Au(金), digoxigenin(地高辛)

一、同位素标记 cRNA 探针在 ISHH 中的应用

（一）组织切片的原位杂交细胞化学方法

（1）组织准备：大鼠以 10%水合氯醛（0.3ml/100g 体重），或 1%戊巴比妥钠约 1ml（3~4mg/100g 体重）腹腔内注射麻醉，用 100ml 生理盐水冲洗和 150ml 4%多聚甲醛主动脉灌注固定。固定半小时后，取出组织块，置入 4%多聚甲醛液中后固定 4~6h，4℃。

如要取脑组织，可于灌注后置 4℃冰箱内过夜，次晨取脑组织，后固定 4℃ 4h 左右。

（2）组织切片/培养细胞在经过处理，抹以粘附剂的载片上，在 43℃烤箱过夜。

（3）在 PBS（0.1mol/l Ph7.2）中浸 5~10min。

（4）浸于 0.1mol/L 甘氨酸—PBs 液内 5min。

（5）为增强组织通透性，将载片置于 0.3%Triton X-100(在 PBS 内)10~15min。

（6）PBS 洗 3×5min。

（7）在蛋白激酶 K（1μg/ml）溶于 Tris -HCl（0.1mol/L, pH8.0）和 EDTA

(50mmol/L,pH8) 中 37℃20min。也有用蛋白激酶 K 溶液, 不加 EDTA 的。

(8) 浸入新鲜配制的 4%多聚甲醛(在 PBS0.1mol/L,pH7.2) 3min 以终止消化作用和再固定。

(9) 浸入新鲜配制的含 0.25% (V/V) 三乙醇胺(0.1mol/l pH8.0) 中, 10min 以达乙酰化(acetylate)的目的。

(10) 预杂交: 在 50% (V/V) 甲酰胺溶于 4×SSC 预热 37℃15~45min。

(11) 杂交: 将载片上过量的甲酰胺液倾去, 加 20μl 杂交混合液(含放射性同位素标记的探针量为 5×10³~10⁶cpm/每张载片)。覆以硅化的盖玻片, 置于盛有少量 5×SSC 的硬塑料盒内以保持湿度, 42℃孵育 12~18h。为使载片不致于浸泡于 SSC 溶液内, 通常以二根玻管(或棒)扎成担架状, 载片置于玻棒上, 与盐液不接触, 但可保持盒内空气湿润。

(12) 杂交后漂洗

①以小烧杯盛适量 4×SSC 溶液, 将载片一端斜插入溶液内, 轻轻抖动以移除盖玻片。

②将载片置于有刻度的染色用小方玻璃缸内, 加入 42℃(预热) 4×SSC, 3×20min。在漂洗过程中宜不断振动, 以增强漂洗效果。如设有调整钮的振动台更为理想。

③加 20μlRNA 酶溶液(20μg/ml) 在 NaCl(0.5mol/L)、Tris -HCl (pH8.0)和 EDTA (1mmol/L,pH8.0) 消化未杂交探针, 42℃30min(也有不加 EDTA 的)。

④以递减梯度盐溶液 SSC 漂洗载片: 2×SSC, 0.1×SSC 和 0.05×SSC 各 30min 42℃。

⑤梯度酒精脱水: 70%, 90%, 2×100%酒精含 0.3mol/L 乙酰胺, 室温, 每次 10min, 空气干燥后待进行放射自显影。

(13) 放射自显影和复染

①在暗室中预热水浴至 45℃, 将分装的核乳胶溶液小瓶置水浴中浸泡至少 1h, 同时预热一电热板至 45℃。将杂交后漂洗过完全干燥的载片依次排列于玻片架上, 有组织切片一面面向实验者。在实验的载玻片前放 1~2 张无切片的干净玻片, 作为测定核乳胶溶解度与浸片高度等的空白对照片。浸泡(Dipping)过核乳胶膜的载片放入暗盒内, 事先最好将暗盒准备好, 为保持干燥, 放入一包

变色硅胶干燥剂（无水干燥剂为小块蓝色晶体，吸水后呈粉红色，置烤箱中烘干待转成蓝色后可重复应用），预先备好封固暗盒用的胶带备用。

②核乳胶液，国外产品为 ILFord K5 乳胶液，国内核乳胶产品可自原子能研究所订购。不论国产或进口乳胶，事先应（按说明需要浓度）稀释分装在 10ml 小瓶内，密封于暗盒内，4℃ 备用。反复的冷冻和融解核乳胶会增加背景染色。每一小瓶供一次性实验应用。

为节省核乳胶，切片宜贴附在靠近载片的一端。这样，在浸泡时少量乳胶便可充分覆盖切片。

③浸核乳胶（Dipping）：当一切准备工作就绪后，在暗室中（只留安全灯）先将载片置于电热板上预热 1~2min。以空白载片浸入核乳胶液，取出后检查核乳胶是否充分溶解，玻片上有无气泡。然后正式进行切片浸入。浸核乳胶膜是一项需反复操练的技术。以拇、食指夹住玻片一端，以垂直方向进入乳胶，进入的提出均应采取中速度，且速度应保持稳定，提出后可将玻片一端滴下的乳胶轻沾于吸水纸上，掌握好该技术，浸入形成的核乳胶膜厚度适当，均匀一致。依序放在预热 45℃ 的电热板，倾斜度应一致。在 45℃ 电热板上干燥至少 1~2h，在此期间应严格控制在黑暗中。

④装入暗盒曝光：将载片架上已干燥覆有核乳胶的载片放入暗盒内，周围用胶带封固，以标签写明：样品种类，实验者姓名，曝光日期等放在 4℃ 冷房或冰箱内。曝光时间依同位素种类而异，³²P 大约需 5~7 日，³H 需 4 周，但还要参考细胞内 mRNA 的含量而定，含量高者曝光时间宜短，反之宜适当延长。可根据不同曝光时间的实验结果予以调整。曝光时间长可增加信号，但也增加背景，反之，信号减弱，但背景亦低。

⑤显影：取出切片中暗盒（注意：切勿启封），放在室温至少 1h，使其回升到室温。然后在暗室内（只留安全灯），将载片置入 Kodax D19 显影液（预调温至 18~20℃）3min。水冲片刻后入 Kodax F24 固定剂内 3min。上述溶液及水温最好都保持在 18~20℃。突然改变溶液温度会损坏精细的核乳胶膜。另外，在显影和定影过程中不要振荡溶液，因为，这时的乳胶还是处于胶状结构，溶液振荡的冲击可使乳胶膜产生划痕。

⑥冲洗，脱水和复染：用自来水（水冲力勿过猛）冲洗载片 20min，如需要

可用 1% 苏木精复染，复染后自来水冲洗分化 2min，梯度酒精脱水（70%，90%，100%）每次 3min，二甲苯透明，DPX 封片。

（二）培养细胞的原位杂交细胞化学方法

（1）固定：通常将细胞培养在盖玻片或塑料薄膜上，可将盖玻片取出，倾去培养液，用 4% 多聚甲醛液固定 2~4h 后，依组织切片处理法进行 ISHH 实验。也有在 4% 多聚甲醛室温固定 20min 后，由低浓度 30%，50%，70% 酒精各 3min，保留在新鲜配制的 70% 酒精中，4℃，备用。

（2）重回到水：50%，30% 酒精 3min，无菌重蒸水 2×3min，然后置入 PBS 含 5mmol/l MgCl₂ 10min，室温（配制法：200ml PBS, 1ml MgCl₂）。

（3）0.1mol/L 甘氨酸/Tris pH7.4：室温 10min（0.1mol/L 甘氨酸，0.2mol/l Tris（配制法：1.5mg 甘氨酸和 20ml Tris，应用重蒸水制成 200ml））。

以后步骤同（一）组织切片法。

二、生物素标记 cRNA 探针在原位杂交组织化学中的应用

（一）光敏生物素标记 cRNA 探针的应用

以线性质粒 DNA 为模板合成未加标记物的 cRNA 探针，使其最终浓度为 0.5~1.0μg/μl(500~1000ng/μl),再与等体积的光敏生物素（1μg/μl）混合。在 150 瓦卤素灯下，距离光源 20cm 处照射 30min。用仲丁醇抽提游离生物素，再用丁醇沉淀回收光敏生物素 cRNA 探针，将其溶于适量的灭菌双蒸水，用紫外分光光度计测探针的光密度（详第十九章），其最佳工作浓度为 2μg/ml。

切片的制作、预处理、预杂交、杂交和杂交后冲洗的方法同概述中基本方法一节。

光敏生物素核酸探针原位杂交组化程序：

（1）石蜡切片脱蜡入水后，置 0.1mol/l PBS pH7.2 冲洗 5min；冰冻切片直接入 PBS 冲洗 5min。

（2）0.1mol/l 甘氨酸 PBS 冲洗 5min。

（3）0.4% Triton X-100 PBS 冲洗 15min。

（4）蛋白酶 K 1μg/ml（0.1mol/l Tris -HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA 配）37℃ 保温 30min。

（5）4% 多聚甲醛 PBS 固定 5min。

- (6) 0.1mol/l PBS 冲洗 2×3min。
- (7) 0.25%乙酸酐 (0.1mol/l 三乙醇胺配制) 10min。
- (8) 2×SSC 冲洗 10min (1×SSC: 0.15mol/l NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠)。
- (9) 取 10 μ l 含相应探针的杂交液滴于标本上, 如果是 cDNA 探针则用前将探针于 95 $^{\circ}$ C 水浴中保温 10min, 马上放入冰浴中冷却, 然后再用。
- (10) 盖上 22×22mm 的硅化盖片或合适大小的蜡膜, 入温盒 43 $^{\circ}$ C 保温 12~16h。
- (11) 4×SSC 洗脱盖片, 并在同一液中 37 $^{\circ}$ C 漂洗 10~30min。
- (12) 2×SSC (含 20 μ g/ml RNaseA, 适于 RNA 探针) 冲洗 30min, 37 $^{\circ}$ C。
- (13) 1×SSC, 0.1×SSC, 37 $^{\circ}$ C 各漂洗 10~30min。
- (14) 0.05mol/l PBS 冲洗 4×5min。
- (15) 3%BSA (0.4%Triton X-100 PBS 配) 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。
- (16) Avidin -AKP(碱性磷酸酶) (1: 500~1: 100, 0.4%Triton X-100 PBS 配) 室温 1~3h。
- (17) 0.05mol/l PBS 冲洗 4×5min。
- (18) TSM1 冲洗 2×5min。
- (19) TSM2 冲洗 2×5min。
- (20) 硝基四氮唑蓝 (NBT) 0.4%mg/ml 和 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸 (BCIP) 0.2mg/ml 混合液显色, 室温, 暗处 3h。
- (21) 20mmol/l EDTA, pH8.0 终止显色。
- (22) 甘油明胶直接封片。

结果: 杂交阳性部位着蓝黑色。

组织处理及预杂交所用器皿需高温消毒, 实验者需戴手套。

(二) 酶促生物素标记 cRNA 探针的应用

基本方法和放射性标记 cRNA 探针同, 所不同的是探针浓度为 2.5 μ g/ μ l。显示探针反应步骤如下。

- (1) 用 PBS 冲洗粘附有切片的载片 2×3min。根据情况也可用漂洗法。
- (2) 将载片浸入 0.3%H₂O₂ 在 PBS 或甲醇内 30min 以封闭内源性过氧化物酶。

(3) PBS 冲洗 2×3 min, 用吸水纸拭干切片周围的水份, 加入小鼠抗生物素血清 1: 100 和 PBS 含正常羊血清 (1: 30), 室温 1h, 或 4°C 过夜。

(4) PBS 彻底冲洗。

(5) 载片加生物素化抗小鼠 IgG (1: 100) 30min 室温。

(6) PBS 彻底冲洗。

(7) 应用 ABC 复合物与等量的 1%牛血清白蛋白-PBS 液混合孵育 1h, 室温。

(8) PBS 彻底冲洗。

(9) 将切片覆以新鲜配制的 0.025%DAB 溶液, 0.02% H_2O_2 , 孵育 3~15min。

(10) 水洗, 复染, 脱水, 透明和以甘油/PBS 或 DPX 封固。如需要可用银染, 多层 ABC 或 PAP 法加强染色效果。

三、地高辛标记 cRNA 探针的应用

(一) 基本原理

地高辛 (Digoxigenin 简写 Digo-) 又称异羟基洋地黄毒甙配基, 这种类固醇半抗原仅限于洋地黄类植物, 其抗体与其它任何固醇类似物如人体中的性激素等无交叉反应, 地高辛配基标记于脱氧尿嘧啶三磷酸核苷 (dUTP) 上形成 digoxigenin-11-dUTP (图 20-3)。通过随机引物或缺口翻译法 (多用随机引物法), 将 dig-11-dUTP 与探针的核酸分子相连, 构成 Dig-配基标记的核酸探针。将这种标记的探针与组织、细胞或染色体原位核酸分子之间的同源序列在一定条件下互补杂交, 然后用偶联有酶或荧光素的羊抗高地辛抗体 Tab (抗原结合片段) 结合物作为酶标或荧光标记, 再分别用显色底物使杂交部位显色或产生荧光以达到检测目的, 其反应过程见图 20-3。

图 20-3 地高辛标记的探针检测酶联免疫反应

常用的免疫酶学检测方法有两类: 一是 Dig-HRP (辣根过氧化物酶) 检测体系, 以 DAB (四氯化二氨基联苯胺) / H_2O_2 为底物, 结果为棕色; 或以 4-氯-1-萘酚/ H_2O_2 为底物, 结果为蓝色。另一是 Dig-AKP 检测体系: 以 BCIP/NBT 为底物, 结果为蓝紫色沉淀。与免疫细胞化学方法相似, 如应用酶促反应会较单一信号的标记物如荧光素具有更高的灵敏度。同样是酶促化学反应, AKP 灵敏

度和分辨率较 HRP 高约 10 倍左右，但 HRP 的优点为价廉、稳定。

应用地高辛标记的核酸探针也较稳定，据报告在 -20°C 贮存可达 2 年，随时要取用，不像放射性标记探针有半衰期所致的时间限制。但在现实应用中，仍喜欢采用新鲜的地高辛配基标记 3~6 个月以内的核酸探针。为节省核酸探针的用量，凡使用过的含有探针的杂交液也可反复多次使用，特别是对于已知的重复性实验。对于细胞或组织内未知 mRNA 的检测，仍宜采用未使用过的探针杂交液为佳。

与放射性标记相比，地高辛标记探针具有非放射性探针的优点，对人体无害，不受半衰期限制，探针可长期保存。与生物素标记探针相比，地高辛探针不受组织、细胞中内源性生物素的干扰，敏感性高。由于地高辛具有灵敏度及分辨率高，反应产物颜色鲜艳，反差好，背景染色低，制备探针可较长期保存，对人体无害等优点，已日益显示出它的优越性和广泛的应用前景。它不仅可应用于原位杂交细胞化学，还可应用于 Southern 印迹杂交法检测特定基因组序列，进行 RFLP 分析用于基因诊断，菌落原位杂交，噬菌斑原位杂交，固定细胞及中期染色体原位杂交以及生物体液中，组织中病毒 DNA 序列的检测。这一技术还被应用于检测 DNA 标记物及测序，对人类染色体连锁图谱进行构建和基因图谱分析。

（二）基本操作步骤

组织处理及预杂交等步骤与本章中叙述的放射性同位素标记 cRNA 探针相同，但由于地高辛标记 cRNA 探针在原位杂交细胞化学中已愈来愈得到广泛的应用，我们在基本方法中仍较详细的叙述其操作过程。

1. 组织前处理在组织制片中以冷冻切片（厚 $10\sim 30\mu\text{m}$ ）最佳。切片贴在预先清洁，高温处理并涂以粘附剂载玻片上，先在 37°C 预干燥 4h，然后置于 37°C 烤箱中过夜。经过上述处理的切片如在 -20°C 可保存 2~3 周，在 -70°C 可保存数月之久，有报告可保存数年之久的。但仍以新鲜制片为好。如为石蜡包埋切片，应脱蜡经梯度酒精入水。一般不提倡浸入二甲苯溶液。但在细胞内 mRNA 含量高时应用二甲苯脱蜡后仍能显示。经水洗后入 37°C 烤箱 4h 或过夜，然后进行杂交前处理。

在烘烤及低温保存时，为防尘埃及空气中 RNA 酶的污染，宜用锡箔纸（foilpaper）包被，内加少许干燥剂（变色硅胶）。

下列步骤所需玻璃器皿均需消毒，操作者需戴手套。

(1) PBS 洗 2×3min。

(2) 选择少数几张切片作为“RNA 酶对照片”。

其它切片暂放于 PBs 内。

RNA 酶对照片处理方法：加 RNA 酶（100 μ g/ml）在预热 37 $^{\circ}$ C 的溶液内。放在潮湿的盛有少许 2×SSC 塑料盒或蒸发皿内。在每张切片上覆以过量的 RNA 酶溶液，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后用 2×SSC 冲洗，2×3min，然后与其它保存在 PBS 的切片一起进行下列处理。

(3) 蛋白酶 K 消化：将组织切片放在 0.1mol/l Tris/50mmol/L EDTA pH8.0，内含蛋白酶 K 1 μ g/ml，孵育 15~20min。消化时间应根据组织的种类，厚度反复试验调整。时间过短探针不易进入，过长影响细胞或组织的形态结构。

(4) 0.1mol/L 甘氨酸/PBs 5min 终止蛋白酶 K 反应。0.25%乙酸酐（0.1mol/l 三乙醇胺配制）10min。

(5) 在 4%多聚甲醛/PBs 3min。

(6) 以 PBs 漂洗 2×3min。

(7) 浸入新鲜配制的 0.25%乙酸酐（0.1mol/L 三乙醇胺配制）10min，以封闭非特异性结合部位。

(8) 2×SSC 漂洗 15min。

2. 杂交以含 cRNA 探针（0.5ng/ml）的杂交液，按每张切片 10~2 μ l 的量覆盖切片。地高辛配基标记的 cRNA 核酸探针保存浓度为 2.5ng/ml，用前稀释备用。覆以硅化盖玻片或塑料蜡膜，置于盛有少量 2×SSC 温盒内在 42 $^{\circ}$ C，16~18h 或过夜。

3. 显示

(1) 用缓冲液 1 冲洗杂交后的载片 2×3min。

(2) 在缓冲液 1 中 10min，室温以封闭非特异性结合部位。

(3) 拭干切片周围的载片，注意保持切片湿润。加数滴抗地高辛抗血清（工作浓度 1: 500，以缓冲液 1 稀释），孵育 2h，室温。

(4) 缓冲液 1 漂洗 3×3min。

(5) 浸入缓冲液 2 10min 室温。

(6) 浸入底物中孵育 10~30min (或更长时间, 视需要而定), 底物内含显色 BCIP/NBT, 室温。最好用锡箔纸包裹反应盒, 使显色在黑暗中进行。定期取出切片在显微镜下检测反应强度。根据反应强度决定延长或终止反应。反应颜色为紫蓝色。

(7) 将切片浸入缓冲液 3 以终止反应。

(8) 复染, 可用 1%伊红、1%苏木精、1%亮绿或 5%的焦宁 (又称派咯宁 γ) (pyronin γ) 10~30s。

(9) 流水洗 5~10min, 直至水无色为止。

(10) 在切片未干前, 以 PBS/甘油封固切片, 如要永久保存, 可以用 DPX 在盖片四周封固。为去除水份, 在封固前可进行梯度酒精脱水, 透明, DPX 封固, 但每步时间仅需几秒钟, 时间过长易致褪色。

几点说明

①缓冲液 1, 2, 3 配制法见附录。缓冲液 1 中 BSA 用量大, 价贵, 如无法负担可略去。

②切片处理过程可采取漂浮法或载片染色法, 载片染色适用于切片数数量较少时, 可用液体覆盖于切片表面进行孵育, 漂洗在烧杯内进行。如切片多, 可将载片置于方形的染色缸 (staining jar) 内, 将冲洗液加入缸内, 如有振荡器在漂洗中稍加震荡更有助于减低背景染色。漂浮法适用于切片数量大量, 将切片置于凹形碟内, 或染色缸内。漂浮法的优点是节约试剂用量, 切片两面均可接触反应液, 有利于信号的增强。

③在底物中孵育时间过长会产生弱强的非特异性染色, 有时甚至误为阳性反应。解决方法一是设置对照片, 二是对非特异性染色加以区别。非特异性染色与特异性染色的主要区别点在于后者有结构性定位, 而前者系无结构性定位, 常在切片边缘或细胞密集处呈现较强的颜色反应。

④在组织前处理中应严格注意控制 RNA 酶的污染, 包括戴手套、器皿消毒等。另外, 和免疫细胞化学一样, 自始至终应保持切片的湿润, 勿令其干燥。