

## DNA 及寡核苷酸探针在原位杂交组织化学

### 一、DNA 探针的应用

虽然一般认为 DNA 探针敏感度不如 cRNA 探针，但在病毒的检测等领域中 DNA 探针仍得到广泛的应用。

在原位杂交细胞化学的操作步骤方面与 cRNA 探针基本相同，所不同的是：

(1)杂交时需先在高温 80~95℃短时处理，使 DNA 探针及细胞内靶 DNA 变性，解离成单链，迅置于冰上冷却。然后置于 37℃~42℃杂交过夜。(2) RNA 酶的溶液的冲洗不能减低背景，因此，在操作步骤中省略此步。

(一) 地高辛-碱性磷酸酶 (Dig -AKP) 标记 DNA 探针在石蜡包埋切片检测病毒 DNA 中的应用

#### 1. 组织前处理

(1) 固定：组织以 10%中性福尔马林液或 Bouins 液固定，常规石蜡包埋，切片厚 4~6 $\mu$ m，粘附于涂有粘附剂的玻片上，入烤箱 60~80℃6~8h，使切片更紧贴玻片。

(2) 脱蜡：二甲苯 10min  $\times$ 2，自 100%乙醇，90%，70%，50%，30%各 5min。入 PBS (含 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>,pH7.3~7.4) 10min $\times$ 2。入 0.2n HCl 20min 以进一步去除蛋白。

(3) 50℃2 $\times$ SSC，含 5mmol/l EDTA 溶液中 30min。

(4) 蛋白酶 K (1 $\mu$ g/ml 溶于 0.1mol/l PBS 中,) 37℃20~25min。

(5) 0.2mol/l 甘氨酸液：室温 10min，中止蛋白酶反应。

(6) 4%多聚甲醛 (PBS 新鲜配制)：室温 20min。

(7) PBS/5mmol/l MgCl<sub>2</sub> 漂洗 10min $\times$ 2。

(8) 脱水，自低浓度到高浓度，无水乙醇各 3min，空气干燥。

2. 预杂交封闭非特异性杂交位点，20 $\mu$ l/每张切片，42℃水浴半小时。

3. 杂交 10~20 $\mu$ l/每张切片，加盖硅化盖玻片，将切片置于 95℃min，使探针及病毒 DNA 变性，然后迅速置于冰上 1min (也有报告用乙醇使之冷却的)，然后将切片置于盛有 2 $\times$ SSC 湿盒内，42℃过夜 (16~18h)。

#### 4. 杂交后漂洗

(1) 2 $\times$ SSC 液内振动移除盖片。

(2)  $2\times\text{SSc } 55^{\circ}\text{C } 10\text{min}\times 2$ 。

(3)  $0.5\times\text{SSc } 55^{\circ}\text{C } 5\text{min}\times 2$ 。

(4) 缓冲液 II (含 0.5%封阻试剂, 用缓冲液 I 溶解)  $37^{\circ}\text{C } 30\text{min}$ 。

(5) 缓冲液 I ( $10\text{mmol/l Tris -HCl}$ ,  $15.0\text{mmol/L NaCl pH7.5}$ )  $15\text{min}$ , 室温。

(6) 酶标地高辛抗体 (1: 5000, 应用缓冲液 I 稀释)  $37^{\circ}\text{C } 30\text{min}$ 。

(7) 缓冲液 i  $15\text{min}\times 2$  室温。

(8) 缓冲液 III ( $100\text{mmol/l Tris -HCl}$ ,  $100\text{mmol/L NaCl}$ ,  $50\text{mmol/L MgCl}_2$ ,  $\text{pH}9.5$ ) 室温  $2\text{min}$ 。

## 5. 显色

(1) 显色液配制: 缓冲液 III:  $1\text{ml}$  中加入  $4.5\mu\text{l}$  四氮唑蓝 (NBT),  $3.5\mu\text{l}$  X-磷酸盐 (5-溴-4-氯-3 吡啶磷酸盐 (BCIP 配成))。  $30\mu\text{l}$ /每张切片, 置暗处显色  $30\text{min}$  到  $2\text{h}$ 。定时抽查切片, 镜检其显色情况。

(2) 缓冲 IV ( $10\text{mmol/l Tris -HCl}$ ,  $1\text{mmol/L EDTA}$ ,  $\text{pH}8.0$ )  $10\text{min}$  终止反应, 甲绿复染  $5\text{min}$ , 二甲苯透明, DPX 封固, 镜检。

### (二) 荧光标记 DNA 探针的应用

1. 概述在原位杂交细胞化学中荧光标记 DNA 探针 (Fluorescence in situ DNA hybridisation, FISH) 的应用在细胞培养和染色体铺片 (见二十一章) 中较为广泛。FISH 属于非放射性标记, 其优点在于简便, 快速, 其敏感性可与放射性同位素标记核酸探针相等。不少实验室报告应用 FISH ( $2\sim 5\text{kbp}$  探针) 可成功地达到单个拷贝 (copy) 的特异性定位。

2. 荧光标记 DNA 探针应用于 ISHH 中的基本原则 (Barbara Traok 和 Dan Pinkel 1990)

(1) 首先应使组织或染色体中靶核苷酸高温加热变性解离为单链 DNA, 化学性标记的 DNA 探针除外。

(2) 杂交: 一般在  $37^{\circ}\text{C}$  进行, 探针稀释浓度在  $2\text{ng}/\mu\text{l}$ , 染色体铺片探针浓度在  $0.4\text{ng}/\mu\text{l}$ , 杂交液  $2\sim 3\mu\text{l}$ /每  $\text{cm}^2$  盖片, 每张盖片大约  $1.8\text{cm}^2$ , 约需  $10\mu\text{l}$  杂交液。有实验室报告, 如每张盖片 (温度为室温) 加入杂交液将会降低杂交温度所需要的  $37^{\circ}\text{C}$ , 因此, 建议对盖片应用前在  $37^{\circ}\text{C}$  进行预热。

(3) 用免疫细胞化学或组织化学方法显示荧光标记。自 80 年代以来, 荧光

素标记检测系统日益增加。包括：①生物素标记探针与荧光素标记的抗生物素（avidin）或抗生物素抗体。②氨乙酰基荧光（aminoacetylfluorence,AAF）-改良探针（modified probe），与抗 AAF 抗血清。③磺酸（sulfonate）改良探针，以抗磺酸抗血清检测（Organic Ltd, Yavene, Israel 和 TMc Bioproducts Rockland ME 可提供此药盒）。④汞标记探针（mercurated probe），以巯基（sulfhydryl）与荧光标记物或-半抗原相结合，再以抗半抗原抗血清检测。⑤地高辛标记探针，以地高辛抗血清检测（Boehringer – Mannheim Inc, Mannheim, FRG 可提供此药盒）。在上述各例中，为简便可采用直接法（图 20-4A），为提高敏感度可采用间接法（图 20-4B）。

图 20-4 生物素标记核酸探针荧光免疫反应图解

生物素和地高辛用缺口平移法或随机引物法进行标记，以用后者为多。氨乙酰基荧光素，磺酸和汞的核苷酸探针标记利用简单的化学反应。产生荧光的物质各有不同，常用的有异硫氰酸荧光素（FITC），也有应用德克萨斯红（Texas Red）获得满意效果的。但藻红素（Phycoerythrin）应用效果较差，可能由于分子大的缘故。可同时应用 AAF 和生物素标记系统及汞与生物素系统分别应用不同的荧光素去标记两条 DNA 进行双重染色。

### 3. 基本操作方法

（1）玻片准备：细胞用甲醇：醋酸（3：1）固定，滴在玻片上可保存在-20℃，如将此载片烘烤于 65℃数小时，将会导致样品的人工老化。应用相差显微镜在低倍下定位最佳区域，或用嘴轻吹气的方法可以看见浮动的细胞。在玻片背面圈出盖片应覆盖的区域。

（2）RNA 酶处理：加 50μlRNA 酶溶液，盖以盖玻片，放在湿盒内（2×SSC）37℃1h。应用 2×SSC 漂洗 2×3min，室温，梯度酒精脱水（70%，90%，100%），在空气中干燥。

（3）蛋白酶 K 和多聚甲醛处理：对单个拷贝杂交，蛋白酶 K 溶液（0.3~0.6μg/ml，在 20mmol/l Tris-HCl, pH7.5, 2mmol/L CaCl<sub>2</sub>）在 37℃孵育 2h。此法对甲醇-醋酸固定的淋巴细胞效果特佳，但这种浓度的蛋白酶 K 溶液对未事先经多聚甲醛固定的染色体制片可在靶 DNA 变性步骤中完全破坏。因此，需根据细

胞类型调整溶液的浓度和孵育时间。蛋白酶 K 消化后，以 2×SSC，在室温漂洗 2min×3，再固定于 4%多聚甲醛溶液中，室温 10min。2×SSC 洗 2min×3。

(4) 靶 DNA 变性：将载片浸入 70℃变性溶液（70%甲酰胺，2×SSC）2min。新鲜的变性溶液需每周配制，贮存于 4℃冰箱中备用。一张处于室温的载片放入 50ml 的染色缸（coplin jar）内，将会使溶液温度减低约 1℃，因此，每次应加入少量玻片，以免影响溶液的温度致变性不完全。冷却变性处理后的载片可放在冰上或浸入 70%酒精溶液 1min。漂洗加震动以终止反应和彻底去除变性溶液。然后经梯度酒精脱水（80%，90%，100%），空气干燥。

#### (5) 杂交液的准备

MM1	甲酰胺	5.0ml
	硫酸葡聚糖	1.0g
20×SSC		1.0ml
	（或 50%硫酸葡聚糖）	2.0ml
MM2	甲酰胺	5.5ml
	硫酸葡聚糖	1.0gm
20×SSC		0.5ml

首先将溶液在 70℃加温，以溶解硫酸葡聚糖，冷却后调整 pH 至 7.0,容量加至 70ml。这容量是最后应用的杂交混合液的 70%，其余的 30%为核酸探针和水（如果需要的话）。MM1 给预杂交混合液是：50%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖 2×SSC。Trask 发现 MM2 效果较 MM1 好，DNA 的  $T_m$  比 MM1 低-8℃。在 2×2cm 区域杂交混合液应为：MM17μl，DNA 探针（保存液为 500μg~10mg/ml）1μl，加探针混合液 2μl，总量为 10μl。

(6) 杂交：每张盖玻片加 10μl 杂交混合液，注意移除气泡，可在盖片四周加橡皮泥封固，在 37℃湿盒中过夜。

(7) 漂洗：从温箱中取出后，以镊子移除橡皮泥，从现在起注意勿使载片干燥。否则盐的晶体将产生非特异性背景染色，漂洗应用 2×SSC（pH7）在 45℃3min×3。不时震动以助彻底漂洗，盖玻片将在漂洗中自然移除。然后再在 2×SSC，45℃，2min×3。保存载片于 PBS 溶液内。

#### (8) 荧光显示：

### ①生物素标记 DNA 探针的荧光显示。

1)应用 PBS 含 5%无脂干奶(5 $\mu$ l 每张盖片),也可用 1%牛血清白蛋白(BSA)-PBS 覆盖孵育 5min 室温,以封闭非特异性结合部位。

2) 移除多余液体,加抗生素-FITC (5 $\mu$ g/ml 在 PBS 含 5%奶粉或 1%BSA, 5 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>)。在湿盒中,室温孵育 20min。抗生物素-FITC 在此应用是过量的,因此,可回收贮存 4 $^{\circ}$ C 再次应用,其保存时间可达数周。反应见图 20-4A 直接法。

3) 漂洗: PBs 2min $\times$ 3, 45 $^{\circ}$ C。

4) 如需放大(amplification),即提高其敏感度,可按图 20-4B 间接法加生物素化羊抗抗生物素抗血清(biotinylated goat – antivaidin antibody) 30min 室温。倾去加另一层抗生物素-FITC 抗血清孵育 20min,重复上述 1) ~3)。

### ②AAF 标记核酸探针的荧光显示

1) 封闭非特异性结合部位: 从 PBS 中取出载片,吸干多余液体,加 PBS-0.1%吐温(Tween)含 2%正常羊血清(NGS)(5 $\mu$ l/每 cm<sup>2</sup> 盖玻片)。使载片停留在室温 5min。

2) 倾去多余液体,加抗-AAF 抗血清 1: 750, PBS-Tween –NGS 溶液(如上 i) 5 $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 盖玻片。室温 37 $^{\circ}$ C。孵育 30min。

3) 漂洗: PBS-0.1%Tween 室温 5min $\times$ 3, 间歇性振荡。

4)羊抗小鼠 IgG-FITC 孵育, 1: 300~1: 1000 在 PBS-0.1%Tween 含 2%NGS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 如 3) 应用 PBS-0.1%Tween 漂洗 5min $\times$ 3。

### 4. 荧光标记 DNA 探针在细胞核混悬液杂交中的应用

(1) 细胞核的分离: 将培养的细胞制成细胞混悬液,或以胰蛋白酶消化法于培养盖上收集培养细胞。应用 MgSO<sub>4</sub> 染色分离方法分离细胞核(Van den Engh et al 1986, 在 Traok 和 Van Den Engh 34 章)。细胞混悬液浓度为 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml。利用 RNA 酶消化后,使核从细胞分离,细胞核混悬液浓度为 4~5 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞核/ml。

(2) 细胞固定和酸的处理: 在 5ml 试管内加冷的 100%酒精不断旋转以达到满意的固定。在冰上停留 10min。在 4 $^{\circ}$ C 离心( $\times$ 150g) 10min。重复加三次冷的 100%酒精入试管内,离心,倾去。置于冰上 10min,再离心。然后加入相当核悬液 1/2 量的 0.1n HCl, 0.5% Triton X-100。室温停留 10min。加入 IBM-0.25%Triton X-100 (IBM 配方: 50mmol/l KCl, 10mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 5mmol/L

HEPES pH8.0)。再离心，重复 IBM 漂洗（这时细胞核可在不染色情况下，以荧光显微镜观察）后，以  $2\times\text{SSC}-0.1\%\text{Tween}$  漂洗  $1\times 3\text{min}$ ，继之加入等量 2% 的多聚甲醛在  $1\times\text{PBS}-5\text{mmol/l MgSO}_4$ 。在室温静置站立 10min。倾去上清液，加 IBM-Triton X-100 漂洗，离心，使细胞核混悬液最终浓度为 108/ml，（可用 IBM-Triton X-100 稀释约 50 倍，在血球计数器计数），混悬液镜检应含单个，完整的细胞核。

### （3）细胞核混悬液杂交

①配制杂交混合液：甲酰胺 5 份， $20\times\text{SSC}$  1 份，50%硫酸葡聚糖 2 份，pH 调至 7.0。此原液（stock solution）可贮存在  $4^\circ\text{C}$  冰箱内。应用时加 1 份 10mg/ml 鲑鱼精子 DNA（herring sperm DNA）。

②混合 1 $\mu\text{l}$  的细胞核混悬液（108/ml）与 18 $\mu\text{l}$  的杂交混合液，充分混匀。将此 19 $\mu\text{l}$  混合液移入 1.5ml 容积的 Eppendorf 管中（核含量约为 105）。

③加入 100ng/每管的 AAF 标记 DNA 探针（如为生物素标记 DNA 探针浓度为 20~40ng/每管）。

④置  $70^\circ\text{C}$  10min 使 DNA 探针和核 DNA 变性。

⑤和组织切片与 DNA 探针杂交方法相较，不同的是在加热变性后切勿置冰上迅速冷却以终止反应，而应迅速转入  $37^\circ\text{C}$  孵育过夜。

### （4）杂交后漂洗

①在每管中加入 1.25ml 50%甲酰胺- $2\times\text{SSC}$ (pH7.0)，在  $42^\circ\text{C}$  静置 10~15min。偶尔旋转以助混匀。冷却至室温。加 100 $\mu\text{l}$  经 dimethylsuberimidate(DEMS)处理的血细胞（107/ml）混匀，离心，室温，10min，轻弹试管使沉淀的小块散开，加入 1.25ml  $2\times\text{SSC}$ (pH7.0)， $42^\circ\text{C}$ ，继之，静置于室温 10~15min，如前离心，再加 1.25ml IBM-Triton X-100,室温静置 5min，离心。

注：DEMS 处理红细胞方法：经漂洗并离心去除白细胞和血清的红细胞在盐液如 PBS 中，细胞含量为 108/ml，以  $\text{K}_2\text{CO}_3$  和 DEMS 溶液处理 3 次，第 1 次： $\text{K}_2\text{CO}_3$  为 20mmol/L,DEMS 为 3mmol/L，以后 2 次： $\text{K}_2\text{CO}_3$  依然为 20mmol/L，而 DEMS 为 10mmol/L。在应用前将  $\text{K}_2\text{CO}_3$  和 DEMS 液混合加入红细胞混悬液中。在最后 2 次漂洗液中，应用 100mmol/l  $\text{K}_2\text{CO}_3$  将 pH 调至 9~10。在  $25^\circ\text{C}$ ，15min 后，加入 50 $\mu\text{l}$ ，100mmol/l 的柠檬酸（citric acid）/每 ml 细胞混悬液的浓度以达固定红细胞的目的。固定的红细胞离心倾去上清液后，用  $2\times\text{SSC}$  稀释到

108/ml, 加 0.1%叠氮钠可在 4℃保存至少 1 年。

(5) AFF 标记的荧光显示: 加 200 $\mu$ l 的 PBS 含 0.05%Tween 和 2%正常血清 (NGS), 轻轻振荡混匀, 室温静置 10min, 加 20 $\mu$ l 1: 100 的单克隆抗 AFF 抗体, 37℃孵育 45min, 加 1.25ml 的 PBS-Tween, 室温静置 10min, 加 20 间歇性振荡, 离心, 倾去上清液, 加 200 $\mu$ lPBS 含 0.05%Tween -2%NGS,振荡, 室温静置 10min, 加 20 $\mu$ l 的羊抗小鼠-FITC 荧光标记抗血清, 稀释度 1: 100~1: 300。孵育于 37℃45min, 加 1.25ml PBS -Tween,室温静置 10min, 离心, 倾去上清液。

(6) 生物素标记探针的荧光显示: 加 200 $\mu$ l 4 $\times$ SSC 含 0.1%Trion X-100 和 5%BSA。室温静置 10min 后, 加 20 $\mu$ l 抗生物素标记 FITC 抗血清 15 $\mu$ g/ml, 孵育在 37℃30min, 以 1.5ml 4 $\times$ SSc -0.1% Trion X-100 洗 1 次, 加入 1.25ml IBm -Triton X-100,室温静置 10~15min, 间歇振荡、离心。

(7) 荧光显微镜观察: 将细胞核混悬液稀释于 250 $\mu$ l 的 IBM-Trion X-100 中, 轻加振荡混匀。为抗荧光褪色可加等量的抗褪色溶液至载片上的细胞核涂片上, 选择适当的激发波长观察。

(8) 流式细胞计: 将 750 $\mu$ l 的细胞核混悬液通过流式细胞仪 (Flow cytometry, FCM), DEMS 处理过的红细胞作为对照 (Df 530/30nm, Omega ·Optical Inc, Brattleboro, VT)。详细操作见第十章。

## 二、寡核苷酸探针的应用

寡核苷酸探针的优点在于它能根据需要人工用 DNA 合成仪合成, 其长度及分子大小比较一致, 可以控制。其长度一般较克隆的 DNA 片段短。目前, 寡核苷酸探针已能成功的为放射性同位素、荧光素、生物素和地高辛所标记, 并成功地运用于培养细胞、组织切片和染色体铺片等的原位杂交中。虽然有些科技工作者认为其敏感度不如来自质粒扩增的 cRNA 或 DNA 探针, 但由于探针制备简便再加之于近年非放射性标记的成功, 寡核苷酸探针在生物基础医学及临床学科领域中得到较为广泛的应用。

在原位杂交组织化学中应用寡核苷酸探针, 其基本操作要点是相同的, 如杂交温度在  $T_m - 25^\circ\text{C}$ , 杂交孵育时间以过夜 (16h 左右) 为佳。应用寡核苷酸探针在原位杂交组织化学技术中的成功与否主要决定于探针的设计, 使有效配对率增加而错配 (mismatch) 减少。

## (一) 地高辛标记寡核苷酸探针的应用

### 1. 组织处理

(1) 冷冻切片: 厚 10~20 $\mu\text{m}$ , 贴于事先经清洁处理及涂有粘附剂的切片上。切片保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ , 在应用于杂交实验前, 使迅速回升到室温, 干燥, 固定于 3% 多聚甲醛-PBS 溶液中, pH7.4。PBS 漂洗 5min $\times$ 3, 孵育在 2 $\times$ SSc 10min。

(2) 石蜡包埋切片: 浸入二甲苯 10min 移除石蜡, 以 100%乙醇 10min $\times$ 2, 空气干燥 10min, 从高到低梯度乙醇 (95%, 80%, 70%) 1min/每个浓度。PBs 5min $\times$ 3, 孵育在 2 $\times$ SSc 10min。

(3) 离心细胞涂片: 将细胞先以 4%多聚甲醛固定, 应用离心沉淀法, 将沉淀物涂于有粘附剂的载片上, 应用 PBS (含 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>) 5min $\times$ 3 漂洗。在 0.1mol/L 三乙醇胺含 0.25%(V/V)乙酸酐 10min。在 0.2mol/l Tris -HCl 含(0.1mol/L 甘氨酸) pH7.410min。孵育在 2 $\times$ SSc 10min。

2. 探针准备 35pmol 的寡核苷酸 (oligo -) 探针, 3' 终末标记以地高辛 -11-dUTP。

3. 预杂交和杂交加约 300 $\mu\text{l}$  预杂交液 (配制法见附录) 在每张载片上, 室温孵育 1h。如为鲑鱼精子 DNA, 在应用前须在沸水浴中加热 10min, 而对酵母 tRNA 可不用加热变性。

(1) 应用预杂交液稀释地高辛标记的 Oligo-探针, 探针理想工作浓度根据于待测核苷酸含量和实践的结果。如对于检测大鼠垂体的前促黑激素 (proopiomelanocortin,POMC) mRNA 的 Oligo -探针, 其理想工作浓度为 342ng/ml(0.342ng/ $\mu\text{l}$ )。

(2) 预杂交后以 2 $\times$ SSC 漂洗, 以吸水纸拭干切片周围水份, 加 30 $\mu\text{l}$  杂交液在切片上, 加硅化盖玻片, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。如探针大于 36 碱基则杂交温度为 42 $^{\circ}\text{C}$ 。次日室温 2 $\times$ SSC 液漂洗切片 1h, 1 $\times$ SSC 漂洗切片 1h (室温), 0.5 $\times$ SSc 37 $^{\circ}\text{C}$ 漂洗半小时, 0.5 $\times$ SSC 室温漂洗半小时。

4. 地高辛显示 (同前)。

## (二) 同位素标记寡核苷酸探针的应用

1. 组织处理大鼠应用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 经心脏灌注 4%多聚甲醛-磷酸缓冲液中, 约 2h 后 (也可置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜) 取脑浸于同样固定液中加

10%蔗糖溶液过夜，4℃。次日恒冷箱切片（-14℃），厚 14μm 左右，贴于有粘附剂的载片上，37℃或室温干燥以增加切片的粘附性。

2. 杂交前处理同本章 第二节 放射性标记 cRNA 探针一节。

3. 杂交 37℃过夜，余细胞同前。

4. 杂交后漂洗 2×SSc 5min×3，1×SSc 1min 室温，0.5×SSc 55℃15min×2，室温漂洗于 0.5×SSc 3min×2。梯度酒精脱水，切片室温干燥。

5. 浸核乳胶切片浸入核乳胶，黑盒封闭，在 4℃曝光 2~3 周（视同位素种类），显影，复染，观察。