

细胞组分的分析方法——核酸序列的原位杂交

一.基本原理

核酸分子杂交技术是目前分子生物学、细胞生物学和生物化学研究中应用最广泛的技术之一，是定性、定量和定位检测两条来源不同的聚核苷酸链上碱基顺序同源性的一种手段。DNA 分子是高度有序的双链分子。一条链的碱基与另一条链的碱基以氢键配对相连，形成腺嘌呤与胸腺嘧啶(A. T)，鸟嘌呤与胞嘧啶(G.C)的特定碱基对；在 RNA 中则为 A 与 U(尿嘧啶)，G 与 C 配对。

在碱性环境加热或加入变性剂的条件下，核酸分子双链之间的氢键被破坏，解链成两条单链(称为变性)。此时如果加入已知 DNA 和 RNA 片段(称为探针)，在一定的离子强度和温度下，两条具有互补碱基顺序的 DNA 与相应的 cDNA 或 RNA，RNA 与相应的 RNA 或 cDNA 均可形成双链分子结构(称为复性)，这种由互补碱基顺序的任何单链核酸分子片段形成双链的过程称为分子杂交(Molecular hybridization)。

核酸分子杂交可分为液相杂交、固相杂交和原位杂交等三种类型。

原位杂交(Hybridization in situ)即原位核酸分子杂交。此法最早(1969)用于细胞内核糖体 RNA 的定位等研究，现在被广泛用来进行细胞内特殊核酸序列的定性、定位和定量的研究，被称为原位杂交组织化学或原位杂交细胞化学(In situ hybridization cytochemistry)。它是将重组 DNA 技术与组织细胞化学技术相结合，在细胞原位显示某种特定基因，mRNA 及其产物(特异蛋白)的表达、定位、半定量和变化规律的一种新技术。cDNA 的制备因所显示的 mRNA 的不同而各异，必须借助于重组 DNA 技术。mRNA 在 RNA 依赖性 DNA 聚合酶的作用下，可反转录产生 cDNA，因此先提取细胞中已知的特定 mRNA，在反转录酶的作用下合成与其互补的 cDNA，经限制性内切酶作用后插入载体质粒 DNA 内。再将该载体转化大肠杆菌，扩增 cDNA，然后分离纯化 cDNA，最后用缺口平移法进行同位素或生物素标记，作为探针待用。

寡聚核苷酸是一种短小的单链分子，比 cDNA 更易穿透组织细胞，并且可按基因片段的核苷酸序列人工合成。因此近年来人们常用它来制备核酸探针。

原位杂交细胞化学技术包括分子探针的制备，用同位素或生物素等标记探针，制作组织切片，预杂交、杂交，显色过程和结果观察等。

二.试剂和器具

1.试剂

主要试剂有玉米 17SrRNA 的 cDNA, 缺口平移试剂盒, 硝酸纤维素膜, 去离子甲酰胺, 焦碳酸二乙酯, 鲑精子 DNA, 纯牛血清白蛋白(BSA), LB 培养基, 氨苄青霉素, 葡聚糖, 溶菌酶, 十二烷基硫酸钠(SDS), EDTA, 生物素(Bio-dUTP), 金标链霉亲和素, 柠檬酸, 柠檬酸钠, 氯化钠, 对苯二酚, AgNO₃, 异丙醇, 巯基乙醇(DTT), 醋酸钾, 冰醋酸, 酚, 氯仿, 乙醇等。

2.器具

主要器具有高速离心机, 电泳仪, 真空干燥箱, 恒温摇床, 超声波发生器等。

环境、器皿的清洁和药品的纯度是该实验成功的关键。RNA 容易被 RNA 酶水解, 而 RNA 酶非常稳定, 所以标本和药品及器皿中应避免 RNA 酶的污染。

三.rDNA 探针的制备和标记

本实验所用探针是玉米 17SrRNA 的 cDNA, 它是以 1.5kb 的片段插入在 PBluescript II SK(一)中 MCS 的 sacI 位点上。

1.重组质粒的转化

(1)将大肠杆菌(E.coli)JM109 单菌落接在 5ml LB 培养液中, 37℃振荡培养过夜。

(2)以 1%的接种量接入 50ml LB 培养液中, 37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 大约为 0.3~0.4 时倒入离心管, 冰浴 10min, 4000rpm 离心 10min, 收集菌体。

(3)将菌体悬浮于 25ml 预冷的 50mmol/LCaCl₂ 溶液中, 冰浴 30min。离心收集菌体, 并重新悬于 3ml 50mmol/LCaCl₂ 中。0℃放置 12-16h, 使之成为感受态细胞。

(4)取重组质粒 0.1μg, 加在 200μl 感受态菌体中, 冰浴 30min, 于 42℃热休克 2min 后再冰浴 2min。

(5)取 1ml LB 培养液加入到上述菌液中, 37℃培养 45min。逐级稀释后, 用内含氨苄青霉素(60μg/ml)的 LB 培养液涂平板, 37℃培养至菌落出现。

2.转化子的筛选及检测

(1)对在氨苄青霉素平板上长出的菌落进行一次复筛, 并培养菌体。

(2)按照微量 DNA 的提取方法(Sambrook et al., 1989)提取微量 DNA, 进行电泳, 检测出含有重组 DNA 质粒的转化子。

3.重组质粒 DNA 的扩增及制备

- (1)将经过复筛的菌落，按 1 中方法(2)进行大量培养。
- (2)取 200ml 培养液，4000rpm 离心 10min，收集菌体，弃上清液。
- (3)加入 4ml 溶液 I (50mmol/L 葡萄糖，25mmol/L Tris，10mmol/L EDTA，pH8. 0)，加入溶菌酶至终浓度为 4~6mg/L，振荡混匀，冰浴 10min。
- (4)加入 8ml 新配制的溶液 II (0. 2N NaOH，10% SDS)，温和颠倒离心管 5 次，冰浴 5-10min。
- (5)加入 6ml 预冷的溶液 III (5mol/L 醋酸钾 60ml，冰醋酸 11. 5ml，重蒸水 28. 5ml)，颠倒离心管使之均匀后冰浴 15min。
- (6)12000×g 离心 20min，弃去沉淀。
- (7)上清液加 2 倍体积的冷乙醇，-20℃放置 1h 以上。
- (8)12000×g 离心 20min，弃上清液，取沉淀，真空干燥。
- (9)将沉淀溶于 500μl TEB (10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA，pH7. 5)，加 RNase 至 20μg/ml，37℃作用 1-4h，以除去 RNA。
- (10)加等体积的饱和酚，振荡混匀后，10000rpm 离心 6min，取液相。
- (11)在液相中加入等体积的酚：氯仿(1： 1)，振荡混匀后 10000rpm 离心 6min，取液相。
- (12)在液相中加入等体积氯仿，振荡混匀，10000rpm 离心 6min，取液相，并加入 2 倍体积的冷乙醇，-20℃沉淀 DNA。
- (13)离心收集 DNA 沉淀，用 70%乙醇洗涤 3 次，真空干燥后溶于 TEB 中，备用。

4.rDNA 片段的制备

- (1)对所得重组质粒 DNA 进行 Sac I 酶切，反应体系如下：Sac I 4μl(约 20 单位)，质粒 DNA 50μl(20μg)，10×缓冲液(0. 5mol/L Tris-HCl，pH7. 5，50mmol/L MgCl₂)10μl，灭菌重蒸水 36μl。
- (2)将反应后的混合物进行琼脂糖凝胶电泳 2—3h，在紫外灯下确定 DNA 片段的位置，从凝胶上切下相应 DNA 片段的凝胶块。
- (3)将上述凝胶块装入透析袋中，一端扎紧，加入 450μl 0. 2×TEB(10mmol/L Tris-HCl，pH7. 5，1mmol/L EDTA)，排除气泡，封上另一端。放入电泳槽中进行电泳，300V 电泳 1. 5h，反向通电 1min。
- (4)从透析袋中吸出溶液，再加 450μl 0. 2×TEB 冲洗透析袋，两次溶液合并后以

12000rpm 离心 15min, 除去凝胶碎块。

(5)用酚、酚/氯仿、氯仿抽提后, 加入 2 倍体积乙醇, 沉淀 DNA 片段, 再用 70%乙醇洗涤并真空干燥, 用 TE 溶解待用。

5.rDNA 片段的生物素标记

本实验用的标记方法是缺口平移法(Nick-translation)。其原理是在未标记的 DNA 探针溶液中加入一定量的 DNase I 和 DNA 聚合酶 I 以及生物素(或同位素)标记的三磷酸核苷酸。DNase I 在 DNA 双链上随机切开若干个有 3'-OH 末端的单链切口, DNA 聚合酶 I 则利用标记的三磷酸核苷酸按 5'-3'方向重新修补缺口, 此新合成的 DNA 的两条链上均匀地被带上标记物。其标记方法如下。

(1)反应体系

10×生物素反应液: 0.5mol/L Tris-HCl, pH7.5, 50mmol/L MgCl₂。

dNTP 溶液: 50mmol/L Tris HCl, pH7.5, 每种 dNTP 的最终浓度为 0.3mmol/L。

生物素化 dUTP 溶液: Bio-dUTP 溶于 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 最终浓度为 0.3mmol/L。

DNA 多聚酶 I 溶液: 浓度为 3 单位/μl, 溶于 0.1mol/L 磷酸钠, 50%乙醇, 1mmol/L DTT 混合液中。

DNase I 溶液: 浓度为 0.1μg/μl, 溶于 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 1mg/ml 牛血清白蛋白混合液中。

(2)取 dNTP 混合液(无 dUTP)5μl, 10×反应液 5μl, DNA 4.5μl(1μg), Bio-dUTP 7μl, 酶混合液 5μl, 重蒸水 23.5μl。混合后反应 60min, 加 5rd 终止反应液(0.25mol/L EDTA, pH7.5)终止反应。

(3)加入 2 倍体积的乙醇, 沉淀 DNA。

(4)用 70%乙醇洗涤 3 次, 以除尽掺入的 Bio-dUTP。

(5)真空干燥之后, 以重蒸水溶解 DNA, 待用。

6.对标记的 rDNA 进行检测

采用硝酸纤维素膜固相杂交的方法进行检测。

(1)将硝酸纤维素膜剪成合适大小的长条, 在 2×SSC(0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠, pH7.4, 等于 1×)中浸泡过夜。

(2)捞出硝酸纤维素膜, 空气干燥。

- (3)将标记后的探针进行适当稀释, 95℃水浴加热 2-5min, 使 DNA 变性。
- (4)将变性后的 DNA 探针马上冰浴 10min。
- (5)将探针点在晾干的硝酸纤维素膜上, 每个斑点点 4 μ l。
- (6)晾干后, 将点样的硝酸纤维素膜夹在滤纸中间, 80℃烘烤 2h。
- (7)用 0. 01mol/L PB, pH8. 2 洗涤 3 次, 每次 15min。
- (8)将与胶体金相连的链霉亲和素用 pH8. 2 的 PB 进行稀释, 并将膜放入该液中, 室温孵育 60min。
- (9)用 0. 01mol/L PB, pH8. 2 洗膜 3 次, 每次 15min。
- (10)显影。A 液(对苯二酚 0. 85g, 柠檬酸 2. 55g, 柠檬酸钠 2. 35g, 水 50ml)B 液(AgNO₃ 93mg, 水 50ml)按 1: 1 混匀为显影液。将膜浸泡在显影液中, 避光显影至出现深色斑点。用 25%海波定影 1-2min。

四.原位杂交和杂交子的检测

1.原位杂交

- (1)按电镜常规制片程序, 将用 K4M 树脂包埋的玉米根、松根等材料进行超薄切片, 将其捞在镍网上。
- (2)将载有切片的镍网放在 2 \times SSC 液面上于 70℃浸 30min, 以破坏 rRNA 的二级结构。另取一些切片载网, 先用 1mg/ml RNase 处理 2h, 用重蒸水彻底清洗。再转入 2 \times SSC 中, 于 70℃加热处理 30min 作对照。
- (3)在 Parafilm 膜上滴 25 μ l 预杂交液(50%去离子甲酰胺, 10%硫酸葡聚糖, 0. 05%变性鲑精 DNA, 2 \times SSC), 将切片漂浮在预杂交液上, 放入保湿盒内, 42℃预杂交 1—2h, 以防止非特异性杂交。
- (4)将标记的探针加热至 100℃, 变性 5min 后马上放入冰水中, 0℃冰浴 10min。
- (5)在预杂交液中加入变性的探针, 终浓度约为 0.5 μ g/ml, 此液即为杂交液。
- (6)将杂交液滴在 Parafilm 膜上, 将预杂交的切片漂浮在杂交液上。
- (7)杂交后用 50%去离子甲酰胺洗两次, 每次 5min。
- (8)载片镍网依次用 2 \times SSC, 1 \times SSC, 0. 1 \times SSC, 重蒸水各洗两次, 每次 5min, 空气干燥。
- (9)杂交后的切片用 3%BSA(0. 1mol/L PB 配制)封闭 5min。
- (10)将切片漂浮在金标链霉亲和素上(金颗粒直径为 10nm, 1: 20 稀释), 于室温

放置 1h。

(11)用 PB 洗 3 次，每次 5min，空气干燥。

2.电镜检测杂交结果

(1)用 1-2%醋酸双氧铀染色 5min。

(2)重蒸水漂洗 3 次，每次 5min。

(3)柠檬酸铅染色 1min。

(4)重蒸水漂洗同(2)，空气干燥后电镜观察。

该实验的结果是，在玉米、松的染色体上有金颗粒分布，对照为阴性。