

原位杂交简介

原位杂交是在分子生物学领域应用极为广泛的实验技术之一，是在研究生物体发育过程中的一种极为重要的分子遗传学的研究方法。其英文名为 *in situ hybridization*，其中 *in situ* 为拉丁文，原义是“in its natural position”。字面的意思理解就是说在其原来的天然的位置处杂交。原位杂交主要是基于以下这个主要原理：单链的 DNA 或者 RNA 只要他们的序列是互补的，即符合 AT, CG 的碱基配对原则，那么这样的两条核酸链之间（DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA）就可以形成一个稳定的杂交复合体。这一原理对于检测一个特异的 mRNA 在某一种生物体，或者某些组织切片、单个细胞里具体表达位置非常有用。该技术最早应用于 60 年代末期，由于核酸分子杂交的特异性高，并可精确定位，因此该技术已被广泛应用，例如与细胞内 RNA 进行杂交以观察该组织细胞中特定基因表达水平。原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受同一组织中其他成分的影响，因此对于那些细胞数量少且散在于其他组织中的细胞内 DNA 或 RNA 研究更为方便；同时由于原位杂交不需要从组织中提取核酸，对于组织中含量极低的靶序列有极高的敏感性，并可完整地保持组织与细胞的形态，更能准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态。

核酸原位杂交可根据其检测物而分为细胞内原位杂交和组织切片内原位杂交；根据其所用探针及所要检测核酸的不同又可分为 DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-RNA 杂交。但不论哪种杂交都必须经过组织细胞的固定，预杂交，杂交，冲等一系列洗步骤及放射自显影或免疫酶法显色以显示杂交结果。

我们在这儿介绍的是整胚原位杂交，不同于一般的在载片上对细胞和组织切片进行探针杂交及检测的原位杂交，而是对完整的斑马鱼胚胎进行探针杂交及检测，从整体上把握探针的结合部位，然后对胚胎进行切片，以确定探针结合的具体位置。整胚原位杂交在斑马鱼分子生物学研究中是一种非常重要的实验方法，原位杂交的探针可以是同位素的探针，用放射自显影来检测；也可以是非同位素的探针，通过荧光或酶法予以检测。我们这儿所介绍的一种原位杂交的方法是通过后者，以地高辛标记探针，然后用酶联抗体的方法进行检测。

原位杂交 (In situ hybridization)

固定

收集斑马鱼的胚胎，在 Holfretor 水中培养，到达所需要的发育时期时，用蛋白酶去除卵膜，用 4%多聚甲醛固定，在 4℃保存，二十四小时后用 50%甲醇 2%多聚甲醛溶液洗，然后换成甲醇，在-20C 保存，待用(两天和两天以上的胚胎需要用双氧水处理，去除色素。或者使用苯硫脲稀溶液培养，可阻断色素的形成)

一. 原位杂交第一天

1. 重新水化和固定

- 1) 吸取固定好的胚胎，加入 50%甲醇的 PBST 溶液，放置 5 分钟。
- 2) 置换成 30%甲醇的 PBST 溶液，放置 5 分钟
- 3) 置换成 PBST 溶液，放置 5 分钟，重复一次
- 4) 置换成 4%多聚甲醛的 PBS 溶液固定 20 分钟
- 5) 用 PBST 洗两次，每次放置五分钟，室温。

蛋白酶处理与后固定（本实验不做此步）

- 1) 用 10ul/ml 的蛋白酶 K 在室温下处理胚胎。5 体节以下的胚胎不处理，5 体节到 24 小时的胚胎处理 3 分钟，24 小时以上的胚胎处理 5 分钟或者更长。发育时间越短的胚胎越嫩，可以不用或者少用蛋白酶处理，发育时间长的胚胎就需要用蛋白酶来疏松组织，以便于杂交。
- 2) 用 PBST 溶液轻洗，在 PBST 中放置 5 分钟。
- 3) 用 4%多聚甲醛的 PBS 溶液固定 20 分钟，室温。
- 4) 用 PBST 洗两次，每次放置五分钟，室温。

2. 预杂交

- 1) 每个管中置换成大约 300ulHYB-溶液，60℃水浴 5 分钟，避免振荡。
- 2) 用等体积的 HYB+取代 HYB-。
- 3) 60℃水浴，预杂交 4 小时以上。

3. 杂交

1) 吸去预杂交的 HYB+, 加上 100ul 已加入探针的 HYB+ 溶液 (探针浓度约为 1ng/ul) ..

2) 60°C 温浴过夜。

注: 杂交与预杂交的温度可以是 55 到 60 度不等, 温度越低, 探针结合越好, 温度越高, 背景越小。

二. 原位杂交第二天

1.

1) 将探针回收, 放于 -20C 保存(通常探针可重复使用十次左右)。

2) 加入 50% 甲酰胺/2XSSCT 溶液 1 毫升, 60°C, 放置 30 分钟, 重复一次。

3) 置换 2XSSCT 1ml, 60°C, 放置 15 分钟。

4) 置换 0.2XSSCT 1ml, 60°C, 放置 30 分钟, 重复一次。

2.

1) 用 MABT 洗两次, 每次五分钟, 放在摇床轻轻摇动。

2) 室温下加 1ml 1: 2: 7 溶液, 时间为一小时。

3) 按 1: 3000 的比例在 1: 2: 7 溶液中加入酶连地高辛抗体, 4C 冰箱过夜。

三. 原位杂交第三天

1) 用 1ml 含 10% 热灭活血清的 MABT 溶液置换抗体溶液, 放置摇床上 25 分钟, 然后用 1ml MABT 置换, 25 分钟, 再用 1ml MABT 溶液置换, 一小时以上, 最后用 1ml MABT 溶液置换, 25 分钟。

2) 用 1ml 1mM 左旋米唑的 Staining buffer 洗三次, 每次放置五分钟。

3) 将胚胎转入十六孔板中, 吸去 staining buffer, 加上 300ul BM Purple AP Substrate(底物, 用之前加 5mM 左旋米唑), 十六孔板外面包上锡箔纸以避光, 避免摇动, 室温下显色。

4) 每隔一小时观察胚胎是否开始显色

5) 将显色完全的胚胎中的底物吸出, 用 PBST 洗两三次后加上 4% 多聚甲醛固定, 拍照。

6) 4C 冰箱保存。

原位杂交中溶液的配制:

PBS:

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

DEPC H₂O 1L

HCl 调 PH 值至 7.4

抽滤, 灭菌

4% 多聚甲醛:

多聚甲醛 40g

PBS 1L

加热持续搅拌至溶液澄清。-20℃ 保存

PBST:

PBS 溶液加上 Tween-20 使其终浓度为 0.1%。

20XSSC:

Na₃Citrate 2H₂O 88.2g

NaCl 175.5g

DEPC H₂O 至 1L

抽滤, 灭菌

SSCT:

SSC 加上 Tween-20 使其终浓度为 0.1%。

HYB-:

甲酰胺: 20XSSC 储液: DEPC 水=2: 1: 1 配制

加入 Tween-20 使其终浓度为 0.1%, -20c 保存。

HYB+:

HYB- 20ml

yeast RNA 10mg

heparin 1mg。

-20℃ 保存。

MAB:

maleic acid 11.6g

NaCl 8.8g

用固体 NaOH (约 7g) 调至 Ph=7.5

4℃ 保存

MABT

MAB 加上 Tween-20 使其终浓度为 0.1%.

10% blocking reagent:

blocking reagent 8g

MAB 72ml

1: 2: 7 溶液:

灭活羊血清: 10% BM blocking reagent: MABT=1: 2: 7

用时现配

Staining buffer:

Tris 12.1g

pH9.5

Mgcl 6H₂O 10.2g,

Nacl 5.85g

Tween-20 1ml,

用之前加 1M 的左旋咪唑储液，使之终浓度为 1mM