

原位杂交实验步骤

一、质粒制备

1 质粒的转化和扩增

1.1 制备 XL1-Blue 感受态细菌

1. 取 400 μ L XL1-Blue 菌种加入到含 200ml LB 培养基的锥形瓶中, 37 °C、100 rpm 培养 4h, 离心, 倒置, 以冰冷的 0.1 mol / L CaCl₂ 重悬细菌, 冰浴 30 min, 离心, 弃上清, 倒置, 再加 4ml(含 15%甘油)冰冷的 CaCl₂ 重悬细菌, 分装(200 μ / tube), -80 °C 保存。
2. 转化: 在冰浴中将 1 管 XL1-Blue 感受态菌解冻, 将浓度为 2ng / μ l 的质粒 DNA 4 μ l 加入到 80 μ l 感受态菌中。
3. 轻轻摇匀, 冰浴 30 min。
4. 42 °C 热激 90 秒, 然后迅速冰浴 2 min。
5. 加入 LB 培养液(无氨苄青霉素)0.8ml, 在 37 °C, 100 转 / min 水浴孵育 60 min。
6. 取 200 μ l 菌液铺于琼脂板上(涂有 X-Gal(20mg / ml)-IPTG(200mg / ml)的 LB-氨苄青霉素 50 mg / ml, 1 μ l / ml 培养基), 待菌液全部被吸收后, 倒置平板于 37 °C 培养 12-16h。

1.2 鉴定和挑选含重组质粒的菌落

1. 用无菌牙签挑取单菌落, 接种到 10 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液的离心管中, 于 37 °C, 200 转 / 分培养 2h, 取 1 ml 之一 Eppendorf 离心管, 加 50 μ l 10mmol / L EDTA(pH 8.0)。
2. 加入 50 μ l 新配置的 0.2mol / L NaOH、0.5% SDS、20% 蔗糖溶液后, 振荡 30 秒。
3. 在 70 °C 温育 5 min, 然后冷却到室温。
4. 加 1.5 μ l 14mol / L KCl 和 0.5 μ l 含 0.4% 溴酚兰染液, 振荡 30 秒后, 冰浴 5 min。
5. 12000g, 4 °C 离心 3 min, 以除去细菌碎片。
6. 制备 1% 的琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μ g / ml), 取 50 μ l 上清液加入到样品孔中, 其中一孔加入中等分子量 DNA Marker。恒压 50V, 进行电泳。

7. 当溴酚兰迁移到凝胶全长的 $2/3$ - $3/4$ 时, 停止电泳, 在紫外灯下检查质粒 DNA 分子量的大小是否与转入质粒相符。

1.3 质粒的扩增和纯化

1. 用无菌牙签分别挑取单个白色菌落移入含 30ml LB-氨苄青霉素($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养液的聚丙烯管中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 转 / 分培养 3h。

2. 将菌液转入含 70 ml LB-氨苄青霉素培养液的 250ml 锥形瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 转 / 分培养过夜(12-16h), 细菌浑浊。

3. 菌液中加入氯霉素液(34mg 溶于 1ml 乙醇, 100ml 菌液加入 0.5ml 氯霉素溶液, 终浓度为 $170\mu\text{g}/\text{ml}$)。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 转 / 分培养 12-16h。

4. 将培养的细菌倒入 50ml 的离心管中, 6000rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 沉淀细菌。

5. 弃净上清液, 用 2ml 预冷的溶液 I, 悬浮菌体沉淀, 剧烈振荡, 于室温静置 5 min

6. 加入新配制的溶液 II 4ml, 快速用手晃动 10 秒, 颠倒数次后, 于室温静置 10 min。

7. 加入预冷的溶液 III 3ml, 温和振荡 10 秒, 于冰上静置 10 min, 出现白色絮状沉淀。

8. 6000rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 保留上清。

9. 将上清(若带细菌残片, 则再次离心)移入另一 50ml 的离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇混匀, 于室温静置 10 min。(或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4h, 或 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 可便核酸沉淀)

10. 12000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 回收核酸。小心弃去上清, 倒置离心管使残液兼上清液流尽。

11. 于室温用 70% 的乙醇洗涤沉淀物和管壁, 室温 12000 rpm 离心, 15 min, 充分弃去乙醇, 于室温将离心管倒置在纸巾上, 使最后残余的痕量乙醇挥发殆尽。

12. 用 500 μl TE(pH8.0)溶解核酸沉淀, 转移至 1.5 ml Eppendorf 管中。

13. 加入用冰预冷的 5mol / L 的 LiCl 溶液 600 μl , 充分混匀。12000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 以沉淀高分子量的 RNA。

14. 将上清转移到另一 1.5 ml Eppendorf 管中, 加等量异丙醇, 充分混匀, 于室温静置 10min。

15. 12000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 回收核酸。小心弃去上清, 倒置离心管使残

余上清液流尽。

16. 于室温用 70% 的乙醇洗涤沉淀物和管壁，室温 12000 rpm 离心，15 min，充分弃去乙醇，于室温将离心管倒置在纸巾上，使最后残余的痕量乙醇挥发殆尽。

17. 400 μ l 含无 DNA 酶的 RNA 酶(20 μ g/ml)的 TE 缓冲液(pH8.0)溶解沉淀，将溶液转移到另一 1.5 ml Eppendorf 管中，室温放置 1.5ml Eppendorf 管中 30min。

18. 加入 400 μ l 13%(v / v)的 PEG 8000-NaCl(1.6 mol / L)，混匀，4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 5 min 以回收质粒 DNA，弃去上清。

19. 加入 400 μ l TE 缓冲液(pH 8.0)溶解沉淀，再分别用等体积的 Tris 饱和酚、酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)、和氯仿各抽提一次。

20. 将水相(上清)移入另一 1.5ml Eppendorf 管中，加入 0.1 体积(约 50 μ l) 13M 的醋酸钠(pH 5.2)和 2 倍体积(大约 1 ml)的无水乙醇，充分混匀后于 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min。

21. 于 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 5 min 回收沉淀的质粒 DNA。尽可能弃去上清，敞开管口，置工作台上使残留的痕量乙醇蒸发殆尽。

22. 加入 400 μ l 处于 4 $^{\circ}$ C 的 70% 乙醇，稍加振荡，漂洗沉淀，4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 2 min。

23. 吸去上清，室温敞开管口，直到乙醇完全挥发。

24. 用 100 μ l TE 缓冲液(pH 8.0)溶解沉淀。

25. 取 4 μ l 溶液 1：100 稀释后，测定其 OD₂₆₀、OD₂₈₀，以确定质粒 DNA 的纯度和浓度(OD₂₆₀ / OD₂₈₀ > 1.8。OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 对 DNA 而言其值大约为 1.8，高于 2.0 则可能有 RNA 污染，低于 1.8 则有蛋白质污染。；DNA 浓度 = OD₂₆₀ X 0.05 X 稀释倍数(μ g / μ l)。

26. 质粒 DNA 溶液于 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

二、cRNA 探针的标记

1. 将质粒 DNA，用相应的限制性内切酶线性化，通过琼脂糖凝胶电泳以确保完全线性化。

2. 线性化后的 DNA 按“质粒的纯化”步骤 19-24 进行纯化，作为 cRNA 探针标记的模板，用相应的 RNA 聚合酶合成地高辛标记的反义和正义 RNA 探

针。

3. 进行体外转录，步骤如下：

4. 在冰上将各试剂加入一 1.5 ml 无 RNA 酶的 Eppendorf 管中。

DEPC 处理的三蒸水 8 μ l

质粒 DNA 模板 0.05 μ g / μ l 1 μ l

10 x NTP 地高辛标记混合物 1 x 2 μ l

0.1 M DTT 溶液 10 mM 2 μ l

5 x 转录缓冲液 1 x 4 μ l

RNAse 抑制剂 2U / μ l 1 μ l

RNA 聚合酶 2U/ μ l 2 μ l

反应体系总体积 20 μ l

5. 加入上述各试剂后，混匀，简短离心后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

6. 加入 2 μ l 无 RNA 酶的 DNA 酶 I(10U / μ l), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 降解模板 DNA。

7. 加入 0.2M EDTA(pH 8.0)溶液 2 μ l 终止反应。

8. 加入 2.5 μ l 的 4 M LiCl 和 7.5 μ l 冷的无水乙醇，混匀，-20 $^{\circ}$ C 放置 2h。

9. 12000g 下离以 15 min，弃上清，小心地用 50 μ l 冷的 70%乙醇洗涤沉淀。

10. 室温下稍干燥，溶于 100 μ l DEPC 处理过的三蒸水中，混匀分装，-20 $^{\circ}$ C 下保持备用。

三、原位杂交

3.1 冰冻切片与杂交前预处理

1. 将子宫样品从-80 $^{\circ}$ C 取出，用 OCT 包埋，在-23 $^{\circ}$ C(切片机腔体温度)平衡至少 30 min。将包埋好的样品固定在样品头上，切 10 μ m 厚的连续组织切片，平铺于涂有多聚赖氨酸(1mg / ml)的玻片上(玻片预先经 180 $^{\circ}$ C 干烤 6 小时)，保存于-70 $^{\circ}$ C 冰柜备用。

2. 冰冻切片经室温干燥 10 min 后，在 4%的多聚甲醛-PBS(pH 7.4)固定 10 min。

3. 活跃的 DEPC-PBS(未高压的 0.1%DEPC-1XPBS 溶液)洗 2 次，每次 5 min。

4. 在 0.2M 的盐酸作用中作用 10 min 后，重复步骤 4)。

5. 在切片上滴加蛋白酶 K(0.1 μ g / ml), 37 °C 孵育 15 min, 重复步骤 4)。
6. 经 0.1M TEA(三乙醇胺)作用 5min 后, 再在新配制的 0.25%AA / 0.1M TEA (乙酸酐 / 三乙醇胺, pH 8.0)中乙酰化 10 min。

(在大多数实验中, 步骤 4, 5, 6 省略)

7. 5 x SSC 中平衡 15 min。

3.2 杂交

8. 在脱水后的玻片上滴加预杂交液(约 100 μ l / 玻片), 置于放有湿盒液(50% 甲酰胺 v / v; 0.3 M NaCl; 1Mm EDTA; 10 mM Tris-Cl, pH 8.0)的湿盒中, 55~58 °C 下的烘箱中预杂交 2 h。
9. 甩掉预杂交液, 地高辛标记的反义或正义 cRNA 探针(浓度 1-2ng / μ l)经 70 °C 变性 10 分钟, 置冰上 1 min, 玻片上滴加预杂交液(约 60 μ l / 玻片), 覆盖 parafilm 膜, 放湿盒中在 48~58 °C 下杂交 18-30 h。

3.3 杂交后处理

10. 取出玻片, 小心去掉 Parafilm 膜, 甩掉杂交液, 用 52 °C 预热的 5 \times SSC 洗 30 min。
11. 在无 DNA 的 RNA 酶 A(20 μ g / ml)溶液中 37 °C 下孵育 30 min。
12. 分别依次用 52 °C 预热的 2 X SSC, 1 X SSC 和 0.1 X SSC 洗 2 次, 每次 30 min。

3.4 杂交信号检测

13. 在缓冲液 A(0.1M Tris-HC 1 pH 7.5, 0.15M NaCl)中平衡 5min。
14. 在玻片上滴加碱性磷酸酶的抗地高辛抗体(1: 500~1:2000 稀释于含 0.5% 阻断液的缓冲液 A 中), 室温反应 2h。
15. 用缓冲液 A 洗 2 次, 每次 15 min。
16. 在缓冲液 B(0.1M Tris-HCl; 0.1M NaCl; 0.05M MgCl₂, pH 9.5)中平衡 5 min。
17. 硝基四氮唑蓝(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吡啶氧磷酸盐(BCIP)溶于缓冲液 B 中, 每 ml 缓冲液 B 含有 4.5 μ l NBT 和 3.5 μ l BCIP。在玻片上滴加混合染液在湿盒中显色过夜。
18. 充分显色后, 用 EDTA(1 mM EDTA, pH 8.0)洗 15 min 终止反应。
19. 在 95%乙醇中洗 1 h 以除去非特异的背景。

20. 用蒸馏水洗 15 min 除去可能存在的结晶体。
21. 脱水、透明，用中性树胶封片。
22. 充分干燥后在显微镜下观察、照相。