

## 原位杂交实验原理与方法

### 一、目的

本实验的目的是学会原位杂交的使用方法。了解各种原位杂交的基本原理和优缺点。

### 二、原理

原位杂交组化（简称原位杂交，in situ hybridization histochemistry; ISHH）属于分子杂交的一种，是一种应用标记探针与组织细胞中的待测核酸杂交，再应用标记物相关的检测系统，在核酸原有的位置将其显示出来的一种检测技术。原位杂交的本质就是在一定的温度和离子浓度下，使具有特异序列的单链探针通过碱基互补规则与组织细胞内待测的核酸复性结合而使得组织细胞中的特异性核酸得到定位，并通过探针上所标记的检测系统将其在核酸的原有位置上显示出来。

当然杂交分子的形成并不要求两条单链的碱基顺序完全互补，所以不同来源的核酸单链只要彼此之间有一定程度的互补顺序（即某种程度的同源性）就可以形成杂交双链。

探针的种类按所带标记物可分为同位素标记探针和非同位素标记探针两大类。目前，大多数放射性标记法是通过酶促反应将标记的基因掺入 DNA 中，常用的同位素标记物有  $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$  和  $^{32}\text{P}$ 。同位素标记物虽然有灵敏性高，背底较为清晰等优点，但是由于放射性同位素对人和环境均会造成伤害，近来有被非同位素取代的趋势。非同位素标记物中目前最常用的有生物素、地高辛和荧光素三种。探针的种类按核酸性质不同又可分为 DNA 探针、cDNA 探针、cRNA 探针和合成寡核苷酸探针。cDNA 探针又可分为双链 cDNA 探针和单链 cDNA 探针。

原位杂交又可分为菌落原位杂交和组织原位杂交。

**菌落原位杂交（Colony in situ hybridization）** 菌落原位杂交是将细菌从培养平板转移到硝酸纤维素滤膜上，然后将滤膜上的菌落裂菌以释出 DNA。将 DNA 烘干固定于膜上与  $^{32}\text{P}$  标记的探针杂交，放射自显影检测菌落杂交信号，并与平板上的菌落对位。

**组织原位杂交（Tissue in situ hybridization）** 组织原位杂交简称原位杂交，指组织或细胞的原位杂交，它与菌落的原位杂交不同。菌落原位杂交需裂解细菌释出 DNA，然后进行杂交。而原位杂交是经适当处理后，使细胞通透性增加，让

探针进入细胞内与 DNA 或 RNA 杂交。

### （一）探针的选择

根据不同的杂交实验要求，应选择不同的核酸探针。在大多数情况下，可以选择克隆的 DNA 或 cDNA 双链探针。但是在有些情况下，必须选用其它类型的探针如寡核苷酸探针和 RNA 探针。例如，在检测靶序列上的单个碱基改变时应选用寡核苷酸探针，在检测单链靶序列时应选用与其互补的 DNA 单链探针（通过克隆人 M13 噬菌体 DNA 获得）或 RNA 探针，寡核苷酸探针也可。长的双链 DNA 探针特异性较强，适宜检测复杂的靶核苷酸序列和病原体，但不适宜于组织原位杂交，因为它不易透过细胞膜进入胞内或核内。在这种情况下，寡核苷酸探针和短的 PCR 标记探针（80~150bp）具有较大的优越性。

在选用探针时经常会受到可利用探针种类的限制。如在建立 DNA 文库时，手头没有筛选特定基因的克隆探针，这时就可用寡核苷酸探针来代替。但必须首先纯化该基因的编码蛋白，并测定 6 个以上的末端氨基酸序列，通过反推的核苷酸序列合成一套寡核苷酸探针。如果已有其它动物的同种基因克隆，因为人类和动物间在同一基因的核苷酸顺序上存在较高的同源性，因此可利用已鉴定的动物基因作探针来筛选人类基因克隆。对于基因核苷酸序列背景清楚而无法获得克隆探针时，可采用 PCR 方法扩增某段基因序列，并克隆入合适的质粒载体中，即可得到自己的探针。这种方法十分简便，无论基因组 DNA 探针还是 cDNA 探针都可以容易地获得，而且，可以建立 PCR 的基因检测方法，与探针杂交方法可作对比，可谓一举两得。

### （二）探针的标记方法

在选择探针类型的同时，还需要选择标记方法。探针的标记方法很多，选择什么标记方法主要视个人的习惯和可利用条件而定。但在选择标记方法时，还应考虑实验的要求，如灵敏度和显示方法等。一般认为放射性探针比非放射性探针的灵敏度高。放射性探针的实际灵敏度不依赖于所采用的标记方法，如随机引物延伸法往往得到比缺口平移法更高的比活性。在检测单拷贝基因序列时，应选用标记效率高、显示灵敏的探针标记方法。在对灵敏要求不高时，可采用保存时间长的生物素探针技术和比较稳定的碱性磷酸酶显示系统。

### （三）探针的浓度

总的来说,随探针浓度增加,杂交率也增加。另外,在较窄的范围内,随探针浓度增加,敏感性增加。依我们的经验,要获得较满意的敏感性,膜杂交中  $^{32}\text{P}$  标记探针与非放射性标记探针的用量分别为  $5\sim 10\text{ ng/ml}$  和  $25\sim 1000\text{ ng/ml}$ ,而原位杂交中,无论应用何种标记探针,其用量均为  $0.5\sim 5.0\mu\text{g/ml}$ 。探针的任何内在物理特性均不影响其使用浓度,但受不同类型标记物的固相支持物的非特异结合特性的影响。

#### (四) 杂交率

在探针过量的条件下,杂交率主要依赖于探针长度(复杂度)和探针浓度。

#### (五) 杂交最适温度

杂交技术最重要的因素之一是选择最适的杂交反应温度。若反应温度低于  $T_m$   $10\sim 15^\circ\text{C}$ ,碱基顺序高度同源的互补链可形成稳定的双链,错配对减少。若反应温度再低( $T_m-30^\circ\text{C}$ ),虽然互补链之间也可形成稳定的双链,但互补碱基配对减少,错配对增多、氢键结合的更弱。如两个同源性在 50%左右或更低些的 DNA,调整杂交温度可使它们之间的杂交率变化 10 倍,因此在实验前必须首先确定杂交温度。通常有三种温度可供试验,即最适复性温度、苛刻复性温度及非苛刻复性温度。温度的选择及温度对杂交的影响见表 18-3。最适复性温度(Optimum renaturation temperature, TOR):  $T_{or} = T_m - 25^\circ\text{C}$

苛刻复性温度:  $T_s = T_m - (10\text{ 或 } 15^\circ\text{C})$

非苛刻复性温度:  $T_{ns} = T_m - (30\text{ 或 } 35^\circ\text{C})$

#### (六) 杂交的严格性

影响杂交体稳定性的因素决定着杂交条件的严格性。一般认为在低于杂交体?

#### (七) 杂交反应时间

在条件都得到满足的情况下,杂交的成败就取决于保温时间。时间短了,杂交反应不完成;时间长了也无益,会引起非特异结合增多。一般杂交反应要进行 20h 左右。1966 年 Britten 和 Kohne 推荐用  $Cot =$  值来计算杂交反应时间。 $Cot$  值实际上是杂交液中单链起始浓度( $C_0$ )和反应时间( $t$ )的乘积。实验表明  $Cot = 100$  时,杂交反应基本完成。 $Cot = 0$ ,基本上没有杂交。例如在液相杂交中未标记的 DNA  $400\mu\text{g/ml}$ (按单股 DNA 每微克紫外吸收值为 0.024 计算,总的吸收值为 9.6),如果反应时间为 21h,那么对于未标记的 DNA 来说,  $Cot = 9.6/21 = 100.8$ ,

杂交完成了。对标记 DNA (浓度为  $0.1\mu\text{g/ml}$ ) 来说  $Cot$  值为 0.05, 这就充分排除了标记 DNA 的自我复性。  $T_m$  值  $25^\circ\text{C}$  时杂交最佳, 所以首先要根据公式 (4) 计算杂交体  $T_m$  值。由此式可见, 通过调节 盐浓度、甲酰胺浓度和杂交温度来控制所需的严格性。 (八) 杂交促进剂

惰性多聚体可用来促进 250 个碱基以上的探针的杂交率。对单链探针可增加 3 倍, 而对双链探针、随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。而短探针不需用促进剂, 因其复杂度低和分子量小, 短探针本身的杂交率就高。

硫酸葡聚糖是一种广泛用于较长双链探针杂交的促进剂。这是一种多聚胺, 平均分子量为 500 000。另一种常见的促进剂是聚乙二醇 (PEG), PEG 分子量小 (6000~8000)、粘度低、价格低廉, 但它不能完成取代硫酸葡聚糖。在某些条件下 5%~10%硫酸葡聚糖效果较好, 若用 5%~10%PEG 则可产生很高的本底。因此, 使用促进剂时有必要优化条件。另一种多聚体促进剂是聚丙烯酸, 用其钠盐, 浓度为 2%~4%。与硫酸葡聚糖相比, 其优点是价格低廉, 粘度低 ( $MW=90\ 000$ )。

小分子化学试剂酚和硫氰酸胍也能促进杂交, 它们可能是通过增加水的疏水性和降低双链和单链 DNA 间的能量差异而发挥作用。酚作为杂交促进剂, 只能在低 DNA 浓度的液相杂交中观察到, 该方法曾被称为酚乳化复性技术, 该法不能用于固相杂交, 因酚可引起核酸与膜的非特异吸附作用, 即使在液相杂交中的应用也是有限的。而硫氰酸胍可通过降低双链 DNA 的  $T_m$  值而起作用。此外, 该分子还可以促进 RNA 的杂交, 有裂解细胞而抑制 RNase 的作用。总之, 硫酸葡聚糖和聚乙二醇因能用于固相杂交是目前最常用的杂交促进剂。

#### (七) 杂交反应时间

在条件都得到满足的情况下, 杂交的成败就取决于保温时间。时间短了, 杂交反应不完成; 时间长了也无益, 会引起非特异结合增多。一般杂交反应要进行 20h 左右。1966 年 Britten 和 Kohne 推荐用  $Cot =$  值来计算杂交反应时间。  $Cot$  值实际上是杂交液中单链起始浓度 ( $C_0$ ) 和 反应时间 ( $t$ ) 的乘积。实验表明  $Cot = 100$  时, 杂交反应基本完成。  $Cot=0$ , 基本上没有杂交。例如在液相杂交中未标记的 DNA  $400\mu\text{g/ml}$  (按单股 DNA 每微克 紫外吸收值为 0.024 计算, 总的吸收值为 9.6), 如果反应时间为 21h, 那么对于未标记的 DNA 来说,  $Cot = 9.6/21 = 100.8$ , 杂

交完成了。对标记 DNA (浓度为 0.1 $\mu$ g/ml) 来说  $C_{ot}$  值为 0.05, 这就充分排除了标记 DNA 的自我复性。  $T_m$  值 25 $^{\circ}$ C 时杂交最佳, 所以首先要根据公式 (4) 计算杂交体

$T_m$  值。由此式可见, 通过调节 盐浓度、甲酰胺浓度和杂交温度来控制所需的严格性。

#### (八) 杂交促进剂

惰性多聚体可用来促进 250 个碱基以上的探针的杂交率。对单链探针可增加 3 倍, 而对双链探针、随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。而短探针不用促进剂, 因其复杂度低和分子量小, 短探针本身的杂交率就高。硫酸葡聚糖是一种广泛用于较长双链探针杂交的促进剂。这是一种多聚胺, 平均分子量为 500 000。另一种常见的促进剂是聚乙二醇 (PEG), PEG 分子量小 (6000~8000)、粘度低、价格低廉, 但它不能完成取代硫酸葡聚糖。在某些条件下 5%~10%硫酸葡聚糖效果较好, 若用 5%~10%PEG 则可产生很高的本底。因此, 使用促进剂时有必要优化条件。另一种多聚体促进剂是聚丙烯酸, 用其钠盐, 浓度为 2%~4%。与硫酸葡聚糖相比, 其优点是价格低廉, 粘度低 (MW=90 000)。小分子化学试剂酚和硫氰酸胍也能促进杂交, 它们可能是通过增加水的疏水性和降低双链和单链 DNA 间的能量差异而发挥作用。酚作为杂交促进剂, 只能在低 DNA 浓度的液相杂交中观察到, 该方法曾被称为酚乳化复性技术, 该法不能用于固相杂交, 因酚可引起核酸与膜的非特异吸附作用, 即使在液相杂交中的应用也是有限的。而硫氰酸胍可通过降低双链 DNA 的  $T_m$  值而起作用。此外, 该分子还可以促进 RNA 的杂交, 有裂解细胞而抑制 RNase 的作用。总之, 硫酸葡聚糖和聚乙二醇因能用于固相杂交是目前最常用的杂交促进剂。

### 三、主要器材

医用微波炉, 恒温水浴箱、湿盒、PNP 笔等。

### 四、试剂

#### (二) 试剂:

● 2.5ml/L 的醋酸--2.5ml/L 醋酸酐:

三乙醇胺 13.2ml

氯化钠 5g

浓盐酸 4ml

醋酸酐（用前加） 2.5ml;

● 20×SSC (pH7.0):

氯化钠 175.3g

枸橼酸钠 88.2g

双蒸水定容至 1L;

● 100×Denhardt's:

Ficoll 1g

PVP 1g

BSA 1g

ddH<sub>2</sub>O 定容至 50ml;

● 杂交液: (50ml) 用量 终浓度

100%去离子甲酰胺 25ml 50%

100%葡聚糖硫酸脂 5mg 10%

100×Denhardt's 0.5ml 1

1Mtris-HCL (PH8.0) 0.5ml 10Mm

5M NaCl 3ml 0.3M

0.5M EDTA (PH8.0) 0.1ml 1mM

10mg/ml 变性鱼精 DNA 0.5ml 100ug/ml

ddH<sub>2</sub>O 定容至 25ml

● 0.1M 甘氨酸/PBS:

甘氨酸 7.5g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30.8g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.8g

NaCl 8.5g

溶于 800ml ddH<sub>2</sub>O, 定容至 1000ml, 高压, 室温储存;

● TSM1 (1000ml):

1MTris-HCL (PH8.0) 100ml

5M NaCl 20ml

1M MgCl<sub>2</sub> 10ml

ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml;

●TSM2 (1000ml):

1MTris-HCL (PH8.0) 100ml

5M NaCl 20ml

1M MgCl<sub>2</sub> 50ml

ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml;

● 抗体稀释液: 100ml

BSA 1.0g

Tris X-100 0.4ml

叠氮钠 0.4g

0.05M PBS (PH7.2) 调至 100ml;

● 0.05M PBS (PH7.2): 1000ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.4g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4g

NaCl 4.25g

●去内源性酶液 (40ml):

储存液 用量 终浓度

10%甲醛 4.0ml 0.3—0.5%

冰醋酸 10.0ml 25.0%

加 0.05MPBS 至 40ml

● 0.4% Triton-X 100

## 五、操作

(一) 脱蜡, 水化:

1、二甲苯 10min 两次

2、无水乙醇 3min 两次

3、95%乙醇 3min 一次

4、75%乙醇 3min 一次

5、50%乙醇 2min 一次

6、重蒸水 2min 一次

## 7、PBS 洗涤 5min

(二) 将组织芯片放入去内源性酶液中浸泡 30min; PBS 洗涤 5min

(三) 0.1M 甘氨酸去游离醛基 15min; 0.4%tritonX-100 洗 10min;

(四) 用蛋白酶 K 与 37℃ 孵育 30min , PBS 振洗 5min

(五) 在 0.1mol/L 三乙醇胺——0.25%乙酸酐中孵育 10min ;在 2×SSC 中洗 5min ;

(六) 滴加预杂交液 42℃,30min; 将 RNA 探针用预杂交液稀释 (1ng/ u L~2ng/ u L)

## (七) 杂交

1、在载玻片表面覆盖上杂交小室,加 20~50 u L 的杂交液到组织芯片 TMA 上, 42℃~44℃湿盒中过夜。

2、在 4×SSC 中 37℃ 洗涤 15min

3、2×SSC, 加入 RNA 酶 (大致为 10 u g/ml) 37℃ 中洗涤 30min,

4、0.5×SSC,37℃ 洗涤 15min

## (八) 封闭

1、1%正常山羊血清孵育 30min

2、用抗体稀释液稀释碱磷酶标记的抗地高辛抗体 (1: 500) 37℃ 中孵育 3h, PBS 洗三次, 每次 5min

3、TSM1 洗;

4、TSM2 洗;

(九) 显色: 用 TSM2 将 NBT/BCIP 按 2: 1 稀释进行显色; 显微镜下掌握染色程度

(十) 终止显色: 用水终止

(十一) 脱水, 透明, 封固

1、85%乙醇脱水, 2min

2、95%乙醇脱水 5min

3、无水乙醇脱水 15min

4、二甲苯 20min

5、封片, 镜检