

原位杂交组织化学实验技术

第一节 原位杂交组织化学概述

一、核酸分子杂交技术

1961年 Hall 开拓了液相核酸杂交技术的研究，其基本原理是利用核酸分子单链之间有互补的碱基顺序，通过碱基对之间非共价键的形成，出现稳定的双链区，形成杂交的双链。自此以后，由于分子生物学技术的迅猛发展，特别是 70 年代末到 80 年代初，分子克隆、质粒和噬菌体 DNA 的构建成功，核酸自动合成仪的诞生，大大丰富了核酸探针的来源，新的核酸分子杂交类型和方法不断涌现。按其作用方式可大致分为固相杂交和液相杂交两种：液相杂交是指参加反应的两条核酸链都游离在溶液中，而固相杂交是将参加反应的一条核酸链固定在固体的支持物上(常用的有硝酸纤维素滤膜，其它如尼龙膜、乳胶颗粒和微孔板等)，另一条参加反应的核酸链游离在溶液中。固相杂交有菌落原位杂交(colony in situ hybridization)、斑点杂交法(Dot blot)、Southern 印迹杂交(Southern blot)、Northern 印迹杂交(Northern blot)和组织原位杂交(Tissue in situ hybridization)，即原位杂交组织化学技术和原位杂交免疫细胞化学技术。液相分子杂交技术包括吸附杂交、发光液相杂交、液相夹心杂交和复性速率液相分子杂交等(详见第十八章)。

二、原位杂交组织化学技术的由来及发展

原位杂交组织(或细胞)化学技术简称原位杂交(In situ hybridization)，如上所述，属于固相核酸分子杂交的范畴。但它区别于固相核酸分子杂交中的任何一种核酸分子杂交技术。菌落杂交系细菌裂解释放出 DNA，然后进行杂交。Southern 印迹杂交法是以鉴定 DNA 中某一特定的基因片段，而 Northern 印迹杂交法是用以检测某一特定的 RNA 片段的。它们都只能证明该病原体、细胞或组织中是否存在待测的核酸而不能证明该核酸分子在细胞或组织中存在的部位。1969年美国耶鲁大学 Gall 和 Pardue 首先用爪蟾核糖体基因探针与其卵母细胞杂交，确定该基因定位于卵母细胞的核仁中。与此同时，Buongiorno - Nardelli 和 Amaldi, John 及其同事等相继利用同位素标记核酸探针进行了细胞或组织的基因定位，从而创造了原位杂交细胞或组织化学技术。Orth (1970) 应用 3H 标记的兔乳头状瘤病毒 cRNA 探针与兔乳头状瘤组织的冰冻切片进行杂交，首次用原位杂交检测了病毒 DNA 在细胞中的定位，但当时的工作多采用冰冻组织切片或培

养细胞，探针均采用同位素标记。

由于同位素标记探针具有放射性既污染环境，又对人体有害，且受半衰期限制等缺点，科学工作者们开始探索用非放射性的标记物标记核酸探针进行原位杂交。Bauman (1981) 等首先应用荧光素标记 cRNA 探针做原位杂交，然后用荧光显微镜观察获得成功。Shroyer (1982) 报道用 2, 4 二硝基苯甲醛 (DNP) 标记 DNA 探针，使该 DNA 探针具有抗原性，然后用兔抗 DNP 的抗体来识别杂交后的探针，最后经免疫过氧化物酶的方法来定位杂交探针。这两种方法至今仍有采用，但因敏感度不够高，应用不够普遍。

Pezzella(1987)创建了用碘基化 DNA 探针来做细胞或组织原位杂交的方法，其基本原理是使 DNA 探针的胞嘧啶碱基碘基化，利用单克隆抗体识别碘基化探针，再通过免疫组化方法显示结合的单克隆抗体，从而对杂交结合的探针进行定位。本法的优点是碘基化 DAN 探针标记简便，不需作缺口平移标记，敏感度也较高。但自生物素和高辛标记探针技术建立后，已有取而代之的趋势。生物素标记探针技术是 Brigat (1983) 首先建立的，它利用生物素标记的探针在组织切片上检测了病毒 DNA，通过生物素与抗生物素结合，过氧化物酶-抗过氧化物酶显示系统显示病毒 DNA 在细胞中的定位。生物素标记探针技术目前已被广泛应用，特别是在病毒学和病理学的临床诊断中。这种生物素标记技术又叫酶促生物素标记技术。另一种叫光促生物素标记核酸技术，该技术是用光敏生物素 (Photobiotin) 标记核酸。目前应用的光敏生物素有乙酸盐和补骨脂素生物素，它们都是由三个部分组成：光敏基团、连结臂和生物素 (图 20-1)。在强光下，不需酶反应，光敏生物素的光敏基团即可与核酸中的碱基相结合。光敏生物素标记核酸，方法简单，灵敏度也不低，但标记效率不高，每 100~150 个碱基才能标记一个生物素，对于短的基因探针特别是寡核苷酸探针不宜使用，以免因标记数过少而影响灵敏度 (Forster et al 1985)。

图 20-1 光敏生物素结构图

近年来，地高辛 (Digoxinonin) 标记技术引起科技工作者的极大兴趣。Boeringer Mannheim Bio-chemisca 于 1987 年将地高辛标记的有关试剂及药盒投放市场。和其它非放射性标记物一样，地高辛较放射性标记系统安全，方便、省

时间。同时在敏感性和质量控制方面比生物素标记技术要优越，可以检测出人基因组 DNA 中的单拷贝基因。地高辛标记法显示的颜色为紫蓝色（标记碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶显色系统），有较好的反差背景。

核酸探针根据标记方法的不同可粗略分为放射性探针和非放射性探针两类。根据探针的核酸性质不同可分为 DNA 探针、RNA 探针、cDNA 探针、cRNA 探针和寡核苷酸探针等。DNA 探针还有单链 DNA（Single stranded, ssDNA）和双链 DNA（Double stranded, dsDNA）之分（详见十九章）。早期应用的主要是 DNA 探针，继之 Temin 在 70 年代研究致癌 RNA 病毒时制备了 cDNA 探针（complementary DNA），其基本原理是以 RNA 为模板，经逆转录酶（reverse transcriptase）又称为 RNA 指导的 DNA 聚合酶催化产生的。该酶以 RNA 为模板，按照 RNA 的核苷酸顺序合成 DNA，这一途径与一般遗传信息流的方向相反，故称逆转录。cDNA 是指互补于 mRNA 的 DNA 分子。RNA 探针是将特异性的 cDNA 片段插入含有相当的 RNA 聚合酶启动子的转录性载体。这类载体包括 pSP64 和 pSP65，它们具有不同的启动子在多克隆位点的各侧。Psp64 和 pSP65 在 sP6 启动子的多克隆位点的方向是不同的。通过改变外源基因的插入方向或选用不同的 RNA 聚合酶，可以控制 RNA 的转录方向，即以哪条 DNA 链为模反转录 RNA。从而可以得到与 mRNA 同序列的同义 RNA 探针（Sense probe）和与 mRNA 互补的反义 RNA 探针（antisense probe），又称互补 RNA 探针（complementary RNA probe, cRNA）。通常用同义 RNA 探针做为反义 RNA 探针的阴性对照。由于 RNA 探针是单链分子，所以它与靶序列的杂交反应极高。有报告认为其杂交率高于 DNA 探针的 8 倍。

DNA 合成仪的诞生使制造寡核苷酸探针成为可能，与上述探针不同的是寡核苷酸探针不是克隆性 DNA 探针，它是由 DNA 合成仪依照所需杂交的靶核苷酸序列合成的。具有制造方便，价格低廉的优点，也可进行放射性与非放射性标记，但其特异性不如克隆性探针强，亦不如其杂交信号高。

原位杂交组织化学技术在近 20 年的发展可以说是飞跃的，其突出的特点是由分子遗传学研究提供的探针大量增加，探针生产的可靠性和速率大大发展了，更重要的是非放射性标记物的发展使原位杂交组织化学技术在不久的将来将和现今的免疫细胞化学技术一样成为实验室的常规技术和临床日常应用的诊断技

术。新的非放射性标记技术正在继续不断涌现。Coulton (1991) 建议将非放射性标记技术更名为亲合复合物标记技术 (Affinity - Complex Labelled Probes, ACLP)。因为“非 (non)”在英文里是一个否定的名词, 而且根据非放射性标记技术的原理是将一个标记物利用其亲合性, 应用直接或间接的方法结合在核苷酸分子上。

原位杂交组织化学技术在生命科学的研究中可视为一项革命性的技术。它使它们的研究从器官、组织和细胞水平走向分子水平。为各个学科的研究带来突破性的进展。其中特别突出的是细胞或组织的基因表达、染色体分析、病毒诊断和发育生物学。我们在下节 将详加叙述。

三、原位杂交组织化学技术的基本方法

如前所述, 由于核酸探针的种类和标记物的不同, 在具体应用的技术方法上也各有差异, 但其基本方法和应用原则大致相同。大致可分为: ①杂交前准备, 包括固定、取材、玻片和组织的处理, 如何增强核酸探针的穿透性、减低背景染色等; ②杂交; ③杂交后处理; ④显示 (visualization): 包括放射性自显影和非放射性标记的显色。

(一) 固定

原位杂交组织化学技术 (In Situ Hybridization Histochemistry, ISHH) 在固定剂的应用和选择上应兼顾到三个方面: 保持细胞结构, 最大限度地保持细胞内 DNA 或 RNA 的水平; 使探针易于进入细胞或组织。DNA 是比较稳定的, mRNA 是相对稳定的但易为酶合成和降解。RNA 却绝然不同, 非常容易被降解。因此, 对于 DNA 的定位来说, 固定剂的种类和浓度并不十分重要。相反, 在 RNA 的定位上, 如果要使 RNA 的降解减少到最低限度, 那么, 不仅固定剂的种类浓度和固定的时间十分重要, 而且取材后应尽快予以冷冻或固定。在解释 ISHH 的结果时应考虑到取材至进入固定剂或冰冻这段时间对 RNA 保存所带来的影响, 因组织中 mRNA 的降解是很快的。在固定剂中, 最常用的是多聚甲醛。和其它的固定剂 (如戊二醛) 不同, 多聚甲醛不会与蛋白质产生广泛的交叉连接, 因而不会影响探针穿透入细胞或组织。其它如醋酸-酒精的混合液和 Bouin's 固定剂也能获得较满意的效果。对于 mRNA 的定位, 我们常采用的方法是将组织固定于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中 1~2h, 在冷冻前浸入 15% 蔗糖溶液中, 置 4℃ 冰箱过夜,

次日切片或保存在液氮中待恒冷箱切片机或振荡切片机切片。组织也可在取材后直接置入液氮冷冻，切片后才将其浸入 4%多聚甲醛约 10min，空气干燥后保存在-70℃。如冰箱温度恒定，在-70℃可保存数月之久不会影响杂交结果。在病理学活检取材多用福尔马林固定和石蜡包埋，这种标本对检测 DNA 和 mRNA 有时也可获得杂交信号，但石蜡包埋切片由于与蛋白质交叉连接的增加，影响核酸探针的穿透，因而杂交信号常低于冰冻切片。同时，在包埋的过程中可减低 mRNA 的含量。其它固定剂如应用多聚甲醛蒸汽固定干燥后的冷冻切片也可获得满意效果。各种固定剂均有各自优缺点，如沉淀性（Precipitating）固定剂：酒精/醋酸混合液、Bouin's 液、Carnoy's 液等能为增加核酸探针的穿透性提供最佳条件，但它们不能最大限度地保存 RNA，而且对组织结构有损伤。戊二醛能较好地保存 RNA 和组织形态结构，但由于和蛋白质产生广泛的交叉连接，从而大大地影响了核酸探针的穿透性。至今，多聚甲醛仍被公认为 ISHH 较为理想的固定剂。

（二）玻片和组织切片的处理

1. 玻片的处理玻片包括盖片和载片应用热肥皂刷洗，自来水清洗干净后，置于清洁液中浸泡 24h，清水洗净烘干，95%酒精中浸泡 24h 后蒸馏水冲洗、烘干，烘箱温度最好在 150℃或以上过夜以去除任何 RNA 酶。盖玻片在有条件时最好用硅化处理，锡箔纸包裹无尘存放（硅化方法见附录）。

由于 ISHH 的实验周期长，实验程序繁杂，因此，要应用粘附剂预先涂抹在玻片上，干燥后待切片时应用，以保证在整个实验过程中切片不致脱落。常用的粘附剂有铬矾-明胶液，其优点是价廉易得，但在长周期实验过程中，粘附效果不够理想。多聚赖氨酸液具有较好的粘附效果，但价格昂贵，需进口。近年 Vector Lab (U.S.A.)推出一种新的粘附剂叫 Vectorband Reagent,每一单位包装可制备 500~700 张载玻片，粘附效果极佳，价格较多聚赖氨酸便宜，制片后可长期保存应用。目前国内尚无生产，需国外进口（配方见附录 2）。

2. 增强组织的通透性和核酸探针的穿透性此步骤根据应用固定剂的种类、组织的种类、切片的厚度和核酸探针的长度而定。比如用戊二醛固定的组织由于其与蛋白质产生广泛的交叉连接就需要应用较强的增强组织通透性的试剂。增强组织通透性常用的方法如应用稀释的酸洗涤、去垢剂（detergent）或称清洗剂 Triton X-100、酒精或某些消化酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胶原蛋白酶和淀粉酶

(diastase) 等。这种广泛的去蛋白作用无疑可增强组织的通透性和核酸探针的穿透性, 提高杂交信号, 但同时也会减低 RNA 的保存最和影响组织结构的形态, 因此, 在用量及孵育时间上应慎为掌握。

蛋白酶 K (Proteinase K) 的消化作用在 ISHH 中是应用于蛋白消化的关键步骤, 其浓度及孵育时间视组织种类、应用固定剂种类、切片的厚薄而定。一般应用酶 k $1\mu\text{g/ml}$ (于 0.1mol/l Tris/ 50mmol/L EDTA, pH8.0 缓冲液中), 37°C 孵育 15~20min, 以达到充分的蛋白消化作用而不致影响组织的形态为目的。蛋白酶 K 还具有消化包围着靶 DNA 的蛋白质的作用, 从而提高杂交信号。在蛋白酶 K 消化后, 应用 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 (在 PBS 中) 清洗以终止蛋白酶 K 的消化作用, 甘氨酸是蛋白酶 K 的抑制剂。为保持组织结构, 通常用 4% 多聚甲醛再固定。Burns 等 (1987) 报告应用胃蛋白酶 (Pepsin) $20\sim 100\mu\text{g/ml}$ (用 0.1n HCl 配) 37°C 、30min 进行消化, 所获实验结果优于蛋白酶 K。

不少实验工作者在多聚甲醛固定后, 浸入乙酸酐 (acetic anhydride) 和三乙醇胺 (tri-ethanolamine) 中以减低静电效应, 减少探针对组织的非特异性背景染色。有的作者除在室温下浸于上述溶液 10min 外, 还在预热 37°C 的 50% 甲酰胺/ $2\times\text{SSC}$ 液中预杂交 15min, 然后用 $2\times\text{SSC}$, $0.30\text{mol/l NaAc}/0.030\text{mol/L}$ 枸橼酸钠液中浸 15min。但 Heinz、Hofer 等一些著名学者却对此持有异议, 根据他们的实验和经验证明, 乙酸酐和三乙醇胺液的处理并不能起到减低背景的目的, 不能改善 ISHH 的信/噪比例。

3. 减低背景染色和免疫细胞化学染色一样 ISHH 实验程序中, 如何减低背景染色是一个重要的问题。ISHH 中背景染色的形成是诸多因素构成的。杂交后 (Posthybridization) 的酶处理和杂交后的洗涤均有助于减低背景染色。

预杂交 (Prehybridization) 是减低背景染色的一种有效手段。预杂交液和杂交液的区别在于前者不含探针和硫酸葡聚糖 (Dextran sulphate)。将组织切片浸入预杂交液中可达到封闭非特异性杂交点的目的, 从而减低背景染色。

有的实验室在杂交后洗涤中采用低浓度的 RNA 酶溶液 ($20\mu\text{g/ml}$) 洗涤一次, 以减低残留的和内源性的 RNA 酶, 减低背景染色。

4. 防止 RNA 酶的污染由于在手指皮肤及实验用玻璃器皿上均可能含有 RNA 酶, 为防止其污染影响实验结果, 在整个杂交前处理过程都需戴消毒手套。所有

实验用玻璃器皿及镊子都应于实验前一日置高温（240℃）烘烤以达到消除 RNA 酶的目的。要破坏 RNA 酶，其最低温度必须在 150℃左右。有条件的国外实验室在消毒的玻璃器皿外包以锡箔纸以利于标记和防止取出时空气污染。在无高温消毒的烤箱时，亦可用国内出产的卫生蒸汽消毒锅（山东新华医疗器材厂生产）。杂交前及杂交时所应用的溶液均需经高压消毒处理。

（三）杂交（Hybridisation）

在 ISHH，整个实验周期是比较长的，实验程序也比较繁杂，而杂交在 ISHH 整个实验中可被认为是“短兵相接”的一步。杂交前的一切准备工作如增加组织通透性都是为了在杂交这一步骤中核酸探针能进入细胞或组织与其内的靶核苷酸相结合。因此，杂交是 ISHH 中关键的而且是最重要的一个环节。

杂交是将杂交液滴于切片组织上，加盖硅化的盖玻片。国内向正华等采用无菌的蜡膜代替硅化的盖玻片也可获得满意的实验结果。加盖片的目的是防止孵育过程中的高温（50℃左右）导致杂交液的蒸发。因此，也有为稳妥起见，在盖玻片周围加液体石蜡封固的，但作者认为这并不十分必要，因封固的石蜡在高温下融解反易导致杂交液的污染，必要时可加橡皮泥封固盖片四周。硅化的盖玻片的优点是清洁无杂质，光滑不会产生气泡和影响组织切片与杂交液的接触，盖玻片自身有一定重量能与有限的杂交液吸附达到覆盖和防止蒸发的作用。在孵育时间较长时，为保证杂交所需的湿润环境，可将复有硅化盖玻片进行杂交的载片放在盛有少量 5×SSC 或 2×SSC（standard saline citrate, SSC）溶液的硬塑料盒（要能防止高温破坏）中进行孵育。杂交液的成分和预杂交液基本相同，所不同的是加入了标记的核酸探针和硫酸葡聚糖（配方见附录）。

如前所述，杂交前的准备只是为杂交的成功奠定基础，要获得满意的实验结果，在杂交这一实验过程中还须注意以下的环节。

1. 探针的浓度很难事先确定每一种实验探针的浓度，但要掌握一个原则，即探针浓度必须给予该实验最大的信/噪比值。背景染色的高低也与探针浓度有关。根据国内外实验工作者的经验，认为最佳原则应是应用最低探针浓度以达到与靶核苷酸的最大饱和结合度为目的。这和我们在免疫细胞化学试验中选择抗血清的最佳工作浓度的原则一样。

探针浓度依其种类和实验需要略有不同，根据笔者的经验及所查阅文献，在

原位杂交细胞化学中,探针浓度为 0.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (即 0.5~5.0 $\text{ng}/\mu\text{l}$)。根据 Heinz、Hofelt 实验室经验,对放射性标记的 dsDNA 或 cRNA 探针,其浓度在 2~5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。Conlton 认为生物素标记探针,其最佳浓度在 0.5~5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。作者在英皇家研究生院 Polak 教授实验室应用于放射性标记 cRNA 探针的浓度为 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$,而在非放射性标记(生物素或地高辛)cRNA 探针浓度为 2.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$,放射性标记 DNA 探针浓度为 1.0 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。向正华等应用地高辛标记生长抑素 cRNA 探针获得满意结果,其探针浓度为 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

必须强调的是,国内外实验室都证明加杂交液的要适当,以 10~20 μl /每张切片为宜。杂交液过多不仅造成浪费,而且液量过多常易致盖玻片滑动脱落,影响杂交效果,过量的杂交液含核酸探针浓度过高,反易导致高背景染色等不良后果。

2. 探针的长度一般应用于 ISHH 探针的最佳长度应在 50~100 个碱基之间。探针短易进入细胞,杂交率高,杂交时间短。据报告,长 500 个碱基的探针,其杂交时间约需 20h 左右。200~500 个碱基的探针仍可应用,如超过 500 个碱基的探针则在杂交前最好用碱或水解酶进行水解,使其变成短的片段,达到实验所需求的碱基数。

附:核酸探针水解法(以放射性标记探针为例)

(1) 按下列比例混合

探针溶解于水 160 μl 无菌蒸馏水加入含标记探针沉淀物的
Eppendorf 管中

0.4 mol/L NaHCO_3 20 μl

0.6 mol/L Na_2CO_3 20 μl

混合后孵育于 60 $^\circ\text{C}$ 水浴,其孵育时间由下式推算:

孵育时间 = $\text{LO} - \text{Lf}/\text{K} \times \text{LO} - \text{Lf}$

LO: 核酸探针原长度 (Kb)

Lf: 核酸探水解后所需长度 (Kb)

K: 是一常数 0.11Kb/min

(2) 在室温中加入下列配方以终止水解

3 mol/L 醋酸钠 6.6 μl (最终浓度 0.1 mol/L)

醋酸 1.3 μ l(最终浓度 0.5%)

(3) 加下列配方沉淀探针

7mol/L 醋酸铵 100 μ l

100%乙醇 750 μ l

tRNA(10mg/ml) 2 μ l

置于-20 $^{\circ}$ C 2h 后回暖至室温, 在 14000rpm 离心 30min。

(4) 小心将乙醇轻轻倾出, 待试管内干燥后再用无菌蒸馏水稀释到 10ng/ μ l 浓度。

(5) 应用放射性标记测定法测定其放射比活性(详见第十九章), 然后调到 5ng/ μ l 浓度。

3. 杂交的温度和时间杂交的温度也是杂交成功与否的一个重要环节。在第十八章 概述中曾提到 DNA 或 RNA 需加热或变性、解链后才能进行杂交。能使 50%的核苷酸变性解链所需的温度, 叫解链温度或融解温度 (melting temperature, 简称 T_m)。原位杂交中, 多数 DNA 探针需要的 T_m 是 90 $^{\circ}$ C, 而 RNA 则需要 95 $^{\circ}$ C。这种高温对保存组织形态完整和保持组织切片粘附在载玻片上是不可能的。因此, 在杂交的程序中常规的加入 30%~50%甲酰胺 (formamide) 于杂交液中。McConaughy 报告, 反应液中每增加 1%的甲酰胺浓度, T_m 值可降低 0.72 $^{\circ}$ C。因此, 可用调节 盐浓度的办法来调节 T_m 。 T_m 的计算公式在第十九章 有介绍, 由公式的列出也表明了它与盐的浓度、探针的长度、甲酰胺的百分比等诸多因素有关。由于盐和甲酰胺浓度的调节 等因素, 实际采用的原位杂交的温度在 T_m-25° C 左右, 即比 T_m 减低 25 $^{\circ}$ C, 大约在 30~60 $^{\circ}$ C 之间, 根据探针的种类不同, 温度略有差异, RNA 和 cRNA 探针一般在 37~42 $^{\circ}$ C 左右, 而 DNA 探针或细胞内靶核苷酸为 DNA 的, 则必须在 80~95 $^{\circ}$ C 加热使其变性, 时间 5~15min, (有作用报告在 105 $^{\circ}$ C 微波炉加热使之变性), 然后在冰上搁置 1min, 使之迅速冷却, 以防复性, 再置入盛有 2 \times SSC 的温盒内, 在 37~42 $^{\circ}$ C 孵育杂交过夜。

杂交的时间如过短会造成杂交不完全, 而过长则会增加非特异性染色。从理论上讲, 核苷酸杂交的有效反应时间在 3h 左右。Barns 等 (1987) 报告用 DNA 探针杂交, 其反应完成时间为 2~4h。但为稳妥起见, 一般将杂交反应时间定为

16~20h, 或为简便起见杂交孵育过夜, 从现有文献报告看无不良结果。当然, 杂交反应的时间与核酸探针长度与组织通透性有关, 在确定杂交反应时间应予考虑, 并经反复实验确定。

有作者主张杂交反应的孵育应在黑暗环境中进行, 因为光线会促进甲酰胺的电离作用。

4. 杂交严格度 (Hybridization stringency) 杂交条件的严格度 (stringency) 表示通过杂交及冲洗条件的选择对完全配对及不完全配对杂交体的鉴别程度。错配对 (mismatch) 杂交的稳定性较完全配对杂交体差, 因此, 通过控制杂交温度、盐浓度等, 可减弱非特异性杂交体的形成, 提高杂交的特异性。所以, 杂交的条件愈高, 特异性愈强, 但敏感性降低, 反应亦然。一般来说, 低严格度 (low stringency) 杂交及冲洗条件在 $T_m - 35^\circ\text{C}$ 至 $T_m - 40^\circ\text{C}$ 之间, 高盐或低甲酰胺浓度。在这种条件下, 大约有 70%~90% 的同源性核苷酸序列被结合, 其结果是导致非特异性杂交信号的产生。中严格度, $T_m - 20^\circ\text{C}$ 至 $T_m - 30^\circ\text{C}$ 的范围。高严格度 (high stringency) 为 $T_m - 10^\circ\text{C}$ 至 $T_m - 15^\circ\text{C}$, 低盐和高甲酰胺浓度。在这种条件下, 只有具有高同源性的核苷酸序列才能形成稳定的结合。麦跃行装用地高辛标记原位杂交技术检测尖锐湿疣中人乳头瘤病毒 DNA 型别, 结果发现在严格条件下 ($T_m - 12^\circ\text{C}$) 各型病毒 DNA 的检出率和阳性率明显低于非严格条件下 ($T_m - 35^\circ\text{C}$), 其相差非常明显 ($P < 0.001$)。因为, 在严格条件下只有同源性很强的 DNA 才被检出, 而在非严格条件下同源性较低的 DNA 序列也被检出。因此, 他建议对病毒 DNA 分型需在高严格条件下进行, 而低严格条件则可用于对病毒感染进行筛选。

由于原位杂交技术多数是在 $T_m - 25^\circ\text{C}$ 进行的, 不属于高严格范围, 无疑会产生非特异性结合导致信/噪比减低。在这种情况下, 可用加强杂交后处理洗涤的严格度使非特异性的杂交体减少。由于 RNA 杂交的稳定性, 应用 cRNA 探针进行细胞或组织的原位杂交时的杂交温度比其它核酸探针要高 10~15 $^\circ\text{C}$ 。实验证明, cRNA 产生的信号比双链 cDNA 要强。单链的 RNA 探针其杂交信号大于双链的 cDNA 的约 8 倍。

5. 硫酸葡聚糖 (Dextran sulphate) 和甲酰胺 (formamide) 硫酸葡聚糖是核酸杂交液中仅次于甲酰胺的一种组成成份。在杂交液中, 甲酰胺占 50% 左右, 而

硫酸葡聚糖占 10%左右。它是一种大分子的多聚胺化合物，具有极强的水合（hydrate）作用，因而能大大增加杂交液的粘稠度。硫酸葡聚糖的主要作用是促进杂交率，特别是对双链核酸探针。这是应用硫酸葡聚糖于杂交液中的主要目的。

甲酰胺的主要作用在上节已提及，在调节杂交反应温度方面，甲酰胺起了极为重要的作用，从而有助于保持组织的形态结构。甲酰胺还可防止在低温时非同源性片段的结合，但甲酰胺具有破坏氢键的作用从而具有一种不稳定的作用。

（四）杂交后处理（post hybridisation treatment）

杂交后处理包括系列不同浓度，不同温度的盐溶液的漂洗。在原位杂交组织化学的实验程序中，这也是一个重要的环节。特别因为大多数的原位杂交实验是在低严格度条件下进行的，非特异性的探针片段粘附在组织切片上，从而增强了背景染色。RNA 探针杂交时产生的背景染色特别高，但能通过杂交后的洗涤有效地减低背景染色，获得较好的反差效果。在杂交后漂洗中的 RNA 酶液洗涤能将组织切片中非碱基配对 RNA 除去。洗涤的条件如盐溶液的浓度、温度、洗涤次数和时间因核酸探针的类型和标记的种类不同而略有差异，一般遵循的共同原则是盐溶液浓度由高到低而温度由低到高。必须注意的是在漂洗的过程中，切勿使切片干燥。干燥的切片即使大量的溶液漂洗也很难减少非特异性结合，从而增强了背景染色。放射性标记探针杂交后漂洗过程中可用底片曝光的方法检测背景染色（非特异性标记的多少）作为改善漂洗程序的指针。在 ³⁵S 标记的核酸探针在漂洗液中须加入 14mmol/L 的 β -巯基乙醇（ β -mercaptoethanol）或硫代硫酸盐（thiosulphate），以防止 ³⁵S 标记的核酸探针被氧化。总之，如何控制漂洗的严格度从而达到理想的信/噪比无既定方案可循，必须从反复的实践中取得经验。

（五）显示（Visualization）

显示又可称为检测系统（Detection system）。根据核酸探针标记物的种类分别进行放射自显影或利用酶检测系统进行不同显色处理（详见本章 第二节）。

细胞或组织的原位杂交切片在显示后均可进行半定量的测定，如放射自显影可利用人工或计算机辅助的图象分析检测仪（computer – assisted image analysis）检测银粒的数量和分布的差异。非放射性核酸探针杂交的细胞或组织可利用酶检测系统显色，然后利用显微分光光度计或图像分析仪对不同类型和数量的核酸的

显色强度进行检测。但利用 ISHH 做半定量测定必须注意严格控制实验的同一条件，切片的厚度和核酸的保存量如取材固定的间隔时间等。如为放射自显影，核乳胶膜的厚度与稀释度等必须保持一致。

（六）对照实验和 ISHH 结果的判断

和其它实验方法一样，并非 ISHH 的任何阳性信号都是特异性的，故必须同时有对照试验以证明其特异性。对照试验的设置须根据核酸探针和靶核苷酸的种类和现有的可能条件去选定，常用的对照试验有下列几种（表 20-1）。

表 20-1 ISHH 对照试验一览表

核乳胶或非放射性检测系统对照试验
Northern 或 Southern 印迹杂交法*
ISHH 与免疫细胞化学结合*
应用多种不同的核苷酸探针与同一靶核酸进行杂交
将 cDNA 或 cRNA 探针进行预杂交（吸收试验）*
与非特异性（载体）序列和不相关探针杂交（置换试验）
将切片应用 RNA 酶或 DNA 酶进行预处理后杂交*
应用同义 RNA 探针（Sense probe）进行杂交*
以不加核酸探针杂交液进行杂交（空白试验）
组织对照用已知确定为阳性或阴性组织进行 ISHH 对照
应用未标记探针做 ISHH，进行对照

从理论上讲，对照试验设置愈多其靶核苷酸特异性确定愈可靠，但现实是不可能的。因此，在上述对照试验中应任选设至少 3~4 种用以证实 ISHH 结果的可靠性。在上述试验中，标明*者为比较可靠的对照试验。①Northern 和 Southern 印迹杂交法证明的方式和用 Western 印迹法检测抗体（蛋白质）的特异性一样，是比较可靠的。②如果具备相当的免疫组化抗血清，可用结合的免疫组织化学和 ISHH 法从蛋白质（或多肽）水平和转录水平在相邻切片或同一切片中证明同一种多肽和相应 mRNA 共存于同一细胞中。③预先将切片用 DNA 酶或 RNA 酶消化，然后用 ISHH 技术证明丢失的是 DNA 或 RNA。如同免疫组化的吸收试验一

样, 事先与特异性的 cRNA 或 cDNA 进行杂交。再进行 ISHH, 其结果应为阴性。

④由于同义 RNA 探针和组织内 mRNA 序列顺序是相同的, 应用其进行 ISHH, 结果应为阴性。检测系统的对照如乳胶或酶显色系统也应在无标记探针的情况下进行。

ISHH 的最大优点是它的高度特异性, 它可测定组织、培养的单个细胞或细胞提取物中的核苷酸含量。应用高敏感度的放射性标记 cRNA 探针在理想的 ISHH 的实验条件下检测 mRNA, 其敏感度可达到 20 个 mRNA 拷贝/每个细胞。由于双链 DNA 的稳定性, 在用 ISHH 定位 DNA 时很少发生丢失, 降解。在靶核苷酸序列比较伸展的情况如染色体铺片, 长于 2kb 的探针可以应用。因此, 其敏感性高到能够在染色体铺片上, 有时甚至在组织切片上的单个基因拷贝。正因为如此, 对 ISHH 结果的解释应持慎重态度, 特别是前人未报告过的新发现。因为如前所述, 影响 ISHH 实验结果的因素太多, 比如在外科或实验取材后未及时的固定或冷冻可由于组织中 mRNA 的降解而导致假阴性结果。另外, 在各种类型核酸探针进入细胞、组织和各种器官的能力, 又叫可接近性 (accessibility) 各异。这些诸多因素都将影响 ISHH 的实验结果。

第二节 cRNA 探针在原位杂交组织化学 (ISHH) 中的应用

Angerer 及其同事们首先应用 RNA 探针于原位杂交 (见 Cox et al 1984), 核酸探针为单链的 RNA 分子, 产生自具有质粒逆转录系统的 cDNA 克隆 (图 20-2)。由于它是单链的, 不像双链的 DNA 探针, 在溶液中不会再退火 (reanneal), 因此, 较大百分比的探针可参与杂交反应, 较 cDNA 探针的信号强。除此之外, 在溶液中产生的 cRNA-mRNA 杂交体比相应的 cDNA-mRNA 杂交体稳定, 但在原位杂交中是否如此尚未证明。cRNA 探针不足之处在于有时比 DNA 探针粘性强 (stickier)。可与组织产生较高的非特异性结合, 但此缺陷可在杂交后漂洗液中加入酶漂洗来解决。最近, Wolf 等 (1987) 建议插入确定长度的寡核苷酸至载体内产生 cRNA 分子, 这种 cRNA 分子称为“寡核苷酸核酸探针” (oligoribonucleotide probes) 已被成功的用于原位杂交实验。

图 20-2 示 cDNA 转录为 cRNA, 可标记以不同的标记物, 然后与细胞中的 mRNA 相结合。Biotin(生物素), Au(金), digoxigenin (地高辛)

一、同位素标记 cRNA 探针在 ISHH 中的应用

(一) 组织切片的原位杂交细胞化学方法

(1) 组织准备：大鼠以 10%水合氯醛 (0.3ml/100g 体重)，或 1%戊巴比妥钠约 1ml (3~4mg/100g 体重) 腹腔内注射麻醉，用 100ml 生理盐水冲洗和 150ml 4%多聚甲醛主动脉灌注固定。固定半小时后，取出组织块，置入 4%多聚甲醛液中后固定 4~6h，4℃。

如要取脑组织，可于灌注后置 4℃冰箱内过夜，次晨取脑组织，后固定 4℃ 4h 左右。

(2) 组织切片/培养细胞在经过处理，抹以粘附剂的载片上，在 43℃烤箱过夜。

(3) 在 PBS (0.1mol/l Ph7.2) 中浸 5~10min。

(4) 浸于 0.1mol/L 甘氨酸—PBs 液内 5min。

(5) 为增强组织通透性，将载片置于 0.3%Triton X-100(在 PBS 内)10~15min。

(6) PBS 洗 3×5min。

(7) 在蛋白激酶 K (1μg/ml) 溶于 Tris -HCl (0.1mol/L, pH8.0)和 EDTA (50mmol/L,pH8) 中 37℃20min。也有用蛋白激酶 K 溶液，不加 EDTA 的。

(8) 浸入新鲜配制的 4%多聚甲醛 (在 PBS0.1mol/L,pH7.2) 3min 以终止消化作用和再固定。

(9) 浸入新鲜配制的含 0.25% (V/V) 三乙醇胺 (0.1mol/l pH8.0) 中，10min 以达乙酰化 (acetylate) 的目的。

(10) 预杂交：在 50% (V/V) 甲酰胺溶于 4×SSC 预热 37℃ 15~45min 。

(11) 杂交：将载片上过量的甲酰胺液倾去，加 20μl 杂交混合液 (含放射性同位素标记的探针量为 $5 \times 10^3 \sim 10^6$ cpm/每张载片)。覆以硅化的盖玻片，置于盛有少量 5×SSC 的硬塑料盒内以保持湿度，42℃ 孵育 12~18h。为使载片不致于浸泡于 SSC 溶液内，通常以二根玻管 (或棒) 扎成担架状，载片置于玻棒上，与盐液不接触，但可保持盒内空气湿润。

(12) 杂交后漂洗

①以小烧杯盛适量 4×SSC 溶液，将载片一端斜插入溶液内，轻轻抖动以移除盖玻片。

②将载片置于有刻度的染色用小方玻缸内，加入 42℃（预热）4×SSC，3×20min。在漂洗过程中宜不断振动，以增强漂洗效果。如设有调整钮的振动台更为理想。

③加 20μlRNA 酶溶液（20μg/ml）在 NaCl(0.5mol/L)、Tris -HCl (pH8.0)和 EDTA（1mmol/L,pH8.0）消化未杂交探针，42℃30min（也有不加 EDTA 的）。

④以递减梯度盐溶液 SSC 漂洗载片：2×SSC, 0.1×SSC 和 0.05×SSC 各 30min 42℃。

⑤梯度酒精脱水：70%，90%，2×100%酒精含 0.3mol/L 乙酰胺，室温，每次 10min，空气干燥后待进行放射自显影。

（13）放射自显影和复染

①在暗室中预热水浴至 45℃，将分装的核乳胶溶液小瓶置水浴中浸泡至少 1h，同时预热一电热板至 45℃。将杂交后漂洗过完全干燥的载片依次排列于玻片架上，有组织切片一面面向实验者。在实验的载玻片前放 1~2 张无切片的干净玻片，作为测定核乳胶溶解度与浸片高度等的空白对照片。浸泡（Dipping）过核乳胶膜的载片放入暗盒内，事先最好将暗盒准备好，为保持干燥，放入一包变色硅胶干燥剂（无水干燥剂为小块蓝色晶体，吸水后呈粉红色，置烤箱中烘干待转成蓝色后可重复应用），预先备好封固暗盒用的胶带备用。

②核乳胶液，国外产品为 ILFord K5 乳胶液，国内核乳胶产品可自原子能研究所订购。不论国产或进口乳胶，事先应（按说明需要浓度）稀释分装在 10ml 小瓶内，密封于暗盒内，4℃备用。反复的冷冻和融解核乳胶会增加背景染色。每一小瓶供一次性实验应用。

为节省核乳胶，切片宜贴附在靠近载片的一端。这样，在浸泡时少量乳胶便可充分覆盖切片。

③浸核乳胶（Dipping）：当一切准备工作就绪后，在暗室中（只留完全灯）先将载片置于电热板上预热 1~2min。以空白载片浸入核乳胶液，取出后检查核乳胶是否充分溶解，玻片上有无气泡。然后正式进行切片浸入。浸核乳胶膜是一项需反复操练的技术。以拇、食指夹住玻片一端，以垂直方向进入乳胶，进入的提出均应采取中速度，且速度应保持稳定，提出后可将玻片一端滴下的乳胶轻沾于吸水纸上，掌握好该技术，浸入形成的核乳胶膜厚度适当，均匀一致。依序放

在预热 45℃ 的电热板，倾斜度应一致。在 45℃ 电热板上干燥至少 1~2h，在此期间应严格控制在黑暗中。

④装入暗盒曝光：将载片架上已干燥覆有核乳胶的载片放入暗盒内，周围用胶带封固，以标签写明：样品种类，实验者姓名，曝光日期等放在 4℃ 冷房或冰箱内。曝光时间依同位素种类而异，³²P 大约需 5~7 日，³H 需 4 周，但还要参考细胞内 mRNA 的含量而定，含量高者曝光时间宜短，反之宜适当延长。可根据不同曝光时间的实验结果予以调整。曝光时间长可增加信号，但也增加背景，反之，信号减弱，但背景亦低。

⑤显影：取出切片中暗盒（注意：切勿启封），放在室温至少 1h，使其回升到室温。然后在暗室内（只留安全灯），将载片置入 Kodax D19 显影液（预调温至 18~20℃）3min。水冲片刻后入 Kodax F24 固定剂内 3min。上述溶液及水温最好都保持在 18~20℃。突然改变溶液温度会损坏精细的核乳胶膜。另外，在显影和定影过程中不要振荡溶液，因为，这时的乳胶还是处于胶状结构，溶液振荡的冲击可使乳胶膜产生划痕。

⑥冲洗，脱水和复染：用自来水（水冲力勿过猛）冲洗载片 20min，如需要可用 1% 苏木精复染，复染后自来水冲洗分化 2min，梯度酒精脱水（70%，90%，100%）每次 3min，二甲苯透明，DPX 封片。

（二）培养细胞的原位杂交细胞化学方法

（1）固定：通常将细胞培养在盖玻片或塑料薄膜上，可将盖玻片取出，倾去培养液，用 4% 多聚甲醛液固定 2~4h 后，依组织切片处理法进行 ISHH 实验。也有在 4% 多聚甲醛室温固定 20min 后，由低浓度 30%，50%，70% 酒精各 3min，保留在新鲜配制的 70% 酒精中，4℃，备用。

（2）重回到水：50%，30% 酒精 3min，无菌重蒸水 2×3min，然后置入 PBS 含 5mmol/l MgCl₂ 10min，室温（配制法：200ml PBS, 1ml MgCl₂）。

（3）0.1mol/L 甘氨酸/Tris pH7.4：室温 10min(0.1mol/L 甘氨酸, 0.2mol/l Tris (配制法：1.5mg 甘氨酸和 20ml Tris, 应用重蒸水制成 200ml)。

以后步骤同（一）组织切片法。

二、生物素标记 cRNA 探针在原位杂交组织化学中的应用

（一）光敏生物素标记 cRNA 探针的应用

以线性质粒 DNA 为模板合成未加标记物的 cRNA 探针,使其最终浓度为 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (500~1000 $\text{ng}/\mu\text{l}$),再与等体积的光敏生物素(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)混合。在 150 瓦卤素灯下,距离光源 20cm 处照射 30min。用仲丁醇抽提游离生物素,再用丁醇沉淀回收光敏生物素 cRNA 探针,将其溶于适量的灭菌双蒸水,用紫外分光光度计测探针的光密度(详第十九章),其最佳工作浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

切片的制作、预处理、预杂交、杂交和杂交后冲洗的方法同概述中基本方法一节。

光敏生物素核酸探针原位杂交组化程序:

(1) 石蜡切片脱蜡入水后,置 0.1mol/l PBS pH7.2 冲洗 5min;冰冻切片直接入 PBS 冲洗 5min。

(2) 0.1mol/l 甘氨酸 PBS 冲洗 5min。

(3) 0.4%Triton X-100 PBS 冲洗 15min。

(4) 蛋白酶 K1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.1mol/l Tris -HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA 配) 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30min。

(5) 4%多聚甲醛 PBS 固定 5min。

(6) 0.1mol/l PBS 冲洗 2 \times 3min。

(7) 0.25%乙酸酐(0.1mol/l 三乙醇胺配制) 10min。

(8) 2 \times SSC 冲洗 10min (1 \times SSC: 0.15mol/l NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠)。

(9) 取 10 μl 含相应探针的杂交液滴于标本上,如果是 cDNA 探针则用前将探针于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10min,马上放入冰浴中冷却,然后再用。

(10) 盖上 22 \times 22mm 的硅化盖片或合适大小的蜡膜,入温盒 43 $^{\circ}\text{C}$ 保温 12~16h。

(11) 4 \times SSC 洗脱盖片,并在同一液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 漂洗 10~30min。

(12) 2 \times SSC (含 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA,适于 RNA 探针) 冲洗 30min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

(13) 1 \times SSC, 0.1 \times SSC,37 $^{\circ}\text{C}$ 各漂洗 10~30min。

(14) 0.05mol/l PBS 冲洗 4 \times 5min。

(15) 3%BSA (0.4%Triton X-100 PBS 配) 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30min。

(16) Avidin -AKP(碱性磷酸酶) (1: 500~1: 100, 0.4%Triton X-100 PBS 配) 室温 1~3h。

- (17) 0.05mol/l PBS 冲洗 4×5min。
- (18) TSM1 冲洗 2×5min。
- (19) TSM2 冲洗 2×5min。
- (20) 硝基四氮唑蓝 (NBT) 0.4%mg/ml 和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸 (BCIP) 0.2mg/ml 混合液显色, 室温, 暗处 3h。
- (21) 20mmol/l EDTA,pH8.0 终止显色。
- (22) 甘油明胶直接封片。

结果: 杂交阳性部位着蓝黑色。

组织处理及预杂交所用器皿需高温消毒, 实验者需戴手套。

(二) 酶促生物素标记 cRNA 探针的应用

基本方法和放射性标记 cRNA 探针同, 所不同的是探针浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。显示探针反应步骤如下。

- (1) 用 PBS 冲洗粘附有切片的载片 2×3min。根据情况也可用漂洗法。
- (2) 将载片浸入 0.3% H_2O_2 在 PBS 或甲醇内 30min 以封闭内源性过氧化物酶。
- (3) PBS 冲洗 2×3min, 用吸水纸拭干切片周围的水份, 加入小鼠抗生物素血清 1: 100 和 PBS 含正常羊血清 (1: 30), 室温 1h, 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
- (4) PBS 彻底冲洗。
- (5) 载片加生物素化抗小鼠 IgG (1: 100) 30min 室温。
- (6) PBS 彻底冲洗。
- (7) 应用 ABC 复合物与等量的 1%牛血清白蛋白-PBS 液混合孵育 1h, 室温。
- (8) PBS 彻底冲洗。
- (9) 将切片覆以新鲜配制的 0.025%DAB 溶液, 0.02% H_2O_2 , 孵育 3~15min。
- (10) 水洗, 复染, 脱水, 透明和以甘油/PBS 或 DPX 封固。如需要可用银染, 多层 ABC 或 PAP 法加强染色效果。

三、地高辛标记 cRNA 探针的应用

(一) 基本原理

地高辛 (Digoxigenin 简写 Digo-) 又称异羟基洋地黄毒甙配基, 这种类固醇

半抗原仅限于洋地黄类植物,其抗体与其它任何固醇类似物如人体中的性激素等无交叉反应,地高辛配基标记于脱氧尿嘧啶三磷酸核苷(dUTP)上形成 digoxigenin-11-dUTP(图 20-3)。通过随机引物或缺口翻译法(多用随机引物法),将 dig-11-dUTP 与探针的核酸分子相连,构成 Dig-配基标记的核酸探针。将这种标记的探针与组织、细胞或染色体原位核酸分子之间的同源序列在一定条件下互补杂交,然后用偶联有酶或荧光素的羊抗高地辛抗体 Tab(抗原结合片段)结合物作为酶标或荧光标记,再分别用显色底物使杂交部位显色或产生荧光以达到检测目的,其反应过程见图 20-3。

图 20-3 地高辛标记的探针检测酶联免疫反应

常用的免疫酶学检测方法有两类:一是 Dig-HRP(辣根过氧化物酶)检测体系,以 DAB(四氢氯化二氨基联苯胺)/H₂O₂ 为底物,结果为棕色;或以 4-氯-1-萘酚/H₂O₂ 为底物,结果为蓝色。另一是 Dig-AKP 检测体系:以 BCIP/NBT 为底物,结果为蓝紫色沉淀。与免疫细胞化学方法相似,如应用酶促反应会较单一信号的标记物如荧光素具有更高的灵敏度。同样是酶促化学反应,AKP 灵敏度和分辨率较 HRP 高约 10 倍左右,但 HRP 的优点为价廉、稳定。

应用地高辛标记的核酸探针也较稳定,据报告在-20℃贮存可达 2 年,随时要取用,不像放射性标记探针有半衰期所致的时间限制。但在现实应用中,仍喜欢采用新鲜的地高辛配基标记 3~6 个月以内的核酸探针。为节省核酸探针的用量,凡使用过的含有探针的杂交液也可反复多次使用,特别是对于已知的重复性实验。对于细胞或组织内未知 mRNA 的检测,仍宜采用未使用过的探针杂交液为佳。

与放射性标记相比,地高辛标记探针具有非放射性探针的优点,对人体无害,不受半衰期限制,探针可长期保存。与生物素标记探针相比,地高辛探针不受组织、细胞中内源性生物素的干扰,敏感性高。由于地高辛具有灵敏度及分辨率高,反应产物颜色鲜艳,反差好,背景染色低,制备探针可较长期保存,对人体无害等优点,已日益显示出它的优越性和广泛的应用前景。它不仅可应用于原位杂交细胞化学,还可应用于 Southern 印迹杂交法检测特定基因组序列,进行 RFLP 分析用于基因诊断,菌落原位杂交,噬菌斑原位杂交,固定细胞及中期染色体原位

杂交以及生物体液中，组织中病毒 DNA 序列的检测。这一技术还被应用于检测 DNA 标记物及测序，对人类染色体连锁图谱进行构建和基因图谱分析。

（二）基本操作步骤

组织处理及预杂交等步骤与本章中叙述的放射性同位素标记 cRNA 探针相同，但由于地高辛标记 cRNA 探针在原位杂交细胞化学中已愈来愈得到广泛的应用，我们在基本方法中仍较详细的叙述其操作过程。

1. 组织前处理在组织制片中以冷冻切片（厚 10~30 μ m）最佳。切片贴在预先清洁，高温处理并涂以粘附剂载玻片上，先在 37 $^{\circ}$ C 预干燥 4h，然后置于 37 $^{\circ}$ C 烤箱中过夜。经过上述处理的切片如在 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2~3 周，在 -70 $^{\circ}$ C 可保存数月之久，有报告可保存数年之久的。但仍以新鲜制片为好。如为石蜡包埋切片，应脱蜡经梯度酒精入水。一般不提倡浸入二甲苯溶液。但在细胞内 mRNA 含量高时应用二甲苯脱蜡后仍能显示。经水洗后入 37 $^{\circ}$ C 烤箱 4h 或过夜，然后进行杂交前处理。

在烘烤及低温保存时，为防尘埃及空气中 RNA 酶的污染，宜用锡箔纸（foilpaper）包被，内加少许干燥剂（变色硅胶）。

下列步骤所需玻璃器皿均需消毒，操作者需戴手套。

（1）PBS 洗 2 \times 3min。

（2）选择少数几张切片作为“RNA 酶对照片”。

其它切片暂放于 PBs 内。

RNA 酶对照片处理方法：加 RNA 酶（100 μ g/ml）在预热 37 $^{\circ}$ C 的溶液内。放在潮湿的盛有少许 2 \times SSC 塑料盒或蒸发皿内。在每张切片上覆以过量的 RNA 酶溶液，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后用 2 \times SSC 冲洗，2 \times 3min，然后与其它保存在 PBS 的切片一起进行下列处理。

（3）蛋白酶 K 消化：将组织切片放在 0.1mol/l Tris/50mmol/L EDTA pH8.0，内含蛋白酶 K 1 μ g/ml，孵育 15~20min。消化时间应根据组织的种类，厚度反复试验调整。时间过短探针不易进入，过长影响细胞或组织的形态结构。

（4）0.1mol/L 甘氨酸/PBs 5min 终止蛋白酶 K 反应。0.25% 乙酸酐（0.1mol/l 三乙醇胺配制）10min。

（5）在 4% 多聚甲醛/PBs 3min。

(6) 以 PBs 漂洗 2×3min。

(7) 浸入新鲜配制的 0.25% 乙酸酐 (0.1mol/L 三乙醇胺配制) 10min, 以封闭非特异性结合部位。

(8) 2×SSC 漂洗 15min。

2. 杂交以含 cRNA 探针 (0.5ng/ml) 的杂交液, 按每张切片 10~2μl 的量覆盖切片。地高辛配基标记的 cRNA 核酸探针保存浓度为 2.5ng/ml, 用前稀释备用。覆以硅化盖玻片或塑料蜡膜, 置于盛有少量 2×SSC 温盒内在 42℃, 16~18h 或过夜。

3. 显示

(1) 用缓冲液 1 冲洗杂交后的载片 2×3min。

(2) 在缓冲液 1 中 10min, 室温以封闭非特异性结合部位。

(3) 拭干切片周围的载片, 注意保持切片湿润。加数滴抗地高辛抗血清 (工作浓度 1: 500, 以缓冲液 1 稀释), 孵育 2h, 室温。

(4) 缓冲液 1 漂洗 3×3min。

(5) 浸入缓冲液 2 10min 室温。

(6) 浸入底物中孵育 10~30min (或更长时间, 视需要而定), 底物内含显色 BCIP/NBT, 室温。最好用锡箔纸包裹反应盒, 使显色在黑暗中进行。定期取出切片在显微镜下检测反应强度。根据反应强度决定延长或终止反应。反应颜色为紫蓝色。

(7) 将切片浸入缓冲液 3 以终止反应。

(8) 复染, 可用 1%伊红、1%苏木精、1%亮绿或 5%的焦宁 (又称派咯宁 Y) (pyronin Y) 10~30s。

(9) 流水洗 5~10min, 直至水无色为止。

(10) 在切片未干前, 以 PBS/甘油封固切片, 如要永久保存, 可以用 DPX 在盖片四周封固。为去除水份, 在封固前可进行梯度酒精脱水, 透明, DPX 封固, 但每步时间仅需几秒钟, 时间过长易致褪色。

几点说明

①缓冲液 1, 2, 3 配制法见附录。缓冲液 1 中 BSA 用量大, 价贵, 如无法负担可略去。

②切片处理过程可采取漂浮法或载片染色法,载片染色适用于切片数数量较少时,可用液体覆盖于切片表面进行孵育,漂洗在烧杯内进行。如切片多,可将载片置于方形的染色缸(staining jar)内,将冲洗液加入缸内,如有振荡器在漂洗中稍加震荡更有助于减低背景染色。漂浮法适用于切片数量大量,将切片置于凹形碟内,或染色缸内。漂浮法的优点是节约试剂用量,切片两面均可接触反应液,有利于信号的增强。

③在底物中孵育时间过长会产生弱强的非特异性染色,有时甚至误为阳性反应。解决方法一是设置对照片,二是对非特异性染色加以区别。非特异性染色与特异性染色的主要区别点在于后者有结构性定位,而前者系无结构性定位,常在切片边缘或细胞密集处呈现较强的颜色反应。

④在组织前处理中应严格注意控制 RNA 酶的污染,包括戴手套、器皿消毒等。另外,和免疫细胞化学一样,自始至终应保持切片的湿润,勿令其干燥。

[NextPage]

第三节 DNA 及寡核苷酸探针在原位杂交组织化学中的应用

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 4~6μm,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×2,自 100%乙醇,90%,70%,50%,30%各 5min。入 PBS(含 5mmol/l MgCl₂,pH7.3~7.4)10min×2。入 0.2n HCl 20min 以进一步

去除蛋白。

- (3) 50℃2×SSC, 含 5mmol/l EDTA 溶液中 30min。
- (4) 蛋白酶 K (1μg/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 MgCl₂ 漂洗 10min×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, 20μl/每张切片, 42℃水浴半小时。

3. 杂交 10~20μl/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×SSC 湿盒内, 42℃过夜 (16~18h)。

4. 杂交后漂洗

- (1) 2×SSC 液内振动移除盖片。
- (2) 2×SSC 55℃10min×2。
- (3) 0.5×SSC 55℃5min×2。
- (4) 缓冲液 II (含 0.5%封阻试剂, 用缓冲液 I 溶解) 37℃30min。
- (5) 缓冲液 I (10mmol/l Tris -HCl, 15.0mmol/L NaCl pH7.5) 15min, 室温。
- (6) 酶标地高辛抗体 (1: 5000, 应用缓冲液 I 稀释) 37℃30min。
- (7) 缓冲液 i 15min×2 室温。

(8) 缓冲液 III (100mmol/l Tris -HCl, 100mmol/L NaCl, 50mmol/L MgCl₂, pH9.5) 室温 2min。

5. 显色

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

(2) 缓冲 IV (10mmol/l Tris -HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 10min 终止反应, 甲绿复染 5min, 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 (2~5kbp 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°C 进行,探针稀释浓度在 2ng/μl,染色体铺片探针浓度在 0.4ng/μl,杂交液 2~3μl/每 cm² 盖片,每张盖片大约 1.8cm²,约需 10μl 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°C,因此,建议对盖片应用前在 37°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氨基乙酰基荧光(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),以硫氢基(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 - Manubheim 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。氨基乙酰基荧光素,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(texasred)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 50 μ lRNA 酶溶液，盖以盖玻片，放在湿盒内（2 \times SSC）37℃1h。应用 2 \times SSC 漂洗 2 \times 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（0.3~0.6 μ g/ml，在 20mmol/l Tris -HCl, pH7.5, 2mmol/L CaCl₂）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 \times SSC，在室温漂洗 2min \times 3，再固定于 4%多聚甲醛溶液中，室温 10min。2 \times SSC 洗 2min \times 3。

(4) 靶 DNA 变性：将载片浸入 70℃变性溶液（70%甲酰胺，2 \times 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 \times 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 \times 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：MM1 7μl，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 (5μl 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 (5μg/ml 在 PBS 含 5% 奶粉或 1% BSA, 5μl/cm²)。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℃ 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×3，45℃。

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) (5μl/每 cm² 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) 5μl/cm² 盖玻片。室温 37℃。孵育 30min。

3) 漂洗: PBS-0.1%Tween 室温 5min×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℃孵育 30min, 如 3) 应用 PBS-0.1%Tween 漂洗 5min×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 MgSO₄ 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 5×10⁶/ml。利用 RNA 酶消化后, 使核从细胞分离, 细胞核混悬液浓度为 4~5×10⁶ 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℃离心 (×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 MgSO₄, 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×SSC-0.1%Tween 漂洗 1×3min, 继之加入等量 2%的多聚甲醛在 1×PBS-5mmol/l MgSO₄。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×SSC1 份, 50%硫酸葡聚糖 2 份, pH 调至 7.0。此原液 (stock solution) 可贮存在 4℃冰箱内。应用时加 1 份 10mg/ml 鲑鱼精子 DNA (herring sperm DNA)。

②混合 1μl 的细胞核混悬液 (10⁸/ml) 与 18μl 的杂交混合液, 充分混匀。将此 19μl 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℃ 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℃孵育过夜。

(4) 杂交后漂洗

①在每管中加入 1.25ml 50%甲酰胺-2×SSC(pH7.0), 在 42℃ 静置 10~15min。偶尔旋转以助混匀。冷却至室温。加 100μl 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×SSC(pH7.0), 42℃, 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 K₂CO₃ 和 DEMS 溶液处理 3 次, 第 1 次: K₂CO₃ 为 20mmol/L, DEMS 为 3mmol/L, 以后 2 次: K₂CO₃ 依然为 20mmol/L, 而 DEMS 为 10mmol/L。在应用前将 K₂CO₃ 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 K₂CO₃ 将 pH 调至 9~10。在 25℃, 15min 后, 加入 50μl, 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×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 200μl 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 20μl 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 200μl PBS 含 0.05%Tween -2%NGS, 振荡, 室温静置 10min, 加 20μl 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 200μl 4×SSC 含 0.1%Trion X-100 和 5%BSA。室温静置 10min 后, 加 20μl 抗生物素标记 FITC 抗血清 15μg/ml, 孵育在 37℃ 30min, 以 1.5ml 4×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 250μl 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 750μl 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，寡核苷酸探针已成功地为放射性同位素、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 $10\sim 20\mu\text{m}$ ，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°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， $\text{pH}7.4$ 。PBS 漂洗 $5\text{min}\times 3$ ，孵育在 $2\times\text{SSc}$ 10min。

（2）石蜡包埋切片：浸入二甲苯 10min 移除石蜡，以 100%乙醇 $10\text{min}\times 2$ ，空气干燥 10min，从高到低梯度乙醇（95%，80%，70%）1min/每个浓度。PBs $5\text{min}\times 3$ ，孵育在 $2\times\text{SSc}$ 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_2 ） $5\text{min}\times 3$ 漂洗。在 0.1mol/L 三乙醇胺含 $0.25\%(\text{V/V})$ 乙酸酐 10min。在 0.2mol/l Tris-HCl 含 $(0.1\text{mol/L}$ 甘氨酸) $\text{pH}7.4$ 10min。孵育在 $2\times\text{SSc}$ 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/μl)。

(2) 预杂交后以 2×SSC 漂洗, 以吸水纸拭干切片周围水份, 加 30μl 杂交液在切片上, 加硅化盖玻片, 在 37℃过夜。如探针大于 36 碱基则杂交温度为 42℃。次日室温 2×SSC 液漂洗切片 1h, 1×SSC 漂洗切片 1h (室温), 0.5×SSC 37℃漂洗半小时, 0.5×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℃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。

[NextPage]

第四节 原位杂交组织化学与免疫细胞化学结合法

原位杂交组化 (ISHH) 与免疫组织化学 (IHC) 结合法是先后用 ISHH 和 IHC 在同一切片或两个相邻切片进行染色, 这样就可以同一细胞中显示出某种 mRNA 和相应的蛋白、多肽或其它抗原, 从而可更好地了解某一基因的转录和蛋白、多肽合成的动力学。ISHH 与 IHC 结合法可以在相邻切片上分别进行 ISHH 和 IHC 染色, 也可先后在同一切片上进行 ISHH 和 IHC 染色。前者可使 ISHH 和 IHC 染色都获得理想的结果, 易成功, 但易产生空间误差和样本误差。在同一切片上

进行结合法可克服这些误差，但第一次染色总要或多或少地影响第二次染色，使第二次染色不十分理想。由于 mRNA 易被染色过程中污染有少量 RNase 的液体所降解，因而在实践中往往首先进行原位杂交组化染色，这种次序使结合法易成功。但在操作方法中应注意减少生物活性肽或蛋白的丢失，如在杂交后冲洗中适当减低漂洗温度。

一、同位素原位杂交组化与免疫组化 PAP 法的联合程序

- (1) 切片入 PBS 冲洗 5min，最好是将切片漂洗于灭菌器皿中。
- (2) 0.1mol/L 甘氨酸 PBs 5min。
- (3) 0.4% Triton X-100 PBS 15min。
- (4) 1 μ g/ml 蛋白酶 K，37 $^{\circ}$ C 保温 30min。
- (5) 4%多聚甲醛 PBS 固定 5min 。
- (6) PBS 冲洗 2 \times 3min。
- (7) 0.25%乙酸酐 (0.1mol/L 三乙醇胺配) 10min。
- (8) 2 \times SSC 冲洗 10min。
- (9) 杂交：如是 cDNA 探针用前需进行变性处理，载片法时将切片在空气中晾干，加含探针的杂交液 10 μ l 于切片上，盖上 22 \times 22mm 的硅化盖片或相当大小看蜡膜，³H 标记探针每 10 μ l 杂交液含 1 \times 10⁵cpm 探针，³²P 或 ³⁵S 标记探针每 10 μ l 杂交液含 5 \times 10⁵cpm 探针；如是漂浮切片，则用灭菌吸水纸将切片水份尽量吸干，然后入杂交液，探针浓度和载片法一样。入杂交液后 43 $^{\circ}$ C 保温 12~16h。
- (10) 4 \times SSc 37 $^{\circ}$ C 冲洗 10~30min。
- (11) 2 \times SSC (如为 RNA 探针则含 20 μ g/ml RNase) 37 $^{\circ}$ C 冲洗 30min。
- (12) 1 \times SSC 和 0.1 \times SSc 37 $^{\circ}$ C 分别冲洗 30min。
- (13) PBS 冲洗 2 \times 5min。(转录 ISHH)
- (14) 0.5% H₂O₂ PBS 室温 30min。
- (15) 1% BSA 37 $^{\circ}$ C，30min 。
- (16) 第一抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育 16~24h。
- (17) PBS 冲洗 4 \times 5min。
- (18) 第二抗体 37 $^{\circ}$ C，1h。
- (19) PBS 冲洗 3 \times 5min。

- (20) 兔 PAp 37℃, 1h。
- (21) PBS 冲洗 3×5min。
- (22) DAB 显色液 5~10min (DAB 显色液: 0.05%DAB + 0.03% H₂O₂ PBS 液配)。
- (23) PBS 冲洗 3×5min。如是漂浮切片则将其贴于涂有粘附剂的载片上, 晾干。
- (24) 切片入 70%, 85%, 95%和 2 个 100%酒精脱水, 空气干燥。
- (25) 在暗室涂布乳胶 (乳胶配制: 乳胶原液: 0.6mol/L 醋酸胺=1: 1), 晾干, 装入自显影暗盒。
- (26) 4℃曝光: 3H 标记探针 4~8 周, 35S 标记探针 1~4 周, 32P 标记探针 7~10 天。
- (27) D196 显影液, 20℃显影 5~10min。
- (28) 自来水冲洗数秒。
- (29) F5 坚膜定影液 10min。
- (30) 自来水冲洗 15min。
- (31) 切片温箱烤干, 脱水, 透明, 封片。

结果: 蛋白或多肽免疫反应阳性细胞为棕色胞质, 而其相应 mRNA 为黑色银颗粒聚集。

二、非同位素原位杂交组化与免疫组化联合法

非同位素标记物很多例如: 生物素 (biotin), 地高辛 (Digoxigenin), 汞 (mercury), 溴 (bromine) 和碱性磷酸酶等, 其中目前应用最多的是生物素和地高辛。将此法与免疫组化 PAP 法或 ABC 法联合使用, 能成功地显示一些神经肽 mRNA 和神经肽的共存与共同分布。向正华等发现碱性磷酸酶抗地高辛抗体是经木瓜蛋白酶处理的, 只有抗体的 Fab 段没有 Fc 段, 而免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC) 所应用的抗体既有 Fab 段, 又有 Fc 段。由于抗体的这一特性可在 ISHH 和 ICC 抗体孵育时将检测核酸的抗地高辛抗体 Fab 段与检测蛋白、多肽的兔抗血清混合在一起, 一同孵育切片, 这样可明显缩短 ISHH 和 ICC 结合法的实验周期, 同时还可以减少实验过程中对 ICC 检测的蛋白、多肽的损害, 使结合法易成功。为什么两种抗体可同时混合孵育切片, 这是因为抗地高

辛抗体只有 Fab 段，而没有 Fc 段。我们知道抗体的抗原决定簇在 Fc 段，因此第二抗体与第一抗体的结合是第二抗体的 Fab 与第一抗体的 Fc，所以第一抗体如果只有 Fab 段没有 Fc 段，那么第二抗体就无法与一抗结合。因此实验中将二种抗体混合孵育切片而不会产生交叉结合。以下为此法的原理图（图 20-5）。

图 20-5 原位杂交细胞化学与免疫细胞化学结合法

此种 ISHH 与 ICC 联合法稳定，实验周期短，蓝色与棕色反差强，是目前较好的 ISHH 与 ICC 结合法。详细程序如下：

(1) 将切片漂浮于能经受高压灭菌的器皿中。0.1mol/l PBS pH7.2 冲洗 3×5min。

(2) 0.1mol/L 甘氨酸 PBS 冲洗 5min。

(3) 0.4% Triton X-100 PBS 15min。

(4) 1 μ g./ml 蛋白酶 K (0.1mol/l Tris -HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA 配)，37 $^{\circ}$ C 保温 30min。

(5) 4%多聚甲醛 PBS 5min。

(6) PBS 冲洗 2×min。

(7) 0.25%乙酸酐 (0.1mol/L 三乙醇胺配) 10min。

(8) 2×SSC 冲洗 10min。

(9) 将切片用灭菌吸水纸吸干，然后入杂交液。核酸探针浓度为 0.25~0.5 μ g./ml。每一正常成年大鼠脑冠状切片 15 μ l 杂交液足够。43 $^{\circ}$ C 保温 12~16h。

(10) 4×SSC 37 $^{\circ}$ C 冲洗 30min。

(11) 2×SSC (含 RNaseA 20 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。

(12) 1×SSC 和 0.5×SSC 37 $^{\circ}$ C 分别冲洗 30min。

(13) 0.05mol/l PBS 冲洗 3×5min。

(14) 0.5% H_2O_2 PBS 室温 20min。

(15) 0.05mol/l PBS 冲洗 2×5min。

(16) 碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体 (Fab) 与抗蛋白或多肽等抗体混合液，前者一般 1: 1000 稀释，后者则因抗体而异。稀释液：1%BSA, 0.4%Triton X-100, 0.05mol/L PBS pH7.2, 4 $^{\circ}$ C 孵育 24h。

- (17) 0.05mol/l PBS 冲洗 4×5min。
- (18) 二抗 (1: 100~1: 200) 37℃保温 1h。
- (19) 0.05mol/l PBS 冲洗 3×5min。
- (20) PAP (1: 200~1: 400) 37℃保温 1h。
- (21) 0.05mol/l PBS 冲洗 3×5min。
- (22) DAB 显色液 (0.05%DAB + 0.03% H₂O₂, 0.05mol/L PBS pH7.2 配) 显色 5~10min。
- (23) 0.05mol/l PBS 冲洗 3×5min。
- (24) TSM, 冲洗 2×5min (TSM1: 0.1mol/l Tris - HCl pH8.0, 0.1mol/L NaCl, 0.01mol/L MgCl₂) .
- (25) 硝基四氮唑蓝 (400μg/ml) 和 5-溴-4-3-吡啶磷酸 (200μg/ml) 混合液 (TSM2 配显色混合液) 显色 1~3h, 避光。
- (26) 20mmol/l EDTA 终止显色。
- (27) 将切片贴于涂有铬矾明胶的载片上, 空气干燥。
- (28) 梯度酒精脱水, 透明、封片。

结果: ISHH 阳性细胞的胞质呈紫蓝色, 胞核不着色, 示该细胞含 XmRNA。ICC 阳性细胞的胞质呈棕色, 胞核不着色示该细胞含 X 多肽。双标记细胞的胞质为蓝棕混合色, 示多肽与 mR-NA 共存于该细胞内。

第五节 原位杂交免疫细胞化学技术的未来与展望

自 1969 年以来, 我们高兴的看到原位杂交免疫细胞化学技术已从分子生物学的一个分支发展成为生命科学的有效的研究方法。在原位杂交免疫细胞化学发展过程中两个关键性的突破是核酸探针制备的标记物的改进。核酸探针由克隆的核酸探针发展到无克隆的合成的寡核苷酸探针; 从放射性同位素标记到非放射性标记。令人可喜的是, 这一技术还处于不断的改进和更新的过程中。

一、PCR 与原位杂交细胞化学结合法

自 1988 年以来 On 等科学家相继在研究对导致人类免疫缺陷的 HIV-1/AIDS 病毒 DNA 进行细胞内定位, 以期提高对患者的阳性检出率。在系列研究的基础上, Bagasra 及其同事在 1990~1993 年成功的报告了原位杂交及聚合酶链反应结合法, 简称为原位杂交 PCR (PCr in situ, PCRIS)。在本书二十二章 中曾介绍

了 PCR 技术,它是一种对特定的 DNA 片段在体外进行快速扩增的无细胞克隆技术,基本步骤包括高温变性,低温退火适温延伸三个步骤的反复热循环,其效率可使几个拷贝的模板序列甚至一个 DNA 分子扩增 107~109 倍。大大提高了 DNA 的检测率。此法不足之外,在于其不能达到细胞或组织的定位。PCRIS 技术的基本的原理是首先利用 PCR 技术将靶 DNA 片段扩增,然后用原位杂交细胞或免疫细胞化学技术通过标记的核酸探针与扩增了的 DNA 进行杂交显示和定位,其敏感性可达到显示单个拷贝基因的信号的程。Bagasra 及其同事们利用这一方法,应用 32P 和生物素标记的核酸探针分别对导致人体免疫缺陷的 HIV-1/AIDS 病毒 DNA 的单个拷贝基因经 PCR 扩增后在外周血单核细胞内显示成功。就算此法对 HIV-1 感染患者外周血单核细胞检测的阳性率明显高于用单纯原位杂交技术的检出率,说明其敏感度大于单纯的原位杂交免疫细胞化学技术。其主要实验步骤为将离心沉淀的细胞滴入覆有聚四氟乙烯 (teflon coated) 的设有三个凹孔的特制玻片 (CellLine Associates, Newfield, NJ, Cat No 10~12, 12~14mm 的孔) 的凹孔内,加热 105℃ 90s, 然后以 2% 多聚甲醛-磷酸缓冲液, pH7.4, 固定 1h, PBS 漂洗 3min×3。如用生物素标记核酸探针,应用 0.3% 的 H₂O₂ 孵育 37℃ 过夜, 然后以蛋白酶 K 溶液 (5μg/ml PBS) 55℃ 孵育 2h (孵育时间应根据细胞的种类而定), 将孵育的载片置于 96℃ 热板上 2min, 最终以蒸馏水漂洗, 空气干燥。在溶液中按 PCR 技术的需要加入 20PM 一对应的引物 (Primer), 15μg PCR 混合液含 10μmol/l dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、50mmol/l KCl, 10mmol/L Tris(pH8.3), 2.5mmol/L MgCl₂ 和 10μl Taq 多聚酶 (1u/μl, Gene Amp Cetus)。把上述溶液加入左侧二孔中, 留一孔加入无引物的 PCR 混合液作为对照。将载片以 22×66mm 盖片覆盖, 片周以无色指甲油封闭, 放入自动的热循环仪 (M.J. Re-seasCH, Boston MA)。可改良用铝锡箔纸覆盖于热循环仪表面再放置载片。按 94℃/45℃/72℃ 每个温度 1min, 30 个循环。这温度也可根据引物的 GC 比例加以调整以求得理想的扩增。也可根据下列公式计算引物的 T_m 值 (Muller & Wold, 1989)。

$$\text{引物 } T_m = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 500/n$$

n=引物的长度, mol/L=缓冲液中盐的摩尔数, 一般是 0.047mol/L

按扩增后, 将切片放入 100%乙醇 3~5min, 以锐利刀片移除盖片, 将载片

放在 90℃ 热板上 30s, 应用 2×SSC 漂洗, 然后用生物素标记核酸探针进行杂交。载片在 95℃ 热板上 5min, 然后移入温盒, 48℃ 孵育 4h 或过夜。次日 PBS 漂洗, 以抗生物素标记 FITC 抗血清 (100μg/ml PBS pH7.2) 37℃ 孵育 1h, PBS 冲洗, 以甘油/PBS 溶液封片, 荧光显微镜观察。如生物素标记核酸探针的显示系统为过氧化物酶, 则应用 DAB/H₂O₂ 溶液显色, 常规光镜观察。这一技术不仅提高了病毒 HIV-1 的侦检率, 而且可用以确定细胞内携带的特殊基因, 遗传片段, 病毒和肿瘤的侵犯 (load) 等, 是一项颇具广阔应用前景的实验技术。

二、快速原位杂交细胞化学技术

原位杂交免疫细胞化学技术存在的难点之一是实验手续繁琐, 实验周期长。国外 Liesi 等 (1986) 和国内学者何彬等应用光敏生物素-链亲合素 (Biotin-streptavidin) 胶体金系统进行原位杂交, 得到了快速满意的结果, 全部实验可在数小时内完成。

作用把含某种多肽或蛋白的 cDNA 片段的质粒, 按照第十九章 在光照下标记光敏生物素, 然后经 DNA 酶消化 1h, 得到大量 100~500bp 长度的混合片段, 变性后用于原位杂交。

如为培养细胞或细胞涂片, 用 95%乙醇、5%乙醇固定 5min, PBS 冲去固定液, 加含探针的杂交液覆盖 (光敏生物素标记探针浓度为 2.5ng/μl), 在温盒中 50℃ 孵育 1~2h, 取出后直接加入胶体金标记链亲合素 (1mg/ml) 室温孵育 15min, 然后在室温或 37℃ 下用大容量 (200ml/每片) 洗脱液 (2×SSC, 0.1% Triton X-100) 分别冲洗 5~10min, 以银显影液放大金颗粒显示原位杂交结果, 可用 1%伊红复染, 脱水, 透明, 封片, 镜检。

如为冰冻切片 (cryostat section 10~15μm), 应经新鲜配制 4%多聚甲醛室温固定 15min, PBS 冲去固定液, 吸干后滴加蛋白酶 K (25μg/ml, Sigma) 37℃ 15min, 再用 4%多聚甲醛室温固定 20min, PBS 冲去多聚甲醛, 晾干后按上述方法进行原位杂交和杂交后冲洗。

三、原位启动标记法

原位启动标记法 (Primed in situ labelling, PRINS), 又叫寡核苷酸启动法 (Oligonucleotide-priming method) 是 Koch (1987) 首先提出的, 其基本原理是将未标记的寡核苷酸探针与细胞或组织中的靶 DNA 或 RNA 进行杂交, 然后

该寡核苷酸探针充当引物的作用，在 Klenow 多聚合酶的催化作用下，将生物素（或地高辛、荧光素）标记的核苷酸编入，以达到原位显示的目的。PRINS 技术具有 3 个方面的优点：首先由于探针在杂交时是未标记的，仅在杂交之后才进行标记，因此背景染色很低。至少，从理论上讲，背景染色几乎是零。其次是有效地缩短了实验的时间，由于探针未经标记，无增加背景染色的顾虑。因此，可增加探针尝试，缩短反应时间。杂交反应时间只需 1h。实验反应时间的缩短可有效的保持细胞或组织结构的完整性。第三个优点是能提高或增加信号的强度。Koch 等曾成功的将此方法应用于染色体制片、单层细胞涂片和组织切片。它们还将此法与流式细胞计相结合以达到检测群体离散细胞的目的。

在染色体或单层细胞涂片，载片在 70℃ 的溶液中变性（70% 甲酰胺，2×SSC）2min，立即在系统酒精中脱水（70%，80%，90%，95%，100%，V/V），用吹风机吹干。预孵育在 37℃~53℃ 20~30min，孵育时间加盖玻片，孵育液含 2~4pmol 寡核苷酸探针，dATP, dCTP, dGTP 各 10mmol, 5mmol 生物素-11-dUTP 在 25μl×NT 缓冲液中（1×NT 缓冲液含 50mmol/l Tris-HCl, pH7.2, 10mmol/L MgSO₄, 100μM 二硫苏糖醇(dithio threitol), 50μg/ml 牛血清白蛋白），在预孵育时加入 1μl 的 Klenow 多聚酶。应用 100ml 50mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl 在 65℃ 洗 1min 以终止反应，然后放入 100ml×BN 缓冲液（100mmol/l NaHCO₃, Ph8.0, 0.01% Nanidet P-40）40℃，进行检测系统的显示如荧光-亲合素标记，过氧化物酶-亲合素标记等。

总之，自 Gall 和 Pardue 1969 年建立杂交免疫细胞化学以来的 20 余年中，已有不少新的改良的方法出现，但基本原则仍为 Gall 和 Pardue 所建立的相仿。作者亲身体会是任何方法需在本人的实验实践中加以体验和改良。比如目前对乙酰基化作用，即浸入醋酸酐和三乙醇胺是否能减低背景染色的问题有作者对此提出异议。在科技工作者认为在原位杂交实验的所有应用溶液中加入 0.1%~0.2% 的二乙基焦碳酸乙酯（diethyl pyrocarbonate, DEPC）能有效的减低背景染色，但有些作者对此持怀疑态度。蛋白酶 K 的消化作用曾被认为是增加细胞或组织渗透性的关键步骤，但有作用在自身的实验室实践中体会除结构较致密的组织如脑、脊髓等外，对培养或涂片的单层细胞、蛋白酶 K 的消化及预杂交均是可以省略的。本文列举各作者的操作步骤略有不同，可能是基于这个原因。

目前，原位杂交技术主要应用于基因组图（Gene mapping），基因表达定位

(localization of gene expression), 核 DNA 和 RNA 的排列, mRNA 的排列和运输 (arrangement and transport of mRNA), 复制 (replication) 和细胞的分类 (sorting of cells)。临床研究应用在细胞遗传学 (Cytogenetics), 生前诊断 (Prenatal diagnosis), 肿瘤和传染性疾病的诊断, 生物学剂量测定 (biological dosimetry) 和病毒学的病原学诊断等。随着核酸探针的制备, 标记方法和基本操作方法的不断改进, 新的技术不断涌现, 相信在不久的将来, 原位杂交化学技术将会更广泛的被应用于各个学科, 并不断为生命科学提供新的资料, 开拓新的领域。

参考文献

1. Gall G & Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Nat Acad Science. U.S.A, 1969, 63: 378~381
2. Glaid, et al. The use of complementary RNA probes for the identification and localisation of peptide messenger RNA in diffuse neuroendocrine system. In: in situ hybridisation, Application to developmental biology and medicine Eds: N1 Narris and D.G Wilkinson, Cambridge University press, 1990, 43~68
3. Coulton G. Non-radioisotopic labels for in situ hybridization histochemistry: a histochemist's view. In: in situ hybridization, application to developmental biology and medicine. Eds: N1 Narris and Dg wilkinson, Cambridge university Press, 1990: PP1~32
4. Plak JM, Mcgee JOD (Eds). In situ hybridisation principles and practice. New York: Oxford University Press, 1991
5. Forster AC, et al. Non-radioactive hybridisation probes prepared by chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent photobiotin. Nucleic Acids Res, 1985; 3: 745 ~ 761
6. Bagasra O, et al. Polymerase Chain Reaction in situ: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. J. Immunological Methods, 1993; 158~145
7. Behringer M, et al. Biochemical. Neutron-activated in situ hybridisation application Manual, 1992

8. Cai WQ(蔡文琴), et al. In situ hybridisation of atrial natriuretic peptide mRNA in the endothelial cells of human umbilical vessels. *Histo — chemistry*, 1993;100:277 ~ 283
9. Koch J, et al. Oligonucleotide — priming methods for the chromosome — specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 1989;98:259 ~ 265
10. Barbara T, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridisation with DNA probes. In : *Flow cytometry* (Eds zbigniew Darzynkiewice and Harry A. Crissman) Academic press Inc, 1990;383 ~ 400
11. Liesi P, et al. Specific detection of neuronal cell bodies in situ hybridisation with a biotin — labelled neurofilament cDNA probe. *J. His — tochem Cytochem*, 1986 July;34(7):923 ~ 926
12. 正向华, 蔡文琴, 等. 用光敏生物素反意生长抑素(SS)cRNA 探针显示组织切片中 ss mRNA。 *解剖学杂志*, 1992, 15 (4): 312 ~ 313
13. 正向华, 张俐. 应用反意生长抑素 cRNA 探针原位杂交显示大鼠下丘脑生长抑素 mRNA。 *解剖学杂志*, 1990, 13(4): 307
14. 何彬, 等. 一种快速敏感的原位杂交方法。 *解剖学杂志*, 1992;15(4):312 ~ 313
15. 向正华, 蔡文琴, 等. 原位杂交组织化学与免疫组织化学结合法的研究。 *解剖学杂志*, 1993, 16:451 ~ 454