

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 2×5min。(转录 ISHH)
 - (14) 0.5% H_2O_2 PBS 室温 30min。
 - (15) 1%BSA 37℃, 30min 。
 - (16) 第一抗体, 4℃孵育 16~24h。
 - (17) PBS 冲洗 4×5min。
 - (18) 第二抗体 37℃, 1h。
 - (19) PBS 冲洗 3×5min。
 - (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% H_2O_2 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）1μg./ml 蛋白酶 K（0.1mol/l Tris -HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA 配），37℃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 0.25～0.5μg./ml。每一正常成年大鼠脑冠状切片 15μl 杂交液足够。43℃保温 12～16h。
- （10）4×SSc 37℃冲洗 30min。
- （11）2×SSC（含 RNasea 20μg/ml）37℃保温 30min。

- (12) 1×SSC 和 0.5×SSc 37℃分别冲洗 30min。
 - (13) 0.05mol/l PBS 冲洗 3×5min。
 - (14) 0.5%H₂O₂ 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℃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-吲哚磷酸 (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。