

以地戈辛标记反义 RNA 为探针的组织原位杂交

孙慧斌 丁小燕 宋秋宝

(中国科学院上海细胞生物研究所 200031)

原位分子杂交是在液相和固相分子杂交基础上发展起来的,从染色体、细胞或整体水平在原位研究特异核酸的分布、数量、表达形态及其同细胞的分化、生理或病理状态、形态特征演化之间关系的分子生物学技术^[1]。随着技术的发展,原位杂交不仅被用来研究特定 DNA、RNA 的细胞内的分布,而且被用来探索被检 mRNA 相关基因的表达。可以说,原位杂交技术在分子生物学与形态学研究之间架起了一座桥梁。

原位杂交的探针有 DNA 探针和 RNA 探针两种。目前所使用的探针绝大多数是 DNA 探针。由于转录得到的 RNA 探针长度高度一致,并且均为特异的单链,因此所有标记的 RNA 都参与杂交,而且不会复性。此外, DNA 探针还具有通透性好,结合稳定的优点。随着利用重组质粒上 SP6-和 T₇RNA 多聚酶启动子转录 RNA 以及寡核苷酸合成技术的进步,已有越来越多的原位杂交采用 RNA 探针^[2]。

原位杂交探针的标记可以用放射性同位素,也可用非放射性标记物。后者标记的探针虽灵敏度稍低,但因具有无放射性、保存时间长、操作比较方便等优点而受到重视和欢迎。

地戈辛-抗地戈辛免疫酶联显色是近年来开发应用的一种非放射性核酸标记检测技术^[3-5]。地戈辛(digoxigenin, dig)是一种固醇类物质。以连有地戈辛的核苷酸(如 dig-UTP)为前体合成并标记反义 RNA 探针(dig-antisense riboprobe),杂交后,细胞中具有互补序列的 mRNA 与反义 RNA 探针结合。后者又通过抗原-抗体作用而与带有碱性磷酸酶的抗地戈辛抗体(anti-dig-AP)连接。经显色反应,最终由碱性磷酸酶催化底物在杂交部位

产生的有色沉淀,形成了我们在原位杂交组织切片上看到的阳性反应。由于自然条件下地戈辛仅存在于洋地黄植物 *digitalis purpurea* 中,抗地戈辛抗体与动、植物组织不发生交叉反应或非特异反应,因此地戈辛-抗地戈辛核酸检测系统具有高度的专一性和可信性。

最近,我们参加了德国 Essen 大学 Grunz 教授在细胞所客座实验室进行的以地戈辛标记反义 RNA 为探针的组织切片原位杂交实验,取得较好的结果。现将主要实验步骤和工作体会报告如下。

一、实验步骤

1. 标记探针的制备

在我们的实验中,用于探针制备的模板已被克隆于 pSPT 18T₃ 启动子下游,这一重组质粒称为 pSPT₁₈ (24-10)。由该质粒转录产生的反义 RNA 探针能够与一种专一表达于神经组织中的 mRNA 互补结合。

在实验中,首先在插入片段 T₃ 启动子下游外侧具有单一酶切位点的 Xba I 酶切质粒使之线性化,然后纯化。

取 4 μl (1 μg) 线性化的质粒 DNA, 先后加入 4 μl 5×T₃RNA 多聚酶缓冲液, 2 μl NTP(ATP, CTP, GTP 各 10 mmol/L, UTP 6.5 mmol/L, dig-UTP 3.5 mmol/L, Boehringer), 1 μl T₃RNA 多聚酶(50 units/μl, BRL), 1 μl RNase 抑制剂(RNase inhibitor, 20 units/μl, Boehringer) 和 8 μl DEPC 处理过的重蒸水,使总体积至 20 μl。于 37℃ 下温育 2 小时后,加 2 μl 0.2 mol/L EDTA(pH 8.0)以终止反应,再加入 2.5 μl 4 M LiCl 及 75 μl 冷乙醇(-20℃),置 -20℃ 过夜。12000 g 离心后,再以 50 μl 冷 70% 乙醇(-20℃)离心洗沉淀 1 次。抽干干燥后,加入 100 μl DEPC 处理过的重

本文工作得到庄孝德教授的指导与支持,特此致谢。

蒸水。37℃下温育30分钟后,置-20℃保存备用。

根据有关资料,每 μg 模板DNA可转录合成全核苷酸序列的dig标记反义RNA 10 μg ,约占所有转录产物的90%。在新合成的反义RNA中,有约4—5%的核苷酸为dig-UTP。根据我们的经验,采用上述dig RNA标记方法,探针的转录和标记效率可以很好地满足原位杂交实验的需要。

2. 切片制备

以预冷的4%多聚甲醛固定组织,4℃,1.5小时。使用硅化过的载玻片,常规制备石蜡切片。切片厚约7 μm 。50℃烤片1—3天(≥ 24 小时)。

3. 预处理

二甲苯脱蜡,梯度乙醇过渡至重蒸水(经DEPC处理,下同)。然后,0.2 M HCl,20分钟 $\rightarrow$ 重蒸水洗,5分钟 $\rightarrow$ 2 $\times$ SSC,70℃,30分钟 $\rightarrow$ 重蒸水洗,5分钟 $\rightarrow$ 含蛋白酶K(终浓度:3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的TE(pH 7.5),37℃,10分钟 $\rightarrow$ 含0.2%甘氨酸的PBS和PBS各洗2次,每次1分钟 $\rightarrow$ 4%多聚甲醛,20分钟(后固定) $\rightarrow$ PBS洗,3分钟 $\rightarrow$ 1.5%乙酸酐/0.25 m mol/L三乙醇胺,10分钟(乙酸酐) $\rightarrow$ PBS洗,5分钟。

4. 预杂交

FDS-SPE溶液配制 在0.9 ml H_2O 中先后加入2.5 ml 去离子甲酰胺,1.25 ml 20 $\times$ SPE盐溶液(3 M NaCl/0.1 M PIPES/0.1 M EDTA, pH 6.87),0.25 ml 100 $\times$ Denhardt's,0.10% SDS,得5 ml FDS-SPE溶液。

预杂交液配制 在Eppendorf管中加入125 μl 鱼精DNA(10 mg/ml)/酵母tRNA(10 mg/ml)。煮沸5分钟,立即置冰上冷却。再加入4.875 ml FDS-SPE溶液,混匀,置4℃备用。

将预杂交液滴加到组织切片上,然后放置到盛有FDS-SPE溶液(其中的甲酰胺不必经过去离子处理)的湿盒中,50℃保温4—5小时。

5. 杂交

杂交液配制 在Eppendorf管中加入5 μl 地戈辛标记反义RNA,10 μl H_2O ,15 μl 去离子甲酰胺。95℃加热30秒后,立即置冰上冷却。加入470 μl 预杂交液,混匀。

以滤纸片小心吸去载玻片上的预杂交液,注意不要触及组织切片。将杂交液滴到切片上,加盖玻片后放入盛有FDS-SPE溶液的湿盒,置50℃温育过夜。

6. 核酸酶处理

将载玻片浸入4 $\times$ SSC,脱去盖玻片,再以4 $\times$

SSC洗4次,每次5分钟。

以40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的RNase A液滴片,37℃保温30分钟。再放入37℃预热的RNase缓冲液(含有0.5 mol/L NaCl的TE)中,保温30分钟。然后,用2 $\times$ SSC(50℃),0.1 $\times$ SSC(室温)各洗2次,每次15分钟。

7. 抗体结合

以TN(0.1 mol/L Tris·Cl, pH 7.5/0.15 mol/L NaCl)洗片5分钟。把含0.5%封闭剂(blocking reagent, Nucleic Acid Detection Kit——简称Kit, Boehringer)的TN滴加在切片上,在盛有TN的湿盒内室温下放置1小时。然后,用TN洗5分钟。

在切片上滴加碱性磷酸酶偶联的多克隆抗地戈辛Fab片段(anti-dig-AP,以含1%羊血清的TN按1:500稀释)。加盖玻片,置盛有TN的湿盒内室温下作用1.5小时。将载玻片浸入TN中脱去盖玻片,换注意经常液洗2次,每次10分钟。

8. 显色

由TNM(1:1的0.2 m mol/L Tris·Cl, pH 9.5/0.2 m mol/L NaCl和0.1 m mol/L MgCl_2 ,用前混合)洗片2次,每次2分钟。将每ml中含有0.24 g Levamisole,45 μl NBT,3.5 μl X-phosphate (Kit, Boehringer)的TNM,滴加到切片上,然后置于盛有TNM的湿盒内,避光,37℃保温3—5小时或室温下放置8—12小时。在镜下观察切片的颜色变化。

至需终止反应时,以TE洗片3次,每次5分钟。再经乙醇梯度脱水,二甲苯透明,最后以加拿大树胶封片。

9. 结果观察

在显色过程中,杂交阳性反应的颜色与显色时间和组织内靶信号的强弱有关。在一定范围内,随时间的增加,颜色逐渐由紫红向蓝紫色过渡。如标本制作得当,当作用到一定时间后,则颜色一般不再改变。此时,颜色的深浅只与靶信号的强弱有关,颜色越深,阳性反应越强。

在37℃保温条件下,一般经2小时左右,阳性反应区域呈棕黄色,至约5小时显深紫红色,然后变为蓝紫色。室温条件下,上述过程相应推迟。光镜下观察原位杂交组织切片,可见阳性反应区域呈现在浅黄色的背景下,对比清晰,反差明显,易于鉴别(见图版)。在高倍镜下,还可在强阳性部位观察到不规则的蓝色结晶。

二、几点体会

1. RNA的原位杂交,最重要的就是防止RNA酶污染。为此,我们的做法是:1)尽量采用一次性塑料制品;所有玻璃器材均经180℃,6小时以上烘烤。2)使用经DEPC(焦磷酸二酯)处理并以高压灭菌方式去除了DEPC的重蒸水;用这样的水配制除含Tris、三乙醇胺以外的各种溶液。3)耐高温高压的溶液要进行高压灭菌(酶);不能高压灭菌(酶)的则尽量使用新开封的试剂并以 $\phi=0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。4)在某些反应体系中加入RNA酶抑制剂。5)戴手套进行实验操作。此外,对于实验的切片刀、毛笔、剪、镊、药匙、滤纸等也分别采用乙醇或DEPC水浸洗、灼烧、高压灭菌(酶)等方式进行了处理。这些措施有效地防止了RNA酶污染,保证了实验成功。

2. 载玻片的处理十分重要。首先要选用新的载玻片;其次,载玻片的硅化质量一定要好。我们在实验中采用的硅化方法效果很好,介绍如下:1)将新的载玻片用洗涤剂彻底洗净,180℃烤6小时以上;2)将载玻片浸入含10%3-氨基丙基三乙氧基硅烷的甲苯,80—90℃保温1小时。然后以甲苯冲洗,室温下干燥过夜。3)以10%福尔马林室温下固定1小时。空气干燥后,密封于玻璃染缸中,4℃保存备用。

由于组织切片要经过一系列复杂的处理过程,因此切片脱落的问题比较突出。解决这一问题的关键是掌握好烤片的时间和温度。根据我们的体会,切片在42°—45℃下烘烤1—3天后,一般就不会出现脱片。

3. Levamisole是一种溶酶体磷酸酶的高效抑制剂。我们在实验中体会到,在显色过程中加入终浓度为0.1 mol/L的Levamisole对于抑制内源性磷酸酶效果很好;而在显色液中省去Levamisole则会使背景增高。此外,在anti-dig-AP作用前,以封闭剂处理样品也十分必要。实验中,在其它条件不变的情况下,经封闭剂处理的标本,本底低,效果好;而以TN代替封闭剂处理的标本则效果较差。关于anti-dig-AP的稀释度,根据我们的经验,采用1:500稀释的anti-dig-AP,不仅显色时间适中,而且背景低,反差好;用过度稀释的anti-dig-AP(如1:5000),则常因长时间显色导致背景颜色过深。

4. 在实验中,我们把阳性对照、阴性对照和实验材料三种组织制备在同一张载玻片上。这样不仅可以通过阳性对照来掌握每张片子的反应时间,而且能够排除由于技术原因造成的假阴性和假阳性,为正确分析实验结果提供更直接的依据。

此外,我们在杂交、抗体结合等步骤采用了将工作液滴到组织切片上,加盖玻片后置温盒温育的方法,起到了减少试剂消耗,保持工作液浓度稳定的作用。

参考文献

- [1] 任进余, 中华病理学杂志, 1991; 20: 67.
- [2] 丁濂, 中华病理学杂志, 1991; 20: 1.
- [3] Wolfson, B., et al., *Nature*, 1985; 315: 59.
- [4] Tautz, D. and C. Pfeifle., *Chromosoma*, 1989, 98: 81.
- [5] Hemmati-Barvanlou, A., et al., *Development*, 1990, 110: 325.

本刊自1993年起收受“技术与产品”介绍, 酌情收费, 欢迎来稿。

《细胞生物学杂志》编辑部

1992.12