

原位分子杂交技术的基本方法

原位杂交技术的基本方法包括：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)：包括放射自显影和非放射性标记的组织化学或免疫组织化学显色。

(一)固定

原位杂交固定的目的是为了保持细胞形态结构，最大限度地保存细胞内的 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 更易被酶降解，在 RNA 的定位上，如果要使 RNA 的降解减少到最低限度，取材后应尽快予以冷冻或固定。在解释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。

1.最常用多聚甲醛固定组织，因其不会与蛋白质产生广泛的交叉连接，不会影响探针穿透入细胞或组织。

2.醋酸酒精的混合液和 Bouin's 固定剂也能获得较满意的效果。

3.mRNA 的定位将组织固定于 4%多聚甲醛磷酸缓冲液中 1~2 h，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或振荡切片切片。

4.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 10 min，空气干燥后保存在-70℃。如冰箱温度恒定，在-70℃切片可保存数月之久不会影响杂交结果。在病理学活检取材时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联的增加，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满意效果。各种固定剂均有各自的优缺点，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联，从而大大地影响了核酸探针的穿透性。

(二)玻片和组织切片的处理

1.玻片的处理

玻片包括盖片和载玻片应用热肥皂水刷洗，自来水清洗干净后，置于清洁液中浸泡 24 h，清水洗净烘干，95%酒精中浸泡 24 h 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。

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，粘附效果较差。多聚赖氨酸液具有较好的粘附效果，但价格昂贵。一种新的粘附剂 APES 粘附效果好，价格较多聚赖氨酸便宜，制片后可长期保存应用。

2.增强组织的通透性和核酸探针的穿透性

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 X100、酒精或某些消化酶如蛋白酶 K，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 的保存量和影响组织结构的形态，因此，在用量及孵育时间上应填为掌握。蛋白酶 K(Proteinase K)的消化作用的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。一般应用蛋白酶 K 1μg/ml(于 0.1 mol/L Tris/50 mmol/L EDTA,pH8.0 缓冲液中)，37℃孵育 15~20 min，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。甘氨酸是蛋白酶 K 的抑制剂，常用 0.1 mol/L 的甘氨酸溶液(在 PBS 中)清洗以终止蛋白酶 K 的消化作用，Burns 等(1987)报道应用胃蛋白酶(Pepsin)20~100 µg/ml(用 0.1 N HCl 配)37℃、30 min 进行消化，所获实验结果优于蛋白酶 K。为保持组织结构，通常用 4%多聚甲醛再固定。

3.减低背景染色

背景染色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。在多聚甲醛固定后，浸入乙酸酐(acetic anhydride)和三乙醇胺(triethanolamine)中以减低静电效应，减少探针对组织的非特异性背景染色。

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。

在杂交后洗涤中采用低浓度的 RNA 酶溶液(20 µg/ml)洗涤一次，以减低残留的内源性的 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皿上均可能有 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，其最低温度必需在 150℃左右。

(三)杂交(Hybridisation)

杂交是将杂交液滴于切片组织上，加盖硅化的盖玻片，或采用无菌的蜡膜代替硅化的盖玻片，加盖片防止孵育过程中杂交液的蒸发。在盖玻片周围加液体石蜡封固或加橡皮泥封固。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使有限的杂交液均匀覆盖。可将复有硅化盖玻片进行杂交的载玻片放在盛有少量 5×SSC 或 2×SSC(standard saline citrate,SSC)溶液的湿盒中进行孵育。

(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。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。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。

(五)显示(Visualization)

显示又可分为检测系统(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。

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象分析仪对不同类型数量的核酸显色强度进行检测。但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至固定的间隔时间等。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)对照实验和结果的判断

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。

1.将 cDNA 或 cRNA 探针进行预杂交(吸收试验)。

2. 与非特异性(载体)序列和不相关探针杂交(置换试验)。
3. 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。
4. 以不加核酸探针杂交液进行杂交(空白试验)。
5. 组织对照用已知确定为阳性或阴性组织进行杂交对照。
6. 应用未标记探针做杂交进行对照。