

## RNA 原位杂交技术的一些应用技巧

林大河<sup>1</sup>, 叶文铎<sup>2</sup>, 唐清煌<sup>1</sup>

1. 福建师范大学 生命科学学院, 发育与神经生物学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350108;

2. 厦门大学 生命科学学院, 福建, 厦门 301005

[摘要] 目的: 检测基因在动物组织或细胞中的时空表达模式。方法: 转录反义 RNA 探针; 利用 RNA 原位杂交技术检测人和小鼠牙原基中若干基因的表达。结果与结论: 通过优化条件, 转录出完整的反义 RNA 探针, 并成功地利用 RNA 原位杂交技术在组织中检测到基因的表达; 分析了一些在 RNA 原位杂交的过程中可能碰到的问题及其解决方法。

[关键词] RNA 原位杂交; 基因表达

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

## The Application of In Situ Hybridization Technique with RNA Probes

LIN Da-he<sup>1</sup>, YE Wen-duo<sup>2</sup>, TANG Qing-huang<sup>1</sup>

1. The Higher Educational Key Laboratory of Fujian Province for Developmental Biology and Neurobiology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108; 2. College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] Objective: To detect the temporal and spatial expression patterns of gene in animal tissue. Methods: Anti-sense mRNA probes were transcribed and RNA in situ hybridization was performed to examine the expression pattern of genes in the developing mouse and human tooth germ. Results & Conclusions: The anti-sense probes were transcribed completely and the gene expression were detected successfully. Some problems concerned in the process were analyzed, and the methods how to resolve it base on our past experiences were given.

[Key words] RNA in situ hybridization; gene expression

研究基因的表达模式是探索其功能的重要环节之一。利用 Northern 杂交可以说明特定基因在不同器官、不同时期的表达情况, 但是若要在显微或亚显微水平对基因的时空表达模式进行研究, 单靠 Northern 杂交就显然不够了, 而根据核酸分子杂交的基本原理和免疫组织化学的方法而发展起来的 RNA 原位杂交技术 (in situ hybridization, ISH)<sup>[1-3]</sup> 为此提供了行之有效的解决途径。

RNA 原位杂交经常被用于检测动物或植物组织中某种特定基因的 mRNA 的分布状况<sup>[1,2]</sup>, 以了解该基因的表达模式。RNA 原位杂交主要是利用碱基互补原理, 将体外合成的带有标记的单链反义 mRNA<sup>[4]</sup> 与组织或细胞中特定基因的 mRNA 发生杂交, 从而将反义探针定位在特定基因的表达区域内。探针上所带的标记可分为 2 种, 即非放射性的地高辛 (DIG) 和生物素 (BIO) 或带有放射性的同位素 (<sup>32</sup>P)。带有放射性同位素的探针在杂交后即可直接通过放射自显影来确定该特定基因的表达区域; 带有非放射性标记的探针还需通过酶促免疫显色或免疫荧光反应来定位特定基因的 mRNA 在组织或细胞中的分布位置。以非放射性的 DIG 为标记的 RNA 原位杂交为例: 当体外转录的反义 mRNA 探针与组织中的天然 mRNA 杂交后, 带有碱性磷酸酶 (AP) 的抗 DIG 抗体特异性地结合探针上的 DIG 标记, 从而将带有 AP 的抗 DIG 抗体定位于特定基因的 mRNA 分布区域内; 而后加入 AP 的无色底物, 底物在 AP 的作用下变为有色沉淀沉积在相应区域, 从而将看不见的信号转变为可见。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人、昆明小鼠的组织标本均取自各自相应时期的胚胎。DEPC 购自 BBI 公司; 转录探针所需试剂、酶、DIG 抗体均购自 Roche 公司; 左旋咪唑购自 Sigma 公司; 其他试剂、药品采用国产分析纯产品。

### 1.2 反义 RNA 探针的制备

提取相应质粒, 酶切线性化后作为模板 DNA 用于转录。以 T7 RNA 聚合酶的转录体系为例: 模板 DNA 总量约 1 μg, 10×缓冲液 2 μL, 10×DIG RNA 标记混合液 2 μL, RNase 抑制剂 0.5 μL (20 个活性单位), T7 RNA 聚合酶 2 μL (40 个活性单位), 用去 RNA 酶的水补足至 20 μL。混匀后 36 反应 2 h。用 LiCl 沉淀探针, 用 70% 的酒精洗涤后晾干, 用 50 μL 去 RNA 酶的水溶解 RNA 探针沉淀。通过 RNA 电泳检测探针大小、质量。

### 1.3 材料的固定、包埋、切片

固定动物材料的固定液采用 4% 的多聚甲醛, 4 固定过夜。梯度酒精脱水程序为: 35% 酒精 1 次, 50% 酒精 1 次, 70% 酒精 1 次, 90% 酒精 1 次, 100% 酒精 2 次, 1/2 酒精+1/2 二甲苯 1 次,

[收稿日期] 2006-10-30

[基金项目] 福建省科技项目 (20021006, C0320002)

[作者简介] 林大河 (1981-), 男, 硕士研究生,  
(E-mail) daidzin@hotmail.com

二甲苯 1 次, 1/2 二甲苯+1/2 石蜡 1 次, 石蜡 3 次。包埋。每张石蜡组织切片厚度为 5~10  $\mu\text{m}$ 。

#### 1.4 RNA 原位杂交

1.4.1 预杂交和杂交 石蜡组织切片须经脱蜡, 梯度酒精复水, 经蛋白酶 K 消化 2 min, 用甘氨酸封阻蛋白酶 K 活性, 用 0.2 mol/L 的 HCl 与乙酰酐共同作用后再加入制备好的探针。探针浓度应为 2~6 ng/ $\mu\text{L}$ <sup>[9]</sup>, 杂交温度一般设置为 61 。

1.4.2 洗去多余探针以及抗体的结合 于 65 用 5 $\times$ SSC 洗去部分多余探针, 于 45 用 50% 的甲酰胺洗脱, 用 RNaseA 和 RNaseT 于 37 消化多余探针。用胎牛血清结合 2% 封闭液封闭内源性的抗体结合位点, 最后加入抗 DIG 抗体, 放置 4 过夜。

1.4.3 洗去多余抗体 配制含有 0.1 mol/L NaCl、0.1 mol/L Tris-HCl (pH9.5)、0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1% Tween-20 的洗脱液 500 mL, 分 10 次洗去多余抗体, 每次 1 h, 第 9、10 次洗脱液中应含有 0.2 mol/L 的左旋咪唑。

1.4.4 加入显色液观察、封片 加入氮蓝四唑(NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸(BCIP)作为显色液, 避光、4 显色, 每 0.5 h 观察 1 次, 直至显色完全。直接将切片投入梯度酒精中终止显色反应, 封片观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反义 RNA 探针的制备

RNase 在自然界中广泛存在, 且十分稳定, 不易变性, 所以用于转录的各种一次性塑料制品(离心管、枪头等)均须在 60 或以上的高温中放置至少 1 周, 或用混合了 DEPC 的高纯水浸泡至少 12 h 再灭菌、烘干后方可使用; 玻璃及铁制器皿均须在 200 烘烤至少 2 h, 以去尽 RNase。反义 RNA 探针的制备直接关系到原位杂交结果的好坏, 可以通过 RNA 电泳来检测合成的探针质量。在排除了是由于操作等因素导致的 RNA 大量降解外, 如果电泳时出现拖带或条带模糊的情况(参见图 1), 有可能是因为合成时温度过高导致 RNA 聚合酶从模板 DNA 上脱落, 从而出现大量的不足预定长度的 RNA 探针, 尤其是长度较长的 RNA 探针(如 600 bp 以上)。一般 RNA 聚合酶使用说明书的推荐温度为 37, 但转录时 36 似乎更好(参见图 1), 或还可进一步降低。如果产生大量的不足预定长度的 RNA 探针, 很可能造

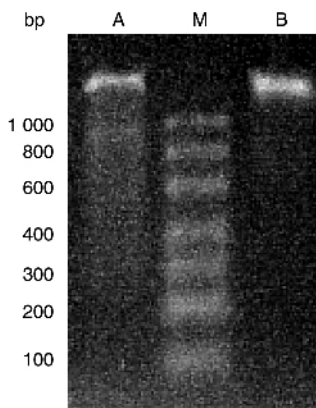


图 1 不同温度下转录的同种 RNA 探针的电泳图谱  
A、B 泳道探针均为人源 Bmp4 探针, 约 1 300 bp; M 泳道为 RNA Marker。A 道中的探针转录温度为 37, 可见比较明显的拖带现象; 而 B 道中的探针转录温度为 36, 拖带现象减轻许多

成杂交时强烈的背景噪声。转录时模板 DNA 的一次性用量一般都在 1  $\mu\text{g}$  左右, 这与转录出的探针的总量直接相关, 而与酶量及所加入的 rNTP 量关系不大。模板 DNA 的一次性用量少于 500 ng 很可能导致转录后电泳检测不到条带或条带暗淡, 一次性用量超过 1  $\mu\text{g}$  太多也不好。

### 2.2 材料的固定、包埋及切片

在动物材料的固定、包埋及切片过程中, 固定液多采用 4% 的多聚甲醛(PFA), 因为多聚甲醛可以较好地交联蛋白质及 RNA, 且渗透性好。应注意, 由于多聚甲醛在高温下会降解为甲醛, 故配置时不能高温灭菌, 这就意味着溶解多聚甲醛粉末的 1 $\times$  PBS 应先做去 RNA 酶处理, 并且固定液的最佳 pH 值应为 7.2~7.4, 过高或过低均会导致所固定组织中 RNA 的降解, 使得杂交实验失败。用 4% 的多聚甲醛固定时一般需要过夜(12 h 左右), 如固定时间过长, 由于 RNA 结合了过多的多聚甲醛, 将会导致杂交信号偏弱, 甚至检测不到信号。

用梯度酒精脱水时, 各步骤持续时间视组织块大小而定, 如直径 1 cm 的组织块每步可用时 30 min, 越小的组织块用时可以越少(但不少于 10 min), 大的用时可适当延长, 70% 酒精这一步相对其他各步可适当延长脱水时间, 有利于彻底脱水。在 100% 二甲苯中透明的持续时间根据肉眼观察而定, 一般组织边缘变透明、模糊不清时就可以了。在 1/2 石蜡+1/2 二甲苯这一步, 持续时间一般只需 10 min 或更短, 不宜过长, 否则会导致切片时由于组织过硬而掉片。

切片的厚度为 5~12  $\mu\text{m}$ , 厚度越厚, 杂交时蛋白酶 K 消化的时间越长, 10  $\mu\text{m}$  厚的切片用 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白酶 K 消化 2 min 即可, 如消化 5 min 组织就会被消化出很多空洞。烤好的切片可以短期储存于 -20 (至少 1 个月)。

### 2.3 杂交

杂交时所加的探针浓度应为 2~6 ng/ $\mu\text{L}$ , 杂交温度一般为 55~70 (视探针长度而定, 500 bp 左右杂交温度一般为 60~64, 也可以提高到 68)。设计的探针的特异性十分关键, 探针宁可短些也要保证足够的特异性。实验中利用小鼠及人类的各自牙本质涎磷蛋白(DSPP)mRNA 序列设计了 2 种探针, 用于鉴别小鼠与人的嵌合体牙齿中不同来源的细胞(DSPP 只在分泌牙本质的成牙本质细胞中表达)。当杂交温度为 61 时, 利用小鼠 Dspp 的特异性探针, 在小鼠及人的成牙本质细胞中均检测到明显的信号(图 2B), 经过比对发现, 这是由于设计的小鼠 Dspp 的特异性探针与人源 Dspp mRNA 序列约有 150 bp 相匹配(小鼠 Dspp 的特异性探针长度为 459 bp)所致; 后来将杂交温度提高到 68, 在人成牙本质细胞中的信号消失了(图 2C), 而在小鼠成牙本质细胞中的信号未见明显减弱(图 2A)。长探针(1 300 bp 左右)的杂交温度可以高些, 一般为 62~69。杂交的时间一般都需要过夜。

### 2.4 杂交后处理

杂交前的所有步骤均须做严格的去 RNase 处理, 杂交后处理是为了除去多余的探针, 避免抗体结合多余探针而导致出现非特异性背景, 为了达到这个目的还会加入 RNaseA 和 RNaseT 以消化单链的探针(RNaseA 和 RNaseT 在 [Na<sup>+</sup>] 0.3 mol/L 时, 特异性地只降解单链 RNA, 而不会降解双链 RNA)。以 DIG 标记探针为例, 在抗 DIG 抗体免疫反应过程中, 胎牛血清、正常绵羊血清和正常兔血清均能起到封闭作用。我们的做法是将胎牛血

清结合 2%封闭溶液[将 2 g 封闭试剂(Roche 公司)溶于 100 mL MBST 中]来共同封闭。抗体加好后需放置 4 过夜,以便免疫反应完全。

洗脱多余抗体也需在高[Na<sup>+</sup>](0.3 mol/L)的条件下进行,封闭哺乳动物内源性的碱性磷酸酶可以用左旋咪唑,反应浓度为 0.2 mol/L。

在显色过程中发现,只需大约 12 h,整张片子就都被染成深蓝色,这很可能是由于反义探针发生降解,导致出现大量短片段 RNA,短片段 RNA 与组织中其他 mRNA 发生杂交,出现强烈背景(图 3)。这时只要重新转录探针后杂交即可(数据未显示)。出现上述情况还有一种可能,就是由于固定液(4% PFA)的 pH 值过酸或过碱导致组织中的 mRNA 被不完全降解成许多短片段,于是特异性大大下降,致使背景强烈。我们发现,避光于 4 放置 48 h 若还未观察到明显的信号,一般就不会出现信号了,这可能是由于待检测基因未表达,也可能是由于探针完全降解,虽然染色时间长了(1 周)也会在组织的所有细胞中观察到有色素沉淀,但那是因为显色液浸泡时间过长都会发生的现象。

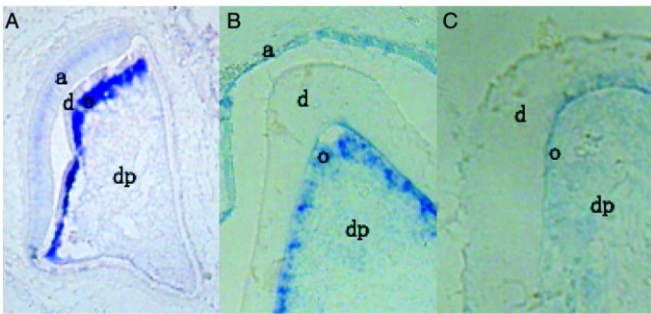


图 2 不同杂交温度对探针特异性结合的影响

图 A 中的组织为 E19.5 昆明鼠胚胎的切牙牙胚;图 B、C 中的组织为 16 周的人胚胎磨牙牙胚。B 图,当杂交温度为 61 时,利用小鼠 Dspp 探针在人成牙本质细胞中检测到信号,该信号是由于小鼠 Dspp 探针与人 Dspp 的 mRNA 序列有 150 bp 的匹配所致。当提高杂交温度到 68 后,在人成牙本质细胞中的信号消失了(图 C),而在小鼠成牙本质细胞中的信号仍然强烈(图 A)。a: 成釉质细胞; d: 牙本质; o: 成牙本质细胞; dp: 牙乳头

在实验过程中,如何判断显色后的切片是背景色还是特异性的显色,这是一个比较麻烦的问题。我们认为,做正义的 mRNA 探针,对研究在一个组织中不明基因的表达是有必要的,

就是说设置对照是很重要的。若没有对照,又想要判断是否有特异性表达,可以根据有信号区域和没有信号区域的各个细胞的细胞质中色素沉淀的情况而定,而不能根据切片中区域颜色的深浅来判断,因为各个区域的细胞密度是不同的,虽然可能细胞的细胞质中色素沉淀是一样的,但由于某个区域细胞密集,所以看起来颜色就比其他区域颜色深,导致出现假阳性。

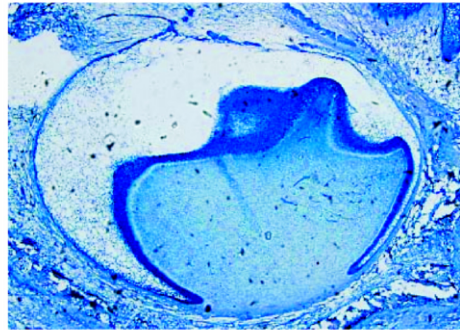


图 3 完全呈现背景色的杂交结果

采用人源 Bmp4 特异性探针检测 Bmp4 在人 14 周磨牙上的表达情况,由于探针发生降解导致最后出现非特异性显色

#### 参考文献

- [1] Gall JG, Pardue HL. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1969,63:378
- [2] John HA, Birstiel ML, Jones KW, 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level[J]. Nature, 1969,223:582
- [3] Zhang YD, Zhang Z, Zhao X, et al. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ[J]. Development, 2000, 127(7):1431
- [4] 苏慧慈. 原位杂交[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 31-52
- [5] Cox KH, De Leon DV, Angerer LM, et al. Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes[J]. Dev Bio, 1984,101:484