

· 技术交流 ·

介绍一种不加盖玻片的核酸原位杂交改良法

吴惠茜 邵建永 林汉良

(病理学教研室)

提 要 核酸原位杂交程序中探针和靶基因的加热变性和杂交为整个程序中最重要的一环,目前国内外最常用的方法是在切片上滴加 DNA 探针溶液后用盖玻片复盖组织,并加胶泥或其他封固剂封闭玻片四周,变性杂交后需拆除盖玻片,这一操作过程易损坏组织切片或出现干片、脱片。作者针对上述情况,对传统的核酸原位杂交方法中的部分程序加以改良,采用不加盖玻片直接在蒸汽中变性方法,经多次实验证明此方法稳定、可靠、简便,结果满意。

关键词 核酸;原位杂交;人乳头瘤病毒

中图分类号 R-361

核酸原位杂交技术作为分子病理学的一种新方法,近年来得到广泛的开展和应用,不但可应用于冰冻切片,而且可应用于石蜡切片。核酸原位杂交程序主要有 3 个步骤:①切片组织内靶基因的暴露;②核酸探针和靶基因的加热变性和杂交;③杂交后检测显色。其中第二步骤为整个程序中最重要的一环,为了保证 DNA 探针和靶基因的充分变性和杂交,目前国内外常用的方法是在切片上滴加 DNA 探针溶液后用盖玻片复盖组织,并用胶泥或其他封固剂封闭四周,然后将切片加热变性,再移入 37℃ 温箱内杂交,杂交后需拆除盖玻片转入检测显色步骤。封固及拆除盖玻片过程不仅繁琐、费时,操作失误还可能会损坏组织切片或出现脱片。作者对传统的原位杂交中的部分程序加以改良,采用不加盖玻片的方法进行杂交变性,经 1 年来多次实验证明此方法稳定、简便、结果良好。

材料与方 法

材 料 ①生物素标记的广谱 HPV-DNA 杂交试剂盒 (DAKO K 602)。②HPV 原位杂交试剂盒和 HPV-DNA 探针试剂盒 (生物素标记) 均为美国 Life Technologies Inc 产品。

③蛋白酶 BP (江苏无锡酶制品厂)。④37℃, 48℃, 100℃ 水浴箱各 1 个。

原位杂交操作步骤 ①常规石蜡切片, 60℃ 烘片 30~60 min; ②二甲苯脱蜡 5 min 2 次; ③无水酒精洗 1 min 2 次; ④95% 酒精洗 1 min 2 次; ⑤蒸馏水洗 3 min; ⑥0.01% 蛋白酶 BP 消化组织片 10~15 min; ⑦TBS 洗 5 min; ⑧在切片上滴加 DNA 探针溶液, 将切片放置在一个密闭的容器内 (图 1)。容器底部应预先加入适量水并加热至 100℃。盖紧容器外盖, 继续加热使水煮沸, 让切片在饱和蒸气浴中加热变性 5 min; ⑨变性完毕将切片移入 37℃ 温箱内杂交 1 h; ⑩TBS 洗 5 min; ⑪切片放入预热 48℃ 的洗涤液中 30 min; ⑫TBS 洗 5 min; ⑬加入碱性磷酸酶标记的链菌素 (streptavidin alkaline phosphatase conjugated) 溶液, 室温孵育 20 min; ⑭TBS 洗 5 min; ⑮滴入 BCIP/NBT (5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐和氮蓝四唑混合液) 室温暗处显色 10~60 min; ⑯蒸馏水洗 5 min; ⑰0.1% 核固红复染切片 5 min; ⑱酒精脱水, 中性树脂封片。

结 果 与 讨 论

核酸原位杂交阳性反应为靶基因存在的部



图1 DNA 变性用水浴箱

位, 一般为细胞核内(图2), 呈蓝色颗粒状, 若靶基因数量多或显色时间长, 则整个细胞核呈一片蓝色, 阴性细胞核呈红色。

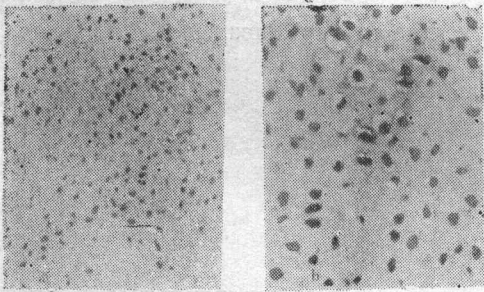


图2 改良核酸原位杂交法显示 HPV-DNA 人乳头瘤病毒DNA (HPV-DNA) 阳性反应见于细胞核内
左: 低倍×50 右: 高倍×200

传统的核酸原位杂交方法, 由于实验所用的烘箱温度高而干燥, 在变性时探针液易蒸发干片, 所以在杂交前先加上盖玻片, 再以胶泥

封固盖玻片四周。杂交后揭去胶泥和盖玻片, 这一操作易导致组织脱落及损坏, 曾有文献报道脱片率达50%^[1]。本文成功地使用不加盖玻片, 用蒸气浴变性的方法, 制片160例, 无一切片在变性杂交过程中干片或脱片, 均获得十分满意的结果, 不仅简化了杂交的程序, 更重要的是解决了干片、脱片等问题, 大大提高了杂交的成功率和杂交结果的质量。

为保证组织切片上的DNA探针液在不加盖玻片情况下, 在变性和杂交过程中不干涸, 必须注意: ①用于加热变性的容器空间不宜太大, 容器内的水蒸汽才能迅速饱和, 从而使探针液不会蒸发; ②容器外盖必须密闭, 使容器内的水蒸汽不会溢出或仅少量溢出; ③变性时可间断加温, 使水蒸汽保持在90℃以上。

参 考 文 献

1. Holloway RW, et al. Identification of RW, human papilloma virus type 16 in primary and recurrent cervical cancer following radiation therapy. *Gynecol Oncol* 1991; 41:123
2. Gall JF, Pavdne ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63:378
3. Graham AK, et al. Simultaneous in situ genotyping and phenotyping of human papillomavirus cervical lesions: Comparative sensitivity and specificity. *J Clin Pathol* 1991; 44:96

(1992-09-01收稿 1992-12-29修回)

A MODIFIED METHOD FOR HYBRIDIZATION IN SITU

Wu Huixi Shao Jianyong Lin Hanliang

(Department of Pathology)

The most critical step in the procedure of hybridization *in situ* is denaturation by the heating and hybridization of the probe and the target gene. The conventional method for denaturation includes covering the probe solution with a coverslip, the edge of which is sealed by clay or other adhesive, and then heated. The tissue sections are often damaged, dried or dislocated in the process of this step. In this paper a modified method for the step of denaturation of hybridization *in situ* is introduced. The probe solution is directly heated in a steam bath with no coverslip. The modified method is stable, simple, and reliable, and the effect is satisfactory in our experiences.

Key words nuclear acid; hybridization *in situ*; human papillomavirus



· 简 讯 ·

中澳脊柱外科研讨会暨讲习班在孙逸仙纪念医院举行

Torode 和 Turnes 两位澳大利亚脊柱外科专家从 1993 年 2 月 13 日至 3 月 11 日来孙逸仙纪念医院进行了为期约 1 个月的学术交流。在此期间与我省脊柱外科专家及来自各地医院的 50 多位医生举行了研讨会及一系列的讲座。与会澳大利亚专家示范了 C—D 棒与 Zielke 链矫治脊柱侧弯的新技术。C—D 棒是由法国医生 Cotrel 和 Dubousset 所发明。自 1984 年发表了他们的论文之后,引起了骨科界的极大反响。这一技术的优点是能够矫正脊柱侧弯的三维畸形,而且固定牢固,病人术后 1 周就可以下床活动。过去常规应用 Harrington 或 Luque 棒都只能矫正脊柱弯的一维或二维畸形。病人术后要求 1~3 个月的卧床休息及带支架

下床活动。C—D 棒技术无疑比 Harrington 和 Luque 棒都有明显的优点。但是,由于 C—D 棒技术操作困难,手术器械又昂贵,国内只有北京、上海等少数医院开展这一手术。这次澳洲专家来访,首次在我省开展此项手术。从已手术的 10 多例患者近期结果观察,此手术效果令人满意。Zielke 链是 70 年代末发展起来的前路矫正脊柱侧弯技术。目前应用 Zielke 加 C—D 技术能更有效地矫正脊柱侧弯。本次中澳脊柱外科研讨会暨讲习班取得了圆满的成功,这与医大领导的重视和医院各级人员的努力工作是分不开的,它将推动我院、我省脊柱外科的迅速发展。

(刘尚礼)