

原位杂交技术在培养细胞冰冻切片和石蜡片切中的应用

李锦添

(肿瘤研究所)

罗国炜 吴懿德 潘慧仙 李川军

(香港中文大学病理解剖和细胞学系)

提 要 本实验详细地探讨了原位杂交技术的有关问题:生物素标记 DNA 探针的制备,各类来源标本的制备,杂交前、中、后细胞组织切片的处理等;并把缺口翻译法合成的生物素化EB病毒DNA探针应用于检测培养细胞,冰冻和石蜡切片中EB病毒Bam HI-W重复片断DNA序列。实验结果表明:自制的EB病毒DNA探针完全可靠;所采用的一套原位杂交技术适用于检测上述三类不同的标本,其检测的结果是满意的。

关键词 原位杂交;生物素化DNA探针;EB病毒Bam HI-W片断DNA

中图分类号 Q 26

随着分子生物学的发展,在 Southern blot, northern blot 和 dot blot 等分子杂交技术基础上建立了原位杂交技术(in situ hybridization)^[1,2]。原位杂交技术具有高度的准确性和敏感性^[2,3]:它能在细胞甚至亚细胞的水平上定位特异性核酸分子序列,若材料少至几个细胞,亦能进行检测。因而,这一技术是目前研究病毒学、基因遗传学、细胞和组织病理学等方面的重要手段^[4]。尤在病理学方面,它使形态学科进一步与分子生物学相结合,为研究疾病的发生机理、探讨肿瘤的组织来源和分化程度等开拓了新的领域。本实验详细地探讨了原位杂交技术的有关问题:生物素标记 DNA 探针的制备,各类来源标本的制备,杂交前、中、后细胞组织切片的处理等,从而确立了一套完整可行的原位杂交技术程序;把这一技术程序应用于检测培养细胞、冰冻和石蜡切片的EB病毒(EBV) Bam HI-W 重复片断 DNA 序列,为今后对细胞和组织病理学的深入研究打下基础。

材料与方法

材料来源 培养细胞为 Raji 细胞(EBV-

DNA 阳性)和 cC₃ 细胞(EBV-DNA 阴性)。冰冻和石蜡切片均为人类鼻咽癌接种于无胸腺小鼠皮下的移植性肿瘤组织(xeno-666)(EBV-DNA 阳性)和正常无胸腺小鼠肝脏组织(EBV-DNA 阴性)。

载玻片和盖玻片的处理^[5,6]

1. 载玻片 洗净、烤干后,浸泡于含1×Denhardt 液的3×SSC液体中,65℃,3小时;蒸馏水短速漂洗后,以3:1乙醇和冰醋酸混合液固定,室温,20分钟;自然干燥后,载玻片在含 histostik 的蒸馏水中摇荡浸泡,室温,5分钟;自然干燥后放于无尘容器中室温或4℃保存。载玻片亦可用1g/L多聚赖氨酸(MW>70 000)处理。

2. 盖玻片 洗净后以95%乙醇、1:1的乙醇和丙酮混合液分别处理,65℃烤干,再浸蘸 Sigmacote (Sigma 出品),在180℃烤箱中停留3小时后,放置无尘容器中室温保存。

各种标本的制备

1. 培养细胞 以1800r/min离心,除去上清液,PBS 缓冲液清洗沉淀细胞及稀释成适当浓度的细胞悬液,滴于上述处理的载玻片上;自然干燥后锡纸包好,放置-20℃冰箱保

存,用前固定,或固定后再保存。

2. 冰冻切片 新鲜标本块以 O.C.T. 包埋剂包埋,经液态氮速冻后再用锡纸包好,在 -70°C 以下保存;或速冻后即低温冰冻切成 $5\mu\text{m}$ 厚的组织片,贴于处理过的载玻片上;自然干燥后锡纸包好,低温保存;或固定后再保存。

以上两种标本所制备的玻片均以新鲜配制的 40g/L 多聚甲醛液固定,室温,20分钟;PBS 漂洗2次,每次10分钟,逐级乙醇脱水,自然干燥后备用。

3. 石蜡切片 新鲜标本块以中性磷酸盐缓冲福尔马林液固定,常规脱水,石蜡包埋后切成 $5\mu\text{m}$ 厚的组织片,贴于处理过的载玻片上,自然干燥后放在 60°C 烤箱中停留4小时以上;二甲苯脱蜡3次,每次10分钟,最后浸于无水乙醇中5分钟,自然干燥备用。

生物素化DNA探针的制备

1. EBV-DNA 探针以 B95-8 细胞中 EBV 的 Bam HI-W 重复片断 (3.2kb) 为模板,采用缺口翻译系统 (nick translation system) 试剂盒 (BRL 8160 SB) 制成 (方法按说明书)。生物素标记部位为 7-dATP ;合成的 EBV-DNA 探针以 Centricon-30 微量离心浓缩器 (Amicon 出品) 分离提纯, 8000 r/min , 4°C , 30分钟。最后以 TE 溶液稀释 EBV-DNA 探针,使最终浓度成 $100\mu\text{g/ml}$ 。

2. 阴性对照探针 pBR322 的制备方法、最终浓度与 EBV-DNA 探针同。

杂交混合液的配制^[3,5,7] 各种溶液的制备均需按核酸分子杂交的要求处理。

A 液 EBV-DNA 探针 (或 pBR322) 和鲑精 DNA, 两者最终浓度分别为 $4\mu\text{g/ml}$ 和 $400\mu\text{g/ml}$, 混匀后于 100°C 水浴中煮沸10分钟,速放于冰粒中降温。

B 液 $20\times\text{SSPE}$ 、 2.2 mol/L 甲酰胺、 1 mol/L 硫酸葡聚糖, $100\times\text{Denhardt}$ 和 0.35 mol/L 硫酸十二烷基钠 (SDS), 它们的最终浓度分别为 $5\times$ 、 1.1 mol/L 、 0.1 mol/L 、 $1\times$ 和 3.5 mol/L , 以双蒸水补足总量,混匀。杂交前, A、B 液充分混匀。

本实验还以 EBP-836 (NZM biochem Inc. 出品) 作为标准的阳性探针对照。杂交混合液的配制方法同上,仅探针浓度改为 $2\mu\text{g/ml}$ 。

杂交前的处理^[3,5] 经制备好的细胞或组织切片以蛋白酶 K (Sigma 出品) 消化,酶浓度为 $0.025\sim 0.05\text{ mg/ml}$, 37°C , 孵育10分钟,用含 2 mg/ml 甘氨酸的 PBS 中止消化; 40 g/L 多聚甲醛后固定,室温,10分钟;PBS 漂洗,逐级乙醇脱水,自然干燥后放置 60°C 烤箱中过夜。

原位杂交 经杂交前处理的材料,根据细胞或组织片的大小,加入适量的杂交混合液,以处理过的盖玻片盖封,并以橡胶泥密封盖玻片四周。玻片于 92°C 加热10分钟,转至 42°C 恒温箱中孵育过夜。

杂交后清洗 除去盖玻片及橡胶泥,玻片以下述液体顺次振洗: $2\times\text{SSC}$, 室温,15分钟;含 3.5 mol/L SDS 的 $2\times\text{SSC}$, 室温,15分钟;含 3.5 mol/L SDS 的 $0.1\times\text{SSC}$, 60°C , 30分钟,2次; $0.1\times\text{SSC}$, 室温,15分钟。

杂交结果的显示^[7] 清洗后的玻片用缓冲液1,即 0.1 mol/L Tris (pH7.5), 0.15 mol/L NaCl 振洗,室温,5分钟;用缓冲液2 (即于缓冲液1中加入 30 g/L BSA) 孵育, 65°C , 1小时;除去多余液体,用 $1.0\mu\text{g/ml}$ 链激卵白素-碱性磷酸酶 (BRL 出品) 孵育,室温,10分钟,2次;用缓冲液3,即 0.1 mol/L Tris (pH9.5), 0.1 mol/L NaCl, 50 mol/L MgCl_2 振洗,室温,10分钟,再用新鲜配制的 NBT (氮蓝四唑) 和 BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐) 显色液 (两者最终浓度分别为 0.33 ng/ml 和 0.165 ng/ml) 避光孵育,室温,30分钟~3小时,示显色情况而定。

显色后,用含 0.5 mol/L EDTA 的 20 mol/L Tris (pH7.5) 溶液中止显色反应,蒸馏水振洗干净, 2 g/L 亮绿醋酸溶液复染5分钟,甘油缓冲液 (pH9.0) 或甘油明胶封片,镜下观察。

结 果

培养细胞 以自制的生物素标记 EBV-DNA 探针检测 Raji 细胞, 镜下见大多数细胞显示丰富的紫蓝色粗颗粒(图 1); 与标准的 EBP-836 探针相比, 自制 EBV-DNA 探针浓度为 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 所显示的阳性强度及颗粒形态与 EBP-836 探针浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(图 2)相似。以自制 pBR322 探针检测 Raji 细胞及以自制 EBV-DNA 探针检测 cC_3 细胞, 均未见阳性反应。

冰冻切片 以自制 EBV-DNA 探针检测 xeno-666 冰冻切片, 癌细胞内普遍存在数量不等的粉生状或微粒状紫蓝色颗粒, 其中部分癌细胞内还有数量较少的粗颗粒, 而间质部分未见明显的阳性颗粒(图 3)。以自制 pBR322 探针检测上述肿瘤组织及以自制 EBV-DNA 探针检测正常无胸腺小鼠肝脏, 均未见阳性反应。

石蜡切片 以自制 EBV-DNA 探针检测 xeno-666 石蜡切片, 多数癌细胞内见 1 至少数几粒紫黑色粗颗粒(图 4)。与冰冻切片的阳性结果比较, 石蜡切片阳性颗粒较粗大显眼, 但颗粒数量明显减少; 此外, 石蜡切片的组织形态比冰冻切片完整、易观察。以自制 pBR322 探针检测上述肿瘤石蜡切片时, 未见阳性反应。

讨 论

本实验把自制 EBV-DNA 探针与标准的 EBP-836 相比较, 探针浓度为 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 无论阳性颗粒的数量及反应强度等方面均相似, 且背景更清晰; 以 pBR322 探针及不含 EBV-DNA 的细胞和组织作阴性对照, 未见假阳性。说明自制探针完全可靠, 且经济实惠, 利于科研工作的开展。

原位杂交需时长、程序复杂, 细胞或组织必须牢固粘附在玻片上, 才能完成实验。不少文献报道不同的处理方法, 我们试验的结果表明 histostik 及多聚赖氨酸较好。

以一定浓度的蛋白酶类消化细胞或组织片, 能增加其细胞的通透性, 使探针易于接近靶分子; 还能将靶分子从蛋白的束缚中释放出

来, 利于与探针的结合。对于分子量较大的探针, 这一处理尤其关键。至于其它杂交前处理并非必要。

配制杂交混合液时, DNA 探针需水浴煮沸, 以保证双链分开, 才能与靶分子杂交。杂交时, 严密封片, 避免气泡; 92°C 加热时切忌把混合液蒸干, 才能保证实验成功。

杂交后充分清洗, 能避免背景干扰及假阳性。在清洗过程容易造成脱片, 清洗过度亦会影响阳性结果, 应根据具体情况, 通过改变清洗液的成分和浓度及清洗时间和温度以达满意效果。

以链激酶-生物素-碱性磷酸酶系统显示生物素化核酸的部位比卵白素-辣根过氧化物酶系统理想, 前者显色时间较长, 一般在 1~3 小时, 但显色程度易控制, 显色剂不易产生沉淀, 背景清晰, 易于观察。

原位杂交法与 Southern blot 等分子杂交法相比, 具有较高的敏感性和准确性: 原位杂交只要固定得当, 靶分子保存良好(一般以新鲜的 $40\text{g}/\text{L}$ 多聚甲醛固定即可), 则仅少数几个细胞亦能显示阳性结果, 避免了必须首先抽提靶分子这一较繁琐且易于丢失靶分子的过程; 原位杂交能在细胞内亚细胞结构的水平上定位靶分子, 在组织中可区分出阳性细胞的类型, 更利于结合形态学的研究。

原位杂交技术中, 非放射性标记探针与放射性标记探针相比, 前者敏感性较后者逊色, 但具有使用安全、耗时间短, 设备简单, 阳性结果显示易控制, 背景较低, 易于推广的优点。

本实验把冰冻切片与石蜡切片的原位杂交结果作比较, 前者阳性反应较后者强, 但组织形态较后者差, 且两者阳性颗粒的形态有差异。推测由于组织经不同固定、包埋等处理后, 对靶核酸的保留和分子结构的改变有所不同。实验者可根据自己的需要、条件及两种处理的利弊, 有所选择。倘若未知组织内靶分子的拷贝数或已知拷贝数甚少时, 选用冰冻切片为宜。

(本文附图见封 3)

参 考 文 献

1. Pardue ML. In situ Hybridization. In: Hames BD & Higgins SJ, eds. Nucleic acid hybridization, A practical approach. Oxford: IRL press, 1985:179
2. Tecott LH, et al. Methodological considerations in the utilization of in situ hybridization. In: Valentino K, Eberwine J, Barchas J, eds. In situ hybridization: Application to neurobiology. New York: Oxford University press, 1986:3
3. Singer RH, et al. Toward a rapid and sensitive in situ hybridization methodology using isotopic and non-isotopic probe. In: Valentino K, Eberwine J, Barchas J, eds. In situ hybridization: Application to neurobiology. New York: Oxford University press, 1986:71
4. Delellis RA, et al. New techniques in gene product analysis. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:620
5. Brigati DJ, et al. Detection of viral genomes in cultured cell and paraffin-embedded tissue sections using biotinlabeled hybridization probes. Virology 1983; 126:32
6. Singer RH, et al. Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. Biotechniques 1986; 4(3):230
7. Falewis SG, et al. Sensitive in situ hybridization technique using biotin-streptavidin-polyalkaline phosphatase complex. J Chin Pathol 1987; 40:163

(1990-10-05收稿 1991-11-20修回)

ESTABLISHMENT OF IN SITU HYBRIDIZATION METHOD AND ITS APPLICATION TO CULTURED CELLS, FROZEN SECTIONS AND PARAFFIN EMBEDDED SECTIONS

Li Jintian

(Cancer Research Institute)

Luo Guowei Wu Yide Pan Weixian Li Chuanjun

(Department of Anatomical & Cellular Pathology

Chinese University of Hong Kong)

In situ hybridization method, which has been developed on the basis of liquid-phase hybridization, has great sensitivity and high accuracy. It will certainly provide important investigative and diagnostic tool for pathologic study. The authors have explored in detail of establishing in situ hybridization method in this experiment: preparation of biotinylated hybridization probe, preparation of different sorts of sample, treatment of cells and tissue sections in pre-hybridization, hybridization and post-hybridization, and so on. We also applied the biotinylated EBV-DNA probe which was prepared by means of nick-translation to cultured cells, frozen sections and paraffin embedded sections for examining EBV-DNA Bam HI-W internal repeat fragment.

The findings showed that the EBV-DNA probe prepared by us is completely reliable, the in situ hybridization procedure can be applied to the above three sorts of sample and the results are satisfactory.

Key words in situ hybridization; biotinylated DNA probe; EBV-DNA BamHI-W internal repeat fragment

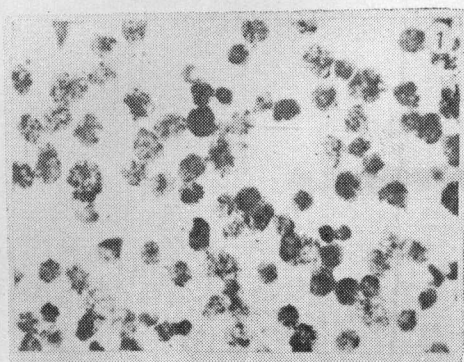


图1 自制EBV-DNA探针与Raji细胞的原位杂交 600×

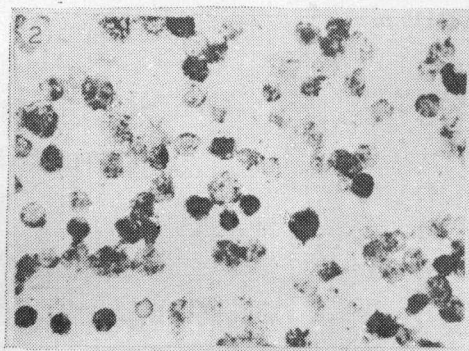


图2 EBP-836探针与Raji 细胞的原位杂交 600×

$\frac{1}{3} \mid \frac{2}{4}$

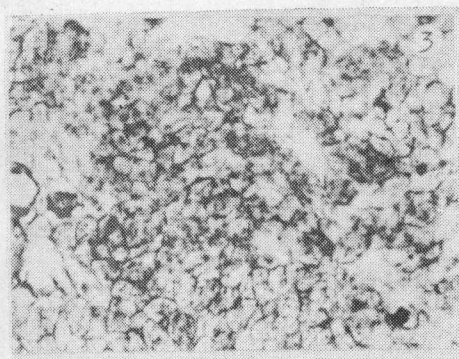


图3 自制EBV-DNA探针与×eno-666肿瘤冰冻切片的原位杂交 600×

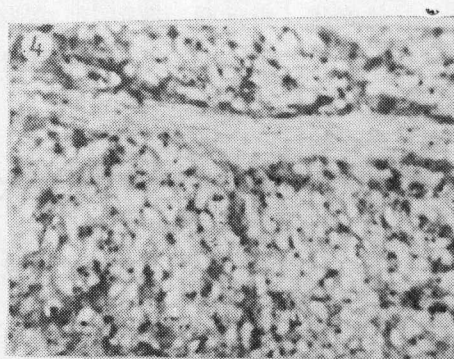


图4 自制EBV-DNA探针与×eno-666肿瘤石蜡切片的原位杂交 400×