DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2002.0263

·经验总结·

一种简便实用的原位杂交变性方法

林秋雄[1],曾仁海[2],钱德英[3]
(广东省人民医院 1.中心实验室,2.病理科,3.妇产科,广东 广州 510080)

关键词:原位杂交/方法;尖锐湿疣
中图分类号:R752.5+3;R711.32 文献标识码:A 文章编号:1000-257X(2002)5S-0159-01

变性是指DNA双螺旋链之间的氢键断裂,形成单链的过程。进行杂交反应时,探针和靶核酸序列都必须是单链的。加热是DNA变性的最常用方法,我们经过反复探索,利用PCR扩增仪进行原位杂交DNA变性,取得了满意的效果。

1 材料和方法

1.1 材 料

①标本:收集本院经组织学证实为宫颈尖锐湿疣或宫颈表皮内瘤变Ⅰ~Ⅱ级(CINⅠ~Ⅱ级)标本共43例连续性病例,其中宫颈尖锐湿疣30例,CINⅠ~Ⅱ级13例。②试剂:HPV6/11 DNA探针和ISH检测试剂盒均为美国Maxim公司产品。③设备:PCR扩增仪和原位载板(型号为PTC-200,产地美国)。

1.2 方 法

①水浴变性法[1]:先将切片置于95 ℃灭菌水变性10 min,并迅速置于冰水内2 min,吹干,然后将探针置于Eppendorf管内95 ℃变性10 min,放冰水内速冷2 min后加到切片上,加上盖玻片。②PCR扩增仪变性法:先将适量探针杂交液加到切片上,加上盖玻片,然后置于PCR扩增仪的原位载板上,加热至95 ℃变性10 min,迅速退火至4 ℃。③原位杂交步骤:石蜡切片,常规脱蜡至水;蛋白酶K(0.2 g/L)消化,37 ℃20 min,PBS洗3次,每次3 min;切片和探针变性(方法如上述);杂交,37 ℃,10~16 h;2× SSC 37 ℃洗脱盖玻片;2× SSC 37 ℃洗3次,每次3 min;1× SSC 37 ℃洗3次,每次3 min;鼠抗生物素抗体孵育,37 ℃,30 min,PBS洗3次,每次3 min;山羊抗鼠Ig孵育,37 ℃,20 min,PBS洗3次,每次3 min;复合物孵育,37 ℃20 min,PBS洗3次,每次3 min;NBT/BCIP显色10 min,水洗;核固红复染,水溶性封片胶封片。

2 结 果

宫颈鳞状上皮细胞核内出现紫蓝色颗粒为阳性。采用水浴变性法检测的43例标本中,HPV6/11阳性26例(60.47%);采用PCR扩增仪变性法的43例标本中,HPV6/11阳性36例(83.72%),两者阳性检出率的差异有显著性($\chi^2=5.78$,$P<0.05$),结果如表1所示。

表1 两种变性方法检测HPV6/11的例数与阳性率 n/例

方 法	总例数	阳性	阴性	阳性率(%)
水浴变性法	43	26	17	60.47
PCR仪变性法	43	36	7	83.72

$\chi^2=5.78$,$P<0.05$

3 讨 论

变性是DNA参与杂交反应必不可少的步骤,其好坏直接影响到实验结果的可靠性。加热、改变DNA溶液的PH、或受有机溶剂等理化因素的影响,均可使DNA变性[2]。变性的温度对ISH至关重要,温度过高或过低均会防碍探针和待测核酸的DNA双螺旋链的解体。过去原位杂交变性多采用水浴变性,但由于组织和探针需要分别变性,操作烦琐,变性温度难掌握,重复性差,组织片容易脱落,导致假阴性的发生或导致实验失败。从表1可知,PCR扩增仪变性法明显优于水浴变性法,其原因是由于PCR扩增仪具有加热和冷却迅速,温度控制精确,组织切片和探针同时进行变性,防止解链后的DNA单链重新复合,具有操作简单、方便快捷、结果稳定可靠的优点,故不失为一种实用的原位杂交变性方法。

参考文献:

[1] 许良中. 实用肿瘤病理方法学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1997.596~602.
[2] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000.431~453.

(编辑 张敏瑞)

收稿日期:2002-07-02
作者简介:林秋雄(1964-),男,广东汕头人,主管技师

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net