



## DIG Random Labeling and Detection Kit II (AP) (for color detection with BCIP/NBT) DNA 探针标记和检测试剂盒 II

产品编号: MK1010

保存条件: -20℃冰冻保存。

保存期: 一年用途: 用于 DNA 探针的随机引物标记及各种膜上杂交和原位杂交。

工作量: 可用于标记 0.1—3 $\mu$ g 的探针 6 次及 1000 张切片的原位杂交或 12 次 10 × 10cm 膜上杂交检测。

### 原理

所谓 DNA 探针, 实质上是一段已知的基因片段, 应用这一基因片段即可与待测样品杂交。如果靶基因和探针的核苷酸序列互补, 就可按碱基配对原则进行核酸分子杂交, 从而达到检查样品基因的目的。在随机引物法标记反应液中, 有随机合成的六聚体核苷酸 (hexanucleotide) 作为引物, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 DIG-11-dUTP 作为合成底物, 以单链 DNA 作为模板, 在 Klenow 酶的作用下, 合成掺入地高辛的 DNA 链。以地高辛标记的探针与靶基因 DNA 链杂交后, 再通过免疫反应来进行检测。一般通过酶标抗地高辛抗体来检测, 就可以肯定杂交反应的存在。免疫检测一般用碱性磷酸酶系统, BCIP/NBT 显色。敏感性很高。可用于膜上杂交和原位杂交。

### 试剂盒内容:

- |                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| 1. DIG Random Labeling Mix(高效), | 25 $\mu$ l  |
| 2. Anti-DIG-AP Conjugate,       | 100 $\mu$ l |
| 3. BCIP/NBT Stock Solution,     | 1ml         |
| 4. Blocking Reagent,            | 5g          |

### 特点:

- (1) 标记属高效标记反应。以 1 $\mu$ g DNA 探针为例, 1 小时反应即可产生 0.8 $\mu$ g 标记探针, 20 小时可产生 2 $\mu$ g 左右的标记探针。
- (2) 试剂将标记反应所需的引物、核苷酸、DIG-11dUTP 和 Klenow 酶等混合在一起。一次标记只需吸取一次标记液, 使用至为简便。
- (3) 标记反应适于下述对象 :

a. DNA 从 10ng—3 $\mu$ g。



b.不等的 DNA 长度 100bp—10kb。

c.线形排列或呈高度卷曲之 DNA。

d.低熔点琼脂中的 DNA。

- (4) 检测系统抗体为抗地高辛单抗, 标记碱性磷酸酶。效价 1: 5000 (膜上杂交) 或 1: 500 (原位杂交)。
- (5) 显色剂为 BCIP/NBT, 两种成分混合后保存于 67%DMF 中, 非常稳定。用时 1: 50 稀释。
- (6) 试剂盒敏感性达到 0.1pg, 足够检测出 1μg 基因组 DNA 中的单个基因。
- (7) 除用于各种膜上杂交之外, 还可用于原位杂交(ISH)。

## 操作程序

### 一 随机引物标记操作程序如下:

- ①用灭菌去离子蒸馏水稀释 1μg DNA 至总体积 16μl。
- ②DNA 热变性: 把 DNA 瓶置于沸水中, 水浴 10 分钟。然后, 迅速地插入碎冰中 3 分钟以上。
- ③加 4μl DIG Random Labeling Mix(高效),混匀后再离心 2000/r.p.m×5 分钟。
- ④置 37°C反应至少 120 分钟。时间越长, 产量越高。延长反应时间至 20 小时可明显增加地高辛标记 DNA 的产量。应根据需要控制反应时间。
- ⑤加入 2μl 10mM EDTA 以中止反应, 对于原位杂交和膜上杂交反应来说, 标记反应可告结束, 上述反应液置-20°C保存至少一年以上。且可反复使用。

可根据下表估计标记产量:

DNA 模板量	标记一小时	标记二十小时
10ng	45ng	600ng
30ng	130ng	1050ng
100ng	270ng	1500ng
300ng	450ng	2000ng
1000ng	850ng	2300ng
3000ng	1350ng	2650ng



## 二 核酸探针膜上杂交原理和操作

### (一) 杂交总原则

脱氧核苷酸通过磷酸二酯键缩合成长链构成 DNA 的一级结构。两条碱基互补的多核苷酸链按碱基配对原则形成双螺旋, 构成 DNA 的二级结构。某些条件(如酸碱、有机溶剂、加热)可使氢键断裂, DNA 双链打开成单链重新结合。所谓杂交, 是具有一定互补顺序的核酸单链, DNA 单链仍然可与序列同源的单链按碱基互补原则结合成异源性双链的过程。

### (二) 杂交膜的选择

杂交膜可以选择硝酸纤维素膜和尼龙膜。硝酸纤维素膜的优点在于本底较低, 但只能用于显色性检测, 且不能用于重复杂交。尼龙膜分为带正电荷的膜和不带电荷的膜两种。带正电荷的尼龙膜对核酸结合力强, 敏感性也较高。不带电荷的膜结合力低, 相应敏感性也较低。尼龙膜的优点在于杂交用过的膜, 用洗脱液(0.1×SSC, 0.1%SDS)煮沸 5-10 分钟后去除探针, 可用于新的探针杂交。如果对杂交结果不满意, 如背景太高或显色不强, 也可洗去探针之后重新杂交。

### (三) 探针浓度

探针浓度是获得理想杂交检测的关键因素, 浓度太高则会导致本底太深; 若浓度太低又会导致信号减弱。为了解决过高探针浓度所引起的高背景, 必须进行模拟杂交实验。所谓模拟杂交实验, 即选择几小片杂交膜, 在未转移 DNA 的情况下, 进行封闭、不同浓度的探针孵育及随后的免疫检测。以背景能被接受的最高探针浓度为正式杂交实验的浓度。模拟杂交实验不同浓度的探针可以参考下述方法配制: 取 5 $\mu$ l 标记反应液加 1ml 探针稀释液, 混匀。取 0.5ml 等倍释后, 再取 0.5ml 继续等倍稀释。假设 20 $\mu$ l 标记反应液中含 1 $\mu$ g 标记的探针, 则系列稀释探针的浓度分别是: 200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.25ng/ml。

### (四) 预杂交和杂交液

预杂交和杂交都使用相同缓冲液, 不同的仅是预杂交液中不含有探针。下面是几种基本杂交液配方:

① Standard buffer : 5 × SSC, 0.1%(w/v) N-Lauroylsarcosine, 0.02%(w/v)SDS, 1%

Blocking Reagent.

② Standard buffer+50% formamide : 50% formamide(deionized), 5 ×

SSC, 0.1%(W/V)N-Lauroylsarcosine, 0.02% (w/v)SDS, 1% Blocking Reagent.

③ High SDS buffer (Church buffer): 7%SDS, 50% formamide(deionized), 5 × SSC, 2%

Blocking Reagent, 50mM Sodium Phosphate, 0.1% N-Lauroylsarcosine



## (五) Southern Blotting

DNA 片段经电泳分离后按分子量大小排列在琼脂糖凝胶上。1975 年 Southern 发明了利用浓盐溶液的推动作用将变性的单链 DNA 转移到硝酸纤维素膜上的方法，解决了原位转移的问题。虽然其原理和操作均很简单，却是基因分析中必不可少的手段，已经得到了广泛的应用。Southern 印迹杂交包括两个主要步骤①把电泳分级的 DNA 转移到固相支持膜上。②与标记的 DNA 探针杂交。

### 1. Southern 转移

首先将 DNA 用限制性内切酶消化。准备一定浓度的琼脂凝胶。琼脂凝胶必须是高纯度和核酸级的。电泳后经溴化乙锭染色并在紫外灯下照相后，将需要转移的琼脂糖凝胶切下，放入搪瓷盘中，然后进行下面的步骤。

#### 试剂

a.0.25M HCl

b.变性液：0.5N NaOH,1.5M NaCl

c.中和液：0.5M Tris-HCl,pH7.4,3M NaCl

d.20×SSC：0.3M 柠檬酸钠,3M NaCl。

e.2×SSC：0.03M 柠檬酸钠,0.3M NaCl。

#### 程序：

- (1) 将胶浸入 0.25M HCl 中 10 分钟。HCl 处理的作用主要是通过去嘌呤使 DNA 分子断裂，因而有利于高分子量 DNA 的转移，但不能处理时间过长。要转移全部小于 10kb 的 DNA 片段时可省略此步骤
- (2) 进入变性液之前，用蒸馏水漂洗 20-30 分钟。
- (3) 把胶浸入变性液中，室温浸泡 15 分钟×2 次。
- (4) 蒸馏水漂洗凝胶 2 次。
- (5) 把胶浸入中和液中，室温泡 15 分钟×2 次。
- (6) 在处理凝胶的同时，切一张与胶同样大小的尼龙膜或硝酸纤维膜。硝酸纤维膜用 2×SSC 浸泡。剪两张 Whatman3#滤纸和一叠吸水用的粗滤纸注意不能用手指直接接触及膜面。
- (7) 准备转移用平器和支架，平器中放 20×SSC。架子上搭滤纸桥使溶液能够虹吸上来。
- (8) 依次放：处理好的凝胶，硝酸纤维素膜，吸水滤纸，玻璃板，适量重物(500-1000g)



注意: 要检查 PH 值, 用硝纤膜时 PH<9。要确保各层间没有气泡, 否则会发生局部“绝缘”, 气泡处的 DNA 难以被吸到硝酸纤维膜上。

(9) 于室温转移 12-20 小时。

(10) 取出转移膜, 用 2×SSC 漂洗数次, 以去掉可能粘附于膜上的凝胶。

(11) 固定: 可选择下述方法之一进行 DNA 固定

·紫外线固定: 使用长波紫外线照射 10-20 分钟, 简单漂洗后干燥备用。

·尼龙膜置+120°C烘烤 30 分钟。

·硝纤膜置真空烤箱中, 80°C减压烘烤 2-2.5 小时, 以避免硝纤膜自熔。若无真空烤箱, 亦可在普通烤箱中 65-70°C烘烤 3-4 小时, 也能达到固定目的。 固定后, 将膜封于塑料袋中, 保存于干燥处待杂交。

注意事项 ①转移液的盐浓度对转移具有一定影响。一般选择 20×SSC 快速转移。10×SSC 转移速度较慢, 对于高分子量 DNA (> 10Kb) 效果比较理想。因此要根据不同目的选择适当的转移液。

②转移时不能移动上边重物, 防止出现“重影”现象。

③硝酸纤维膜对于 0.5kb 以下的小分子 DNA 结合不牢, 转移时容易丢掉。要探测小片时最好用尼龙膜。

2. Southern 印迹杂交成功的关键因素之一在于选择杂交液。应通过预实验来选择合适的杂交液。另一个比较重要的因素是标记探针的浓度, 一般选择 5-25ng/ml, 应通过模拟杂交实验来选择合适的探针浓度。

## 试剂

a. Standard buffer

b. Standard buffer+50% formamide

c. High SDS buffer

d. Wash Solution I: 2XSSC, 0.1% SDS

e. Wash Solution II: 0.5XSSC, 0.1% SDS

## 程序

①将转移好的尼龙膜或硝纤膜装入塑料袋中, 每边各留 2-4mm 空隙。灌注杂交液的一边留 1cm 空隙。在角上剪开一个小口, 灌注预杂交液, 从切口处赶走气泡, 用封膜机封口, 浸入水浴中。

②根据所选择的不同预杂交液, 采用不同的温度预杂交 4-20 小时: Standard buffer: 预杂交温度 65-68 °C, Standard buffer+50% formamide: 37-42 °C, High SDS buffer: 37-42 °C。

③使用双链 DNA 探针时, 沸水浴 10 分钟以变性探针。然后迅速插入冰中。



按模拟杂交实验所确定的探针浓度将适量探针加入到预杂交液中，配成杂交液，一般浓度 5-25ng/ml。按每 100cm<sup>2</sup> 膜加入至少 3.5ml 配制杂交液。

④使用和预杂交相同的杂交温度，一般杂交 16-20 小时。

⑤杂交结束后，取出杂交袋，剪开一个小口，将杂交液倒入带盖的试管中，储存于-20℃以备下次使用。这样至少可保存一年。再次使用之前应在冻融之后，加热至+95℃ 10 分钟以变性探针。杂交液如含有 50%甲酰胺，则在 68℃变性 10 分钟即可。

⑥取出杂交膜，用 Wash Solution I 洗 5 分钟×3 次。

⑦保温冲洗：用 Wash Solution II 于 68℃冲洗 15 分钟×2 次。

## (六) DNA Dot Blotting

此检测方法用于快速定性筛选 DNA。样品可以是纯化 DNA，也可以是细胞碎片 PCR 扩的 DNA。预杂交和杂交方法与 Southern 基本一致，不同的仅是样品的处理不同。

试剂：DNA dilution buffer : 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA,PH8.0; 50μ g/ml herring Sperm DNA

程序

①将样本 DNA 稀释成不同浓度。

②将样本 DNA 于+95℃水浴 10 分钟，迅速插入冰中。

③取 1μl 点样至尼龙膜或硝纤膜上。点样前先画上圆卷做记号。

④用紫外线照射固定或+120℃烘烤 30 分钟固定。

其后杂交步骤 Southern 相同

## (七) BCIP/NBT 显色检测法

试剂：a.Anti-DIG-AP 碱性磷酸酶标记抗地高辛单抗体。

b.BCIP/NBT 储备液：

c.冲洗液：0.1M Tris-HCl,0.15M NaCl, PH7.4。

d.封闭液：1% Blocking Reagent/0.1M Tris-HCl,0.15M NaCl。

e.显色缓冲液：0.1M Tris-HCl,0.1M,NaCl,PH9.5。 f.TE 缓冲液：10mM Tris,1mM EDTA,PH8.0

程序：

①经过杂交及杂交后的冲洗之后，膜置于冲洗液中平衡 1 分钟。



②用干净的杂交袋或平皿，封闭液室温封闭至少 60 分钟。

③用封闭液(d)1: 2500—5000 稀释 Anti-DIG-AP，例如 2 $\mu$ l Anti-DIG-AP 加至 5—10ml

封闭液中（根据染色情况而调整）。稀释液+4 $^{\circ}$ C可稳定 12 小时左右。

④加 Anti-DIG-AP, 37 $^{\circ}$ C反应 60 分钟。

⑤用冲洗液冲洗 15 分钟 $\times$ 3 次，每次 100ml 。

⑥按 1: 50 配制底物显色液：例如 100 $\mu$ l “BCIP/NBT 储备液” (b)加至 5ml 显色缓

冲液中，未用完的显色剂应避光保存。

⑦显色缓冲液 20ml 平衡 2 分钟后倾掉。

⑧加 10ml 底物显色液(100  $\mu$ m<sup>2</sup>)。将膜及显色剂封在塑料袋中，开始避光显色。显色过程中可以观察。一般数分钟即开始出颜色，显色过程可以持续至 12 小时。应绝对避免振动，以免出现显色带的移位。

⑨当所需要的显色点或带出现之后，蒸馏水洗以中止反应。结果可以进行照相记录；也可以直接保存于 TE 缓冲液(f)，在此情况下，颜色长期不退。还有一种选择是让膜干燥，颜色消退。但若将膜放置于 TE 缓冲液中，显色重新出现。

### 三 原位杂交

所谓原位杂交是指在保存染色体、细胞或组织结构的前提下，用探针定位检查出相关基因序列。结合免疫细胞化学，原位杂交可以揭示出基因在 DNA、mRNA 水平的表达。原位杂交技术最早 Pardue and Gall 和 John et al. 分别在 1969 年发现。最初，放射性标记技术是唯一的方法，其使用受到明显限制。由于非放射性标记技术的简单、高敏感性，为原位杂交技术广泛应用开辟了道路。

#### (一) 染色体原位杂交的一般技术

##### 1 玻片准备

为了展开染色体，酒精清洁玻片即可。但为了防止细胞和组织的脱落，必须用多聚赖氨酸或 APES 处理玻片。

##### 2 固定

为了保存形态结构，生物材料都必须予以固定。染色体的固定比较简单，甲醇/乙酸固定即已足够。如果是石蜡包埋组织，采用福尔马林固定。冰冻切片采用 4%甲醛或 Bouin's 固定液固定 30 分钟。应予以注意的是，DNA 和 RNA 虽然不和各种交联剂反应。但包围 DNA、RNA 的各种蛋白质和交联剂反应后，就会遮盖住靶核苷酸。因此，必须采取各种增加通透性的程序。



### 3 玻片上材料的预处理

a. 内源性酶的灭活 如果用酶作为标记物,内源性酶必须预先予以灭活。如过氧化物酶,可用 1% $H_2O_2$ /甲醇 30 分钟处理。至于碱性磷酸酶,由于杂交过程的破坏,残余碱性磷酸酶的活力会完全消失。

b. RNA 酶的处理—DNA-DNA 杂交时需要处理内源性 RNA。内源性 RNA 的存在,会由于 DNA-RNA 的杂交而增加背景。处理方法: DNase-free RAase(100 $\mu$ g/ml)/2 $\times$ SSC,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。(SSC=150mM NaCl,15mM Sodium Citrate,PH7.4)

c. HCl 处理 用 200mM HCl 处理 20-30 分钟可以增加信/噪比值,其机理尚不清楚。可能与蛋白的抽提和部分功能核苷酸片断的溶解有关。

d. 去垢剂处理 在脂膜成分未被固定,脱水、包埋等程序抽提时,可以进一步使用去垢剂处理,如 Triton X-100,Sodium dodecyl Sulfate 等,同样有助于原位杂交技术。

e. 蛋白酶消化 蛋白酶消化有助于增进探针和核苷酸之间的接触性。消化通常用蛋白酶 K,溶于 20mM Tris-HCl,2mM CaCl<sub>2</sub>, PH7.4,37 $^{\circ}$ C 15-30 分钟。蛋白酶 K 浓度依不同对象来确定。例如对染色体和核的分离部分,可以用 1 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K。

### 4 探针和靶基因的变性

对染色体 DNA 的原位杂交,必需进行变性处理。热变性越来越常用,它不仅简单,而且效果很好。对不同的杂交,应试验不同的时间和温度,以找到最佳的变性条件。热变性时,探针和靶基因可以同时变性。将探针加到玻片上,盖上盖玻片。玻片放到 80 $^{\circ}$ C,2 分钟后取出冷却至 37 $^{\circ}$ C。如果是组织切片,变性时间应达到 80 $^{\circ}$ C 10 分钟

### 5 杂交后的冲洗

标记探针能够和其序列具有部分同源性的基因非特异性的杂交。这类杂交分子的稳定性总是不及完全同源的杂交分子。分别用不同强度冲洗液可以有效地洗掉非特异杂交的/探针,而保留特异杂交的探针。冲洗液的强度可通过改变甲酰胺浓度、盐浓度和温度来控制。通常用 2 $\times$ SSC + 50%甲酰胺来冲洗。有时可用更高强度的冲洗液。总的来说,杂交时用高强度缓冲液,冲洗时用低强度的冲洗液(盐浓度越低,甲酰胺浓度越高和温度越高,则冲洗强度越大)。

### 6 免疫细胞化学

免疫细胞化学和常规方法一样,必须先进行非特异性的封闭处理。如探针为地高辛标记时,Tris-HCl 缓冲液含“Blocking Reagent”。此外 0.4M NaCl 的加入也有助于降低背景。在标准的免疫反应程序中,先对染色体、细胞和组织进行封闭,然后用酶标抗体 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟(或室温 1-2 小时)。此后用含 Tween 20 的缓冲液进行三次冲洗每次 5-10 分钟。免疫细胞化学中最常用的酶是过氧化物酶和碱性磷酸酶。前者用 DAB 作显色剂。后者用 BCIP/NBT 作显色剂,方法同膜上杂交。显色强度由显微镜下控制。

### 7 影响原位杂交的主要因素





a.探针长度：原位杂交和其它杂交方法不同，它要求较短的探针。因为探针越短，渗透性越强，可以渗透至细胞内部和染色体。不同的杂交所允许的最小核苷酸如下

述公式所计算：

b.探针浓度：浓度越高，则杂交速度越快。但过高的浓度也会使背景增加，因此，宜选择可接受背景的最高探针浓度。 c.硫酸葡聚糖：在水溶液中，硫酸葡聚糖是高度水化物质，因此使得大分子(如探针)难以接触到其结合水，相对浓度大大增加，杂交速度明显加快。 d.碱基错配：碱基错配会引起杂交速度及二倍体的稳定性下降。因此在严格的杂交条件下，可以阻止探针与靶基因的非特异结合。

e.冲洗条件

## 8 杂交标准条件

适于 DNA 探针 > 100bp

◎ 50%去离子甲酰胺

◎ 2×SSC

◎ 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PH7.0

◎ 1mM EDTA

◎ 载体 DNA：鲑角精子 DNA 100-250ng/μl。

任选组合：

1×Denhardt's

dextran sulfate,1-10%

温度 37-42°C

杂交时间：5-16 小时

## (二) 组织切片的原位杂交

目前，原位杂交已成病理学的一个有力工具，原位杂交可以用于诸如病毒，癌基因，基因突变等领域的检查。尤其是非放射性标记探针技术，为更多的实验室广泛应用原位杂交创造了条件。对福尔马林固定、石蜡包埋切片的原位杂交，关键是以下三个步骤：

①靶 DNA 的暴露。这要靠精心设计的消化步骤。

②DNA 的变性和杂交。

③杂交的分子的冲洗和检测。

### 1 探针的准备

### 2 玻片的处理

①去污剂浸泡一晚，大量自来水冲洗，然后用蒸馏水清洗。



②干燥之后，浸入丙酮中 3 分钟。

③玻片移入 1: 50 丙酮稀释的 APES 溶液中，浸泡 5 分钟。

④玻片用蒸馏水略加清洗。干燥备用。处理后的玻片置干燥无尘环境可保存半年。

玻片也可用“多聚赖氨酸”处理。

### 3 组织切片的准备

①组织用常规 4%中性缓冲甲醛溶液固定，石蜡包埋。

②常规切片。切片捞于涂有粘片剂的玻片上。

③切片处理：先置 60°C烘片 30 分钟。

二甲苯脱蜡，逐级酒精至水清洗。

④临用前配制蛋白酶 K 溶液：

储备液：Proteinase K,10mg/ml H<sub>2</sub>O，小量分袋-20°C保存。将储备液用 TES 稀释成

100μ g/ml。 (TES=5mM Tris-HCl,10mM EDTA,10mM NaCl,PH7.4 )

⑤每张切片用 Proteinase k 20-30μ l 37°C消化 15 分钟。消化过程中加盖硅化盖玻片，并置湿盒中。注意消化对组织原位杂交是至关重要的。过度消化会导致切片消失殆尽，消化不足则敏感性不够，因此应针对不同组织尝试不同的消化条件。

### 4 杂交

①蛋白 K 消化后，去除盖玻片。用 4%甲醛 4°C固定 5 分钟。

②蒸馏水洗 5 分钟。

③让切片上水分滴下去，并在室温干燥 5 分钟。注意只能让切片上水份减少，不能让切片完全干燥。④每张切片加 5-10μ l 探针(大切片需相应增加)。

⑤设立严格的对照组，每张切片加 5-10μ l 不加探针的杂交液。

⑥切片上加硅化盖玻片，将玻片置+95°C变性 6 分钟。

⑦把玻片放到冰上 1 分钟。

⑧切片置温盒，42°C杂交 3 小时以上。如果方便，应杂交过夜。

### 5 冲洗

去掉盖玻片，按下述程序冲洗



2×SSC 洗 5 分钟×2 次(室温)

0. 1×SSC 洗 10 分钟(42°C)

### 6 杂交分子的检测---BCIP/NBT

①切片置于 0. 1M TBS 缓冲液中, PH7. 4

②每张切片加 20-40μl 封闭液: 0. 5%Blocking Reagent/0.1M TBS。

③室温反应 15 分钟。

⑤用封闭液 1: 500 稀释 Anti-DIG-AP; (临用之前才配, 配好后立即加至切片)

⑥每张切片加 20-50μl 稀释试剂, 湿盒室温反应 1-2 小时。

⑦用 0. 1M TBS 洗 10 分钟×3 次

⑧用 0. 2M Tris-HCl,10mM MgCl<sub>2</sub>,PH9.2 平衡 5 分钟。

⑨配显色剂: 将 BCIP/NBT 储备液用上述缓冲液 1: 50 稀释。每张切片加 20μl, 置黑 暗处显色。显色快时, 一般 30-60 分钟。信号弱时显色过夜。

### (三) 细胞的原位杂交

下面的程序是用标记 DNA 探针来检测培养细胞中的 mRNA。其它类型的检测可以参照此程序进行。

#### 1 细胞准备, 固定和增加通透性

注意: 所有溶液都必须用 RNase 抑制剂处理。

①玻片用多聚赖氨酸处理。直接用 5% CO<sub>2</sub> 在玻片上培养细胞。所用培养基为无酚红 Dulbecco's 基础培养基。

②37°C PBS 清洗细胞。然后用下述固定液室温固定 30 分钟: 4%甲醛, 5%乙酸和 0. 9%NaCl。③室温 PBS 清洗固定细胞, 用 70%乙醇储存于 4°C ④杂交前用下述

方法脱水:

70%, 90%和 100%乙醇; 10%二甲苯; 然后再用 100%, 90%, 70%乙醇, 最后 PBS 洗二次。

⑤用胃蛋白酶消化细胞: 0.1%Pepsin/0.1N HCl,37°C5-10 分钟。

⑥PBS 洗 5 分钟后, 1%甲醛固定 10 分钟。PBS 洗。

#### 2 杂交 ①地高辛标记探针。

②杂交液配制: 60%去离子甲酰胺, 0. 3M NaCl, 30mM 柠檬酸三钠, 10mM EDTA, 25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(PH7.4), 5%硫酸葡聚糖, 250ng/μl 鲑角精子 DNA。

③于 80°C10 分钟变性标记探针, 然后加至上述杂交液中, 浓度为 5ng/μl



④加 10 $\mu$ l 杂交液至玻片上, 并盖上盖玻片。注意: 也可选择原位变性步骤, 这样可增加 RNA 和探针的接触性。

⑤37 $^{\circ}$ C杂交 16 小时。

### 3 洗涤

杂交后去掉盖玻片, 于下述溶液中充分洗涤: 60%甲酰胺, 300mM NaCl, 30mM 柠檬酸钠。室温洗三次, 37 $^{\circ}$ C 洗一次。然后 PBS 洗 5 分钟。

### 4 免疫检测

①用下述缓冲液作非特异性的封闭: 0.5%Blocking Reagent/0.1M TBS, 加盖玻片。室温 15 分钟。②用封闭液 1: 500 稀释 Anti-DIG-AP(临用之前才配, 配好后立即加至切片)。

③每张切片加 20-50 $\mu$ l 稀释酶标试剂, 置湿盒室温反应 1-2 小时。

④用 0.1M TBS 洗 10 分钟 $\times$ 3 次。

⑤用 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, PH9.5 平衡约 5 分钟。

⑥显色剂配制: 将 BCIP/NBT 储备液用上述缓冲液 1: 50 稀释。每张切片加 20 $\mu$ l, 置黑暗处显色, 一般显色 30-60 分钟。信号弱时显色过夜。

## 附录一: 各种溶液的配制

1 $\times$ SSC: 150mM NaCl 15mM Sodium Citrate PH7.0

20 $\times$ SSC: 3M NaCl 300mM Sodium Citrate PH7.0

10 $\times$ SSC: 1.5M NaCl 150mM Sodium Citrate PH7.0

Washing Solution 2 $\times$ SSC: 300mM NaCl 30mM Sodium Citrate

Washing Solution 0.5 $\times$ SSC: 0.5 $\times$ SSC+0.1%SDS

Washing Solution 0.1 $\times$ SSC: 0.1 $\times$ SSC+0.1% SDS

N-Lauroylsarcosine:10%(w/v)in Sterile H<sub>2</sub>O,filtered through a 0.2-0.45 $\mu$  m membrane

SDS 10%(w/v)in Sterile H<sub>2</sub>O:filtered through a 0.2-0.45 $\mu$  m membrane

Denaturation Solution(for Southern transfer): 0.5N NaOH,1.5M NaCl

Neutralization Solution(for Southern transfer): 0.5M Tris-HCl,3M NaCl,PH7.4

Blocking Reagent Stock Solution:

①加 10g Blocking Reagent 至 100ml 0.1M TBS, PH7.4 缓冲液中。搅拌以助溶解。

②如果必要时, 加 0.1%DEPC(dimethylpyrocarbonate) ③储备液 4 $^{\circ}$ C保存。用前检查有无污染。

Blocking buffer:

用 0.1M TBS, PH7.4, 1: 10 稀释上述储备液。

**Standard hybridization buffer:** 5 $\times$ SSC,0.1% N-lauroylsarcosine 0.02% SDS 1%

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC AND CLINICAL USE.



## Blocking Reagent

**Standard hybridization buffer+50% formamide:** 5×SSC, 50% deionized formamide,

0.1% N-Lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagent

**High SDS Concentration hybridization buffer:** 7% SDS, 50% deionized formamide, 5×SSC,

2% Blocking Reagent, 50mM Sodium Phosphate, PH7.0, 0.1% N-Lauroylsarcosine

**500ml High SDS hybridization buffer** 可按下述方法配制:

100% deionized formamide 250ml, 30×SSC 83ml, 1M sodium Phosphate, PH7.0 25ml,

10% blocking solution 100ml, 10% N-Lauroylsarcosine 5ml

将上述混合液倒入有 35g SDS 的烧瓶中(通风橱)。搅拦促进溶解, 最后加入灭菌水至 500 ml。储存-20°C。

**Detection Washing buffer:** 0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl, PH7.4

**Detection buffer:** 0.1M Tris-HCl, 100mM NaCl, PH9.5

**TE buffer:** 10mM Tris-HC, 1mM EDTA, PH8.0。

**Color Substrate Solution**(新鲜配制)

200μl BCIP/NBT 储备液加 10ml Detection buffer。

玻璃和塑料器皿的硅化: 先将待硅化器皿放入玻璃真空干燥器中; 加 1ml 二氧二甲基硅烷于一小烧杯中, 放入干燥器。将真空干燥器与真空泵相连。抽气至二氧二甲基硅烷沸腾。关闭真空泵, 保持干燥器的真空。1-2 小时后, 慢慢往干燥器内通气, 取出器皿 180°C 烘烤 2 小时, 塑料器高压消毒, 用前用水冲洗干净。

## 附录二: 使用注意事项

核酸探针的标记及杂交是一个很复杂的过程, 步骤多耗时长, 影响因素多。要想获得理想结果, 每一步都应严格操作。下面几个问题尤其应予以注意: 无菌操作: 标记和杂交的各种溶液应高压灭菌; 含 SDS, Tween20 的溶液应在滤膜除菌后加入其它溶液; 使用灭菌吸头。

使用干净平皿: 每次用前必须严格清洗。膜的操作: 操作膜时戴无尘的手套; 只用无齿镊操作膜的边缘。

原位杂交: 每步反应均应加盖硅化的盖玻片

## 有关参考文献

1. Rigby, P.W.J, et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in nick translation with DNA Polymerase I. J. Mol. Biol. (1997) 113: 237-241.

2. Langer, P.R. et al. Enzymatic Synthesis of biotin-labeled Polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78(11): 6633-6637. 3. Bland, r.s. et al. Digoxigenin as a probe label for in situ hybridization on skeletal tissue. Histochem. J. (1991). 23 : 415-418.

4. Bochenek, B; Hirsch, A. In situ hybridization of nodulin mRNAs in root nodules using non-radio-active probes. Plant Mol. Biol. Report (1990), 8(4) : 237-248.



5. Breitschopf,H.,et al.In situ hybridization with digoxigenin-labeled probes:Sensitive and reliable detection method applied to myelinating rat brain.Acta Neuropathol(1992) 84 : 581-587.
6. Archard,L.C.etal.Detection of Persistent coxsackieB Virus RNA in dialated cardiomyopathy and Myocarditis.Eur.Heart J.(1987)8 : 437-440.
- 7.Blum,H.E.etal.Detection of Hepatitis B Virus DNA in hepatocytes,bile duct epithelium, and vasculat elements by in situ hybridization.Proc.Natl.Acad.Sci(1983)80 : 6685-6688.
8. Heiles,H.B.J.,et al.In situ hybridization with digoxigenin labeled DNA of human papillomaviruses(HPV16/18)in Hela and siHa cells.BioTechniques.(1988)6(10) : 978-981.
9. Negro,F.et al.Detection of HBV-DNA by in situ hybridization using a biotin-labeled Probe. J.Med.Virol.(1985)15 : 373-382.
- 10.Pezzella,M.et al.HBV and HIV expression in lymph nodes of HIV Positive LAS patients: histology and in situ hybridization.Mol.Cell Probes(1989)3 : 125-132.
- 11.Vnger,E.R.,et al.Viral dcagnosis by in situ hybridization.Description of a rapid simplified colorimetric method.Am J.Surg Pathol.(1988)18 : 1-8.
- 12.Komminoth,P.Digoxigenin as an alternative Probe labeling for in situ hybridization. Diagn.Mol.Pathol.(1992)1 : 142-1850.
- 13.Long,A.A.,et al.High-specificity in situ hybridization:Methods and application.Diagn.Mol. Pathol.(1992)1 : 45-57.
- 14.李志远等; 中国组织化学和细胞化学杂志 1995; 4(3) : 263-268.
- 15.王春杰等; 中国组织化学和细胞化学杂志 1995; 4(3) : 297-300.
- 16.唐志佼等; 中华病理学杂志 1993; 22(3): 140-142.
- 17.曹惠平等; 中华内科杂志 1994; 33(3): 168-171.
- 18.马利军等; 中华医学杂志 1995; 75(4): 201-203. 19.沈克勤、黎磊石等; 中华医学杂志 1993; 73(10): 609-611.
20. 张和平、杨永宗等; 中华病理学杂志 1992; 21(6): 349-351.