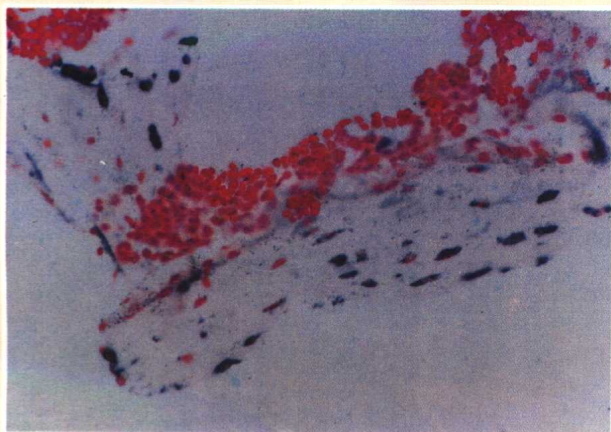


非放射性杂交技术

主编：路建平



南海出版公司

内 容 介 绍

本书分为入门、基础技术、专业技术及应用技术等四部分。入门部分说明用地高辛标记法进行杂交技术的一般操作手法及注意事项。基础技术部分在简单介绍原理的基础上,分别详细说明常用的地高辛标记探针方法和杂交技术。专业技术部分以染色体标本和组织切片为重点,说明地高辛标记杂交技术的专业应用及操作中的注意事项。最后介绍地高辛标记杂交技术在双重、三重标记,整体标记,定量分析,原位PCR等方面的应用及其自动化的尝试。本书注重实用性,力求解决实际操作中可能遇到的问题,可作为生物学、医学科研人员的工具书,也可供有关专业的教学参考。

非放射性杂交技术

主编 路建平

总经理 霍宝珍

责任编辑 吴德才 田大军

南海出版公司出版发行

全国新华书店经销

上海市崇明印刷厂排版印刷

787×960 毫米 32 开 印张 4.125 插页 4 千字 100

1996 年 6 月第 1 版 1996 年 6 月第 1 次印刷

印数:1—3000 册

ISBN 7—5442—0713—7/R·14

定价:10.00 元

非放射性杂交技术

主 编 路建平

编 者 野村慎太郎 稻泽壤治

朱世能 林肇辉

编著者单位和通讯地址

路建平 200032 中国上海医科大学病理学教研室

野村慎太郎 565 日本大阪大学医学部病理学教室

稻泽壤治 602 日本京都府立医科大学卫生学教室

朱世能 200032 中国上海医科大学病理学教研室

林肇辉 700 日本冈山大学医学部病理学教室

日本日中永和协会助成

南海出版公司

1996·海口

祝 辞

《非放射性杂交技术》一书经过两年的编写现在终于与读者见面了。本书的编者是中国和日本的医学专家。野村慎太郎先生与稻泽壤治先生都曾多次访问中国,林肇辉先生现在是日本国国际协力事业团驻中国专家(Expert of JICA)。因此,他们都非常了解中国的国情。该书紧密结合科研、教学和临床实际工作,系统介绍了地高辛标记技术及其应用,填补了中国科技图书领域的这一空缺,是一件值得欣慰的喜事。

本书的完成是中日两国科研人员共同努力的结果,相信她的出版不仅有助于中国医疗、卫生和教育事业的发展,更能促进中日两国在自然科学领域的交流与合作。

日中永和协会
会 长 井出源四郎
理事长 江 川 洋
一九九六年六月

序

以地高辛配体(DIG)为主体的 DIG 系统于 1988 年首次问世。该技术避免了使用有碍安全的同位素,而且敏感性高、耗时少,必将成为分子生物学核酸分析技术的重要手段。

目前国内尚乏有关该技术的详细介绍。为此我们编写本书,将地高辛标记杂交具体操作技术和注意事项献给读者,供同道和同学参考。衷心希望读者在使用本书过程中给我们提出宝贵意见。

编 者

目 录

第一篇 人 门

第一章 操作技术、技巧, 试剂	(1)
第一节 基本实验操作技术	(2)
一. 正确使用微量加样器	(2)
二. 用加样器准确吸、加溶液	(2)
三. 离心沉淀	(3)
四. 搅拌、混合	(3)
五. 加热与蒸发	(3)
六. 酚提取	(4)
七. 乙醇沉淀	(4)
八. 沉淀的溶解	(4)
九. 核酸定量	(5)
十. 手套、口罩的使用	(5)
十一. 禁止事项	(6)
十二. 熟练的研究人员	(6)
第二节 试剂	(7)
一. 试剂的选择与购买	(7)
二. 注意事项	(8)
三. 常用储备液的配制	(8)
第二章 地高辛标记探针的制备	(12)
第一节 RNA 探针	(12)
一. 原理概述	(12)
二. 操作流程	(14)
三. 离体转录产物的检测	(16)

第二节 PCR 探针	(17)
一. 原理概述	(17)
二. 反应液的组成	(18)
三. 对地高辛 PCR 的几点看法	(18)
第三节 DNA 探针 (随机引物探针)	(19)
一. 原理概述	(19)
二. 实际操作	(19)
第四节 寡核苷酸探针	(22)
一. 3'端加尾法	(22)
二. 3'端标记法	(23)
三. 5'端标记法	(25)
四. 问题与处理	(26)

第二篇 基础技术

第三章 蚀斑杂交与菌落杂交	(27)
第一节 滤膜的准备	(27)
第二节 杂交	(28)
第三节 信号的检测	(29)
第四章 Southern 杂交	(31)
第一节 染色体 DNA 的提取	(31)
第二节 用限制酶切断 DNA	(33)
第三节 已切断 DNA 片段的电泳	(34)
第四节 转移至滤膜	(35)
第五节 探针的制备	(37)
第六节 杂交与探针的漂洗	(37)
第七节 信号的检测	(38)
第八节 问题与处理	(40)
第五章 Northern 杂交	(42)
第一节 提取 RNA	(42)
第二节 用变性琼脂糖进行 RNA 电泳	(45)

第三节 转移至滤膜	(47)
第四节 探针制备	(48)
第五节 杂交	(48)
第六节 探针的漂洗	(49)
一. RNA 探针的漂洗	(49)
二. DNA 探针或 PCR 探针的漂洗	(50)
三. 寡核苷酸探针的漂洗	(50)
第七节 信号的检测	(50)
第八节 再杂交	(52)
第九节 结果的定量	(52)
第十节 问题与处理	(53)

第三篇 专业技术

第六章 染色体地图法	(55)
第一节 制备染色体标本	(56)
一. 末梢血淋巴细胞培养	(56)
二. 细胞的低渗透压处理、固定, 染色体的伸展	(57)
三. Hoechst 33258 处理与紫外线照射	(58)
第二节 标记 DNA 探针	(58)
一. 调制 DNA 探针	(58)
二. 标记 DNA 探针	(58)
三. 回收与精制 DNA 探针	(59)
第三节 杂交	(60)
一. 标记 DNA 探针变性	(60)
二. 染色体 DNA 变性	(60)
三. 杂交	(61)
第四节 检测与观察信号	(61)
一. 杂交后漂洗	(61)
二. 制备荧光色素与检出信号	(62)
三. 观察信号与摄影	(64)

四. 结束语	(64)
第七章 原位杂交	(66)
第一节 检出 mRNA	(66)
一. 器皿、试剂的去 RNA 酶处理	(66)
二. 组织的固定和包埋	(66)
三. 玻片的处理与镀膜	(67)
四. 制作切片	(68)
五. 制备探针	(68)
六. 切片的预处理	(69)
七. 杂交	(71)
八. 漂洗探针	(71)
九. 抗体反应与显色反应	(72)
十. 消除背景染色的方法	(73)
第二节 检出 DNA	(74)
一. 器皿、试剂的去 RNA 酶处理	(74)
二. 组织的固定和包埋	(74)
三. 玻片的处理与镀膜	(74)
四. 制作切片	(74)
五. 制备探针	(74)
六. 切片的预处理	(75)
七. 杂交	(75)
八. 漂洗探针	(76)
九. 抗体反应与显色反应	(76)
十. 进行原位杂交时的几点建议	(76)

第四篇 应用技术

第八章 多色荧光原位杂交法	(77)
第一节 双色荧光原位杂交	(77)
一. 方法概要	(77)
二. 选择和标记 DNA 探针	(78)

三. 标记探针	(78)
四. 回收标记探针	(79)
五. 探针的混合及变性	(79)
六. 染色体 DNA 的变性	(79)
七. 预杂交	(80)
八. 与染色体 DNA 杂交	(80)
九. 杂交后的漂洗	(80)
十. 观察荧光信号	(80)
十一. 染色体对比染色 (复染)	(80)
十二. 观察信号	(81)
第二节 三色荧光原位杂交	(82)
一. 方法概述	(82)
二. 标记探针	(82)
第三节 前期荧光原位杂交序列测定系统确定相邻克 隆的排列	(83)
一. 前期染色体标本的制备	(85)
二. 确定前期染色体上的信号顺序	(87)
三. 结束语	(87)
第九章 原位杂交技术的新探索	(88)
第一节 薄片组织原位杂交	(88)
一. 操作	(88)
二. 杂交	(89)
第二节 整体原位杂交	(89)
一. 实验器械、试剂	(89)
二. 组织的固定与预处理	(90)
三. 制作探针	(91)
四. 杂交	(91)
五. 漂洗探针	(92)
六. 抗体反应与显色反应	(95)
第三节 原位杂交结果的定量分析	(97)

一. 信号强度的数量化	(97)
二. 讨论	(98)
第四节 原位 PCR 法的应用	(98)
一. 原位 PCR 法的操作	(99)
二. 直接原位 PCR 法	(101)
三. 原位逆转录 PCR (RT-PCR) 法	(100)
第五节 自动化原位杂交	(101)
一. 杂交步骤	(101)
二. 切片的预处理	(102)
三. 原位杂交	(103)
四. 洗去多余的探针	(104)
五. 抗体反应与显色反应	(104)
后记	(105)
附录一. 参考文献	
附录二. 索引	
附录三. 照片及说明	

第一篇 入门

第一章 操作技术、技巧,试剂

1988年DIG标记检测试剂盒作为非放射性同位素标记试剂首次问世时,是生物素-卵白素系统处于替代放射性同位素核酸检测试剂的全盛时期。DIG系统仅是名不见经传的后来者,而今却作为敏感性最高的核酸检测系统受到广泛应用。下面简单介绍该系统的特点及操作中需注意的问题。

1. 需要测定标记效果。
2. 杂交条件要求高。
3. 只能用有限几种滤膜。
4. 抗DIG抗体效价不够高。
5. 随探针不同,最佳条件各异。

为解决以上问题,要注意:

1. 必须进行查核,可用地高辛定量及对照试纸条与对照探针进行比较后再行杂交。试剂盒包含具有活性的酶,操作时要小心。

2. 由于碱基被修饰,核酸的 T_m 值也发生了变化。所以,杂交最佳条件范围比放射性同位素者要窄得多。

3. 有的滤膜、切片容易吸附抗体和探针。宝灵曼公司、Du Pont公司与Tropix公司的比较好,但随批号不同也有差异。

4. 由于DIG是半抗原,抗体效价不高。所以,过量或长时间使用阻断剂或漂洗,均会使信号减弱。

5. Taq 多聚酶、RNA 多聚酶的标记效果差,可能与立体障碍有关,这种情况下,有时需过量酶才能标上。

因此,要想提高敏感度需要一定的训练并接受实验精通人员的指点。新手与老手的差别就在于参与实验时间和下工夫的多少。希望本书能起到对新手读有所得,对老手不断提高的效果。

第一节 基本实验操作技术

一. 正确使用微量加样器

加样器使用不当不仅容易引起疲劳,也造成加样量不准确。正确的做法是,身体稍倾向实验台,将吸嘴放到眼睛最易看到之处。熟练者拿加样器,姿势宛如抱婴。

用加样器吸溶液时,忌将吸嘴插入溶液太深。将溶液放到试管(离心管)内时,吸嘴要靠在管壁上,以此为支撑点,使之稳定注入(最好注到原溶液面附近)。用左手食指压于装吸嘴处,使加样器稳定,吸嘴顶端就不致乱动。

二. 用加样器准确吸、加溶液

不要只相信加样器上的刻度,吸液后须用眼观察吸嘴内的液量,确认取液量正确。人眼能非常准确估计液量,只要稍加注意、积累经验就能很容易地确定 $1\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 。考虑到加样器使用是否正确,吸嘴是否牢固,以及溶液的粘度、表面张力、蒸气压等因素,加样器上的刻度只能是一个“大概量”。

在分装高粘度溶液(如 Triton X-100、Glycerol、Tween 20、Dextran sulfate 等)时要用微量注射器,从注射针打出的

量是正确的。如排除气泡,1ml 的塑料注射器,可精确定量至 $\pm 50\mu\text{l}$ 。有时此法比微量天平称量还要准确。

使用易挥发液体时更要注意。用 1ml 的吸管试吸 $500\mu\text{l}$ 乙醇便可明白。用加样器吸取乙醇再吹出时就会有气泡产生,这是因为溶液在吸管内蒸发,使气相乙醇的体积增加。在吸管内反复吸入、吹出几次后,气泡不再出现,这时吸管内已被该溶液的蒸气饱和,此时再吸入 $500\mu\text{l}$ 就会准确。在吸取氯仿、乙醚等挥发性强的液体时,更要注意这一点。

三. 离心沉淀

一般情况下,放在离心管内的酶等试剂量很少。加上在低温下保存的试剂水分会蒸发,在盖上形成露珠。启盖时,手会接触溶液造成污染,溶液浓度也会变化而不正确。所以,在用前一定要用微量离心机离心数秒,使液体集中于底部。

四. 搅拌、混合

有的研究者不管混合什么都用振荡器(混旋器)剧烈振荡,即使溶液溅到管外也不在意。实际上,DNA 多聚酶系列的酶很容易由于氧化而失活,故应慎重对待。混合时有人用吸管在试管中搅动,还有人在试管侧面弹击,但应考虑这些方法的效果。因为这些方法会由于人为因素而影响结果,再现性较差。最切实可行的方法是:将溶液吸入吸管,慢慢地吹出,注意不要产生气泡,重复几次,就可将 $100\mu\text{l}$ 溶液混匀。在溶液多时,将试管上下颠倒几次也可,不过试管底部混合效果仍稍差。这时,可用振荡器。

五. 加热与蒸发

反应温度高,或反应液量少而试管容积过大时,蒸发很明显。这时因溶液的浓缩,盐浓度、pH 等的变化会使反应效果

变差。仅将试管底部放入水浴槽中时,蒸发也会很明显。所以,在需进行长时间加温反应时,应将整个试管沉入水面下,或在气相恒温浴槽内进行反应。

六. 酚提取

将等量的酚或酚-氯仿溶液加入反应溶液中,盖好盖子,在振荡器上剧烈振荡数秒,使溶液成为乳白色混浊液,在4℃下或室温离心。如溶液含有 SDS,最好在室温进行。离心后,取上清时动作要轻,一直吸到中间层上方。如不慎吸入混浊的中间层,必须将全液重复离心,不能只吹出混浊部分。

七. 乙醇沉淀

向 DNA、RNA 溶液加入 NaCl、NaOAc (醋酸钠)、 NH_4OAc (醋酸铵)等。然后再加入 3 倍容积的乙醇(不冷却到-20℃也可)。如核酸量少于 5 μg 而很难确认时,可加入 20 μg 的糖原(无 DNA 及 RNA 酶的糖原,有市售)。这时,为使溶液均匀混合,需用振荡器剧烈振荡。离心后在室内荧光灯下观察,确认有无沉淀形成。吸取上清时将吸嘴尖端对向沉淀对面的液深面,随液面的下降将吸嘴移向试管底。干燥沉淀时,先用 70%乙醇,再用 100%乙醇洗净。尔后离心沉淀,用小吸嘴将剩余乙醇几乎全部吸去,风干约 5 分钟。

八. 沉淀的溶解

本操作很重要,核酸沉淀在低盐浓度下,迅速膨胀、湿润,进入易溶状态。若用振荡器剧烈振荡,浮起的沉淀会附于试管内壁反而更难溶解。给沉淀加上高压灭菌蒸馏水(DEPC 处理水)或 1mmol Tris-HCl 或 0.1mmol EDTA,等待沉淀的膨胀湿润,其后用吸管轻轻地吸入、吹出数次的方法较好。

染色体 DNA 等完全膨胀湿润费时很多,溶解后粘度也

高,故很难溶解。若是探针,是否完全溶解直接影响杂交效率,所以要认真操作使 DNA 完全溶解。完全溶解后加入 $10\times TE$ 等缓冲液可使核酸稳定。

九. 核酸定量

在 260nm 或 280nm 测定吸收率,需同时做琼脂电泳,用标准浓度的核酸进行比较。加上电压后被测物不能进入琼脂或泳道两侧见有侧线者均表示有不纯物质混入。260nm 吸收值与电泳值有差异时,后者更接近真实值。

十. 手套、口罩的使用

在分子生物学实验室,常可见到戴着口罩和手套,甚至身穿隔离衣的工作人员。这一般并不是由于该实验室有可怕的病原体,而是为了防止人的汗液、唾液,或泪液中所含有的高活性 RNA 酶混入实验器皿或溶液。这一点需要在操作时特别注意,多加小心。**严禁裸手(不戴手套)触摸试管!**这是常识,但也不要过分苛求。作者曾用 $100\mu l$ 的 RNA 溶液($2.5\mu g/\mu l$ Total RNA)放入 DEPC 处理水中,加 $1\mu l$ RNA 酶抑制剂后加入汗液、唾液或泪液, $4^{\circ}C$ 处理 20 分钟,再行 Northern 杂交,结果与未作此处理者无差异。可是在加上实验室水浴槽水或垃圾后,即使加优质的 RNA 酶抑制剂也不能防止 RNA 的分解。

这么说,就可以不戴手套做实验吗? 如果这样,一定会增加 RNA 分解的可能性,最后绝对破坏整个实验体系。即使戴手套,其表面也非绝对干净,一旦用手接触加样器、笔、房门拉手或水浴槽,其表面即被污染。应该认识到:最可怕的是吸嘴顶端、缓冲液、溶液被污染。最理想的状态是像手术时的外科医生那样,在操作中除规定的几种东西以外,什么也别碰。

实验室的教育要从考虑某一操作是什么原理开始。

十一. 禁止事项

研究室管理要保证严禁以下事项发生,一旦发觉违犯,须严厉批评。

1. RNA 酶、protease(蛋白酶)粉剂在室内开瓶(必须在室外打开)。

2. 用精密天平称量 RNA 酶、protease、SDS (sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠)。(要相信包装瓶(盒)上所标注的含量,在室外溶解)。

3. $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上浓度的 RNA 酶溶液在实验室内放入下水道(要扔进厕所并冲洗容器)。

4. 称量特级试剂(优级纯)时,将过量试剂重新放回瓶中(要扔掉)。

5. 存放标记(使用人、内容物等)不明的液体,(一经发现,立即扔掉)。

6. 直接将吸嘴插入市售药瓶中吸取试剂(要先分装)。

7. RNA 实验区内带入其它试剂。

十二. 熟练的研究人员

熟练的研究人员应具备以下几点:

1. 在实验系中加入阳性对照。阳性对照就是说只要方法正确,一定能成功的实验部分。即使乍看无阳性对照的实验,稍用心就可找到相应对照材料。

2. 能将对照有机地分解组合。

3. 有把重要的实验部分重复进行的计划。

4. 不成功时,结合阳性对照,能找到原因。

5. 有检验试剂的能力,能向公司索赔。