

## 研究工作

# 细胞内 RNA 的原位杂交

王敦瑞 陈季 汪肖钢 于丽莉 陈诗书

(上海第二医科大学生物化学教研室, 医学分子生物学实验室)

### 提 要

本文介绍用原位杂交方法测定细胞内的 RNA。该方法特异性较高, 能保持细胞的完整性。我们测定了不同细胞的 rRNA 基因的转录和原癌基因 c-myc, c-H-ras 的转录, 取得了较满意的结果。RNase 处理细胞或质粒 pBR322 作探针, 细胞中显影颗粒很少。本文对原位杂交方法学进行了初步的讨论。

细胞原位杂交可直接在组织、细胞上对核酸进行定量分析。我们根据本实验室条件, 参考并改进了文献<sup>[1]</sup>方法, 对不同细胞中的 rDNA 和原癌基因 c-myc、c-H-ras 的转录, 进行了测定。该方法操作比较简单, 杂交后细胞形态好, 特异程度较高, 可直接观察单个细胞的基因表达情况, 并在细胞水平上作相对定量。我们认为这是一种较好的细胞内检测 RNA 的方法。

## 材 料 与 方 法

### 一、载玻片和盖玻片的预处理

#### 1. 载玻片的预处理

载玻片于清洁液中浸泡过夜, 清水冲洗, 无水乙醇脱水, 晾干。再浸入  $3 \times \text{SSC}$  ( $450 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $45 \text{ mmol/L}$  柠檬酸钠,  $\text{pH} 7.4$ ),  $1 \times \text{Denhart's}$  溶液 ( $0.02\%$  聚蔗糖,  $0.02\%$  聚乙烯吡咯烷酮,  $0.02\%$  牛血清白蛋白) 混合液中  $65^\circ\text{C}$  3 小时, 双蒸水冲洗片刻,  $3:1$  乙醇/冰乙酸固定 20 分钟, 置阴处晾干。经上述处理的载玻片收入玻片盒内备用。

#### 2. 盖玻片的洗涤与硅化

盖玻片浸泡于  $0.2 \text{ mol/L HCl}$  中 20 分钟,

清水冲洗, 无水乙醇脱水, 晾干。用硅化液 ( $1\%$  二甲基二氯硅烷的氯仿溶液) 浸泡片刻后取出,  $180^\circ\text{C}$  烘 2 小时。硅化后的盖玻片可防止其对组织、细胞的粘附作用。

### 二、探针及其同位素标记

探针为 1. 28S 核糖体基因 DNA ( $4.8 \text{ kb}$ , SalI 和 EcoRI 片段插入 pBR322), 2. c-H-ras DNA ( $6.6 \text{ kb}$ , BamHI 片段插入 pBR 322), 3. c-myc DNA ( $1.6 \text{ kb}$ , ClaI 和 EcoRI 片段插入 pBR322), 4. pBR322 ( $4.3 \text{ kb}$ )。探针回收<sup>[2]</sup>后, 用随机引物 DNA 标记探针 (Boehringer Mannheim 药盒),  $^3\text{H}$  dCTP ( $50 \text{ Ci/mmol}$ , Amersham 公司)。反应终止后用 Sephadex-G75 分子筛层析分离所标记的  $^3\text{H}$ -DNA。比放射性为  $2-3 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ 。

### 三、细胞的处理

细胞悬液经  $1000 \text{ r/min}$  离心 5 分钟后, 用 PBS 洗 2—3 次, 制成新的细胞悬液 ( $10^7$  个细胞/ $\text{ml}$  悬液), 混匀后取  $15 \mu\text{l}$  滴于载玻片上, 通过简易细胞离心装置  $1000 \text{ r/min}$  离心 30 秒。离心后的细胞能比较均匀和牢固地附在玻片上, 细胞形态保持完好。将上述载有细胞的玻片置于  $3:1$  乙醇/冰乙酸中, 室温下固定 15 分

钟,转移至无水乙醇5分钟,双蒸水洗涤片刻,然后依次作如下处理:0.2mol/L HCl 室温20分钟,2×SSC 70℃ 30分钟,蛋白酶K混合液(1μg/ml 蛋白酶K,200mmol/L Tris·HCl pH7.4,20mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 37℃ 15分钟,70%,95%乙醇脱水,晾干。

#### 四、RNase 处理细胞

载有细胞的载玻片按上处理,在70%,95%乙醇脱水前用 RNase (100μg/ml), 2×SSC (300mmol/L NaCl, 45mmol/L 柠檬酸钠) 37℃ 作用2小时,然后再经乙醇脱水,作阴性对照。

#### 五、杂交

杂交液新鲜配制:50% 去离子甲酰胺,10mmol/L Tris·HCl (pH7.5),1mmol/L EDTA,600mmol/L NaCl,10×Denhart's 溶液,变性鱼精 DNA (100μg/ml) 和 tRNA (250 μg/ml),标记的探针 (1×10<sup>6</sup> cpm/ml)。将杂交液加热 95℃ 5分钟,使 DNA 变性,迅速放入冰浴中冷却。取 20—40μl 杂交液滴于载玻片上,轻轻盖上硅化过的盖玻片,边缘用石蜡密封,以防杂交液蒸发。然后将玻片移入杂交箱(图1,底部存有 2×SSC 液,可保持一定湿度,以防止杂交液蒸发)。37℃ 保温 42 小时。

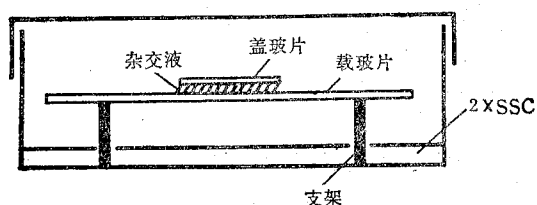


图1 原位杂交盒示意图

#### 六、杂交后洗涤

杂交结束后,轻轻移去盖玻片,2×SSC 洗涤载玻片片刻,在50%甲酰胺,2×SSC 混合液中 37℃ 轻轻振荡30分钟,共三次。然后换用50%甲酰胺,1×SSC 混合液,37℃ 30分钟,共三次。最后用1×SSC,20℃ 轻摇三次。70%,95%乙醇脱水晾干。

#### 七、放射自显影

暗室条件下,40℃ 水浴溶解核-4乳胶(中

国科学院原子能研究所)取出1ml,加入95μl 6-甘-醇和42μl 2% 铬矾<sup>[3]</sup>混匀。6-甘-醇配方为6-硝基苯并咪唑(1/600溶液,用1:1乙醇水溶液配制)3.8ml,1:2甘油水溶液5.3ml。杂交后玻片在暖箱内涂上述溶液(40℃,相对湿度为90%)。待乳胶均匀干燥后放入密封的暗盒内保存(盒内放干燥剂,4℃),曝光时间根据实验情况。

曝光结束后,玻片经显影(D-19b),定影(F-5)和大量水冲洗后,用H. E. 方法染色,在显微镜下分析结果。

## 结 果

### 一、测定细胞内 28SrRNA

用<sup>3</sup>H标记的28SrRNA的基因,检测该基因在NIH3T3及Raji细胞的转录产物(表1,图2见封二)。结果表明,28SrRNA在这些细胞中表达明显,杂交银粒主要集中在细胞浆内。用RNase处理后,银粒明显减少,说明探针DNA确实与RNA杂交,用pBR322作阴性对照,结果显示细胞内基本无银粒,说明银粒代表的杂交产物是特异的。

### 二、测定不同细胞株的原癌基因的表达

表1 NIH3T3 和 Raji 细胞中28S核蛋白体RNA 基因转录

| 细胞名称   | 28S         | 28S+RNase  | pBR322     |
|--------|-------------|------------|------------|
|        | 银粒/细胞       | 银粒/细胞      | 银粒/细胞      |
| NIH3T3 | 60.35±29.51 | 4.08±2.54* | 3.52±2.76* |
| Raji   | 58.85±28.54 | 5.20±3.35* | 3.12±2.76* |

n = 200 \*P<0.01 (和相应28S数据比较)

表2 HL60, Raji 及上皮细胞中 c-myc, c-H-ras 转录水平测定

| 细胞名称 | c-myc      | c-H-ras     | pBR322     |
|------|------------|-------------|------------|
|      | 银粒/细胞      | 银粒/细胞       | 银粒/细胞      |
| HL60 | 20.74±8.70 | 12.42±6.65  | —          |
| Raji | 12.42±6.65 | 13.12±11.10 | 3.12±2.76* |
| 上皮细胞 | 2.5±2.5*   | 1.61±1.60*  | 2.2±2.2    |

\* P<0.01 (上皮细胞 c-myc 和 c-H-ras 数据与 HL60, Raji 细胞相应数据比较; pBR322 的数据分别与 c-myc 和 c-H-ras 数据比较)

用  $^3\text{H}$  标记 c-myc 和 c-H-ras 探针,测定 HL-60, Raji 细胞中原癌基因的转录,并用正常人原代上皮细胞作对照(表 2, 图 3 见封二)。

## 讨 论

原位杂交技术可在保持细胞形态完整的情况下对核酸 (DNA 或 RNA) 进行测定。与 Northern 印迹法和 Southern 印迹法比较,该方法无需进行核酸的提取和酶解。它可以对同一组织中不同细胞的核酸进行定性定量分析。如研究基因活化的程度和病毒感染的情况等。该方法特异性较高,可用于非多拷贝基因的染色体定位和 mRNA 转录物的研究。其次,利用双标记方法,还能同时测定两种物质。从方法学角度来看,样品的需要量少 ( $10^5$  个细胞即可),长时间组织、细胞适当的保存并不影响结果。用  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$  或生物素等均可标记探针,实验的分辨率较高,探针用量也不多。

我们对不同细胞的 rRNA 和特异的 mRNA 进行检测,结果较满意。在测定 rRNA 基因转录物时,用 pBR322 作阴性对照。另一组细胞用 RNase 处理。实验组和两个组对照差异明显。结果显示 28SrRNA 在 Raji (人)和 NIH 3T3 (小鼠)细胞中均有明显表达。而 pBR322 作探针,两种细胞基本无银颗粒。说明这两种杂交是特异的。我们用 c-myc 和 c-H-ras 两种探针,测定了这两种原癌基因在 HL60 和 Raji 细胞中的转录。我们还选用正常人的原代上皮细胞作阴性对照。结果表明,两种癌基因在 HL60 和 Raji 细胞中的转录,程度不一,与快速印迹法分析的结果相似<sup>[4]</sup>。正常人上皮细胞,杂交后银粒很少。和 HL60、Raji 细胞相比较,差异亦显著。我们用原位杂交方法还对 3 例分化不同的胃癌细胞株和 5 例胃癌组织进行了测定(另文发表),发现 H-ras 癌基因在这些样本中转录程度高。转录呈异质性,即不同癌细胞 H-ras 转录情况不一,正常组织的某些炎性细胞也有 H-ras 的高度转录。

原位杂交测定细胞内基因的转录物表达,属半定量的工作。除实验因素,如曝光天数,固

定条件外,细胞株中每个细胞的不同生长情况都会影响到实验的结果。故每次实验重复二至三次都是必要的。

我们认为,以下几点是做好细胞原位杂交实验的关键。

1.  $^3\text{H}$  DNA 进行杂交,分辨率高,但实验周期往往较长。我们用比放射性高,片段小的探针,可缩短曝光时间,增加实验效果。我们曾用 Nick Translation 法标记  $^3\text{H}$  DNA, 比放射性只在  $10^5$ — $10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$  水平,标记后变性片段较大。改用随机引物标记法后,放射性提高一个数量级,片段变小 (80—120b. p.), 以利于探针穿透细胞膜,实验周期明显缩短。

2. 传统方法在杂交后,采用比较多的洗脱液和较长时间 (72 小时) 洗去游离的放射性探针。由于时间长,试剂消耗多。我们曾改用 10 升  $2\times\text{SSC}$  冲洗 5—6 小时,可洗去一部分本底,但效果仍不太好。采用目前方法,大部分本底可去除。操作时一般在摇床上进行,缓缓摇动,以防止玻片上的组织或细胞脱落。另外,玻片、盖玻片的预处理,都是减少本底的措施。

3. 整个实验中需防止 RNA 的降解。所以做实验时均带手套操作。标本缸,试剂瓶等均  $180^\circ\text{C}$  烘烤 3 小时,实验时采用新鲜材料,制好的细胞玻片若需保存,可将玻片用 3:1 乙醇/冰乙酸固定后,放入 70% 乙醇中,  $4^\circ\text{C}$  保持二月后,杂交效率仍不变。

4. 做好原位杂交应注意选择合适的固定剂。细胞固定后,操作过程较长,细胞形态的维持易受影响。探针对细胞的穿透力可由于细胞的固定方法不同而异。3:1 的乙醇/冰乙酸在原位杂交中应用较多,效果也较好,但固定时间不能太长,否则会影响细胞形态。

## 参 考 文 献

- [1] Michel, B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978, **75**, 6125.
- [2] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 88.
- [3] 刘鼎新:《放射自显影》,科学出版社,1986,8.
- [4] 唐建清,陈诗书:《实验生物学报》,1988, **21**(2), 199—206

[本文于 1988 年 5 月 18 日收到]

“细胞内 RNA 的原位杂交”一文的附图2,3

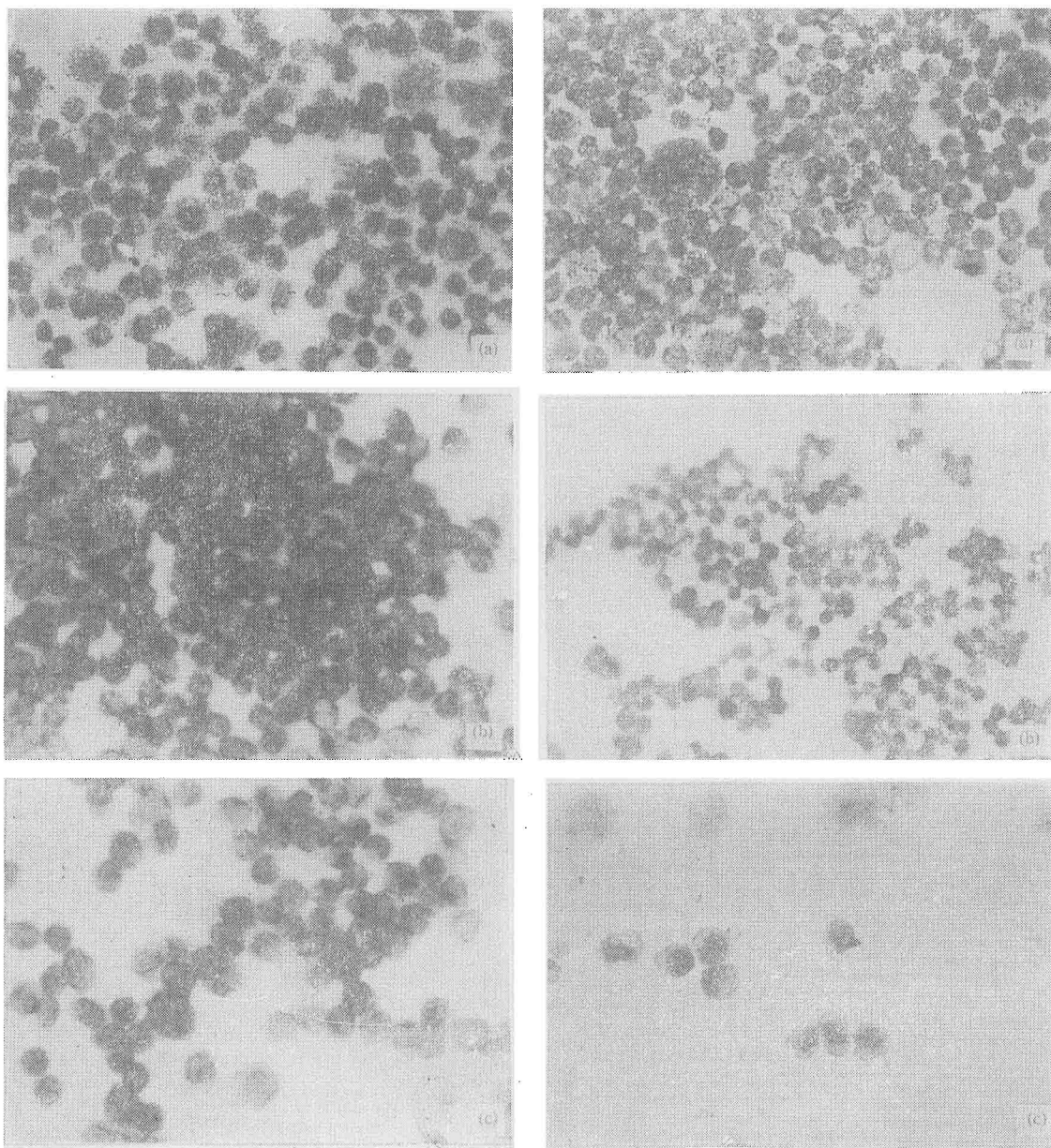


图2 原位细胞杂交测定 Raji 细胞中 28S rRNA

(a)、(b)探针为  $^3\text{H}$ 28S rDNA, (c)探针为  $^3\text{H}$  pBR322, (b)用 RNase 处理。曝光三周, 放大 250 倍

图3 原位杂交测定细胞中原癌基因表达

(a) HL60 细胞, 探针为 c-myc; (b) Raji 细胞, (c) 人原代上皮细胞, (b)、(c) 探针为 c-H-ras。曝光三周, 放大 250 倍