

# 以反意义 RNA 为探针的原位杂交组织化学方法

马维骏 杨胜利 邹冈

(中国科学院上海药物研究所)

## 提 要

原位杂交组织化学方法是在组织及细胞水平上研究基因表达及调控的重要方法之一。我们利用一个由体外转录产生的与小鼠阿黑促皮原 (POMC) mRNA 顺序互补的反意义 RNA 为探针,直接在大鼠垂体的组织切片上进行杂交反应。结果表明,杂交在反意义 RNA 探针及 POMC mRNA 之间进行,并形成稳定的杂交分子。放射自显影影像显示出垂体中 POMC mRNA 的分布及相对含量。

**关键词** 原位杂交,反意义 RNA 探针,垂体,阿黑促皮原

基于碱基配对原则的核酸杂交技术已被广泛地用于神经、内分泌、免疫和生殖等系统中特异 mRNA 的分布和含量的研究。虽然 Northern 杂交、打点杂交、液相杂交都不失为研究基因表达的调控机制的有效检测手段,但对于由多种形态和功能各异的细胞组成的组织和器官来说,以上几种方法难于对可能散布于其中的部分甚至单个表达特异基因的细胞进行研究。为克服这一局限,出现了可以直接在组织切片上进行特定种类 mRNA 杂交的所谓“原位杂交”方法<sup>[1]</sup>。由于这一方法同时具有组织化学的特色,又称做“原位杂交组织化学”方法。近年来,一些实验室已经成功地用这一方法对组织中特异 mRNA 的定位和调控进行了研究<sup>[2-5]</sup>。本实验室建立了这一方法,并运用于 POMC mRNA 在垂体前叶及中叶中的分布及含量的检测。为提高检测灵敏度,使用了反意义 RNA 探针。这种探针用于核酸杂交具有特异性好、比活性高、本底低的优点。探针是用体外转录反应<sup>[6]</sup>酶促合成的。所得杂交结果与文

献报道的用互补 DNA 探针或寡聚核苷酸探针得到的结果<sup>[1,7-9]</sup>相符。

## 材 料 和 方 法

### 一、动物及组织制备

雄性 Spraque-Dawley 大鼠 (250g, 上海实验动物中心),腹腔注射戊巴比妥钠 (150mg/kg) 麻醉,经心脏灌流 0℃ 生理盐水 500ml,然后换用甲醛灌流液 (4% 甲醛, 5% 蔗糖, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 500 ml。取出垂体,置 4% 甲醛溶液中,固定 1h 后,转入 15% 蔗糖溶液 (0.02 mol/L 磷酸缓冲生理盐水配制), 4℃ 放置过夜。组织块用干冰冷冻,在 -20℃ 的冰冻切片中切成 10 μl 厚的片,贴在预先经多聚赖氨酸处理过的载玻片上, -40℃ 低温保存。

### 二、反意义 RNA 探针的制备

pSP65-P1 质粒 (S. J. Watson 赠送) 的启动子下游 EcoR I 与 Hind III 位点之间含有倒转的小鼠 POMC mRNA 片段。此质粒用限

8 朱俭等. 生物化学实验. 上海: 上海科技出版社, 1981: 186—190

9 VaLentin M *et al.* *Journal of Applied Biochemistry*, 1983; 5:420—428

10 Muzzarelli R A A. *Chitin*, Oxford: Pergamon Press, 1977:105—149

[本文于 1989 年 7 月 14 日收到]

制性内切酶 Hinf I 彻底水解, 所得片段做为转录的模板, 以  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -UTP (Amersham) 和另三种非放射性核苷三磷酸为底物, 按照 D. A. Melton 的方法<sup>[6]</sup>进行体外转录。酶促合成的放射标记反意义 RNA 探针的比活性达  $2.5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  以上。产物经装在 0.5 ml 小试管内的 Sephadex G-50 柱分离, 收集第一个有放射性的洗脱峰做为探针溶液。此探针片段约含 280 个核苷酸, 顺序与 POMC mRNA 中编码  $\beta$ -促黑激素、 $\beta$ -内啡肽和 3' 不翻译区域互补。

### 三、原位杂交

参照 M. E. Lewis 等的方法<sup>[9]</sup>。载玻片移至室温平衡 30 分钟, 在边缘点一滴指甲油, 干透。用于支撑盖玻片。载玻片放入预先经干冰-乙醇混合物降温至  $-70^\circ\text{C}$  的 95% 乙醇中 10min, 再用室温下的 80%, 70%, 50% 乙醇和重蒸水依次浸洗 3min。转入 0.2 mol/L 盐酸浸 20 min, 再换  $2 \times \text{SSC}$  溶液 ( $1 \times \text{SSC} = 0.15$  mol/L 氯化钠 + 0.015 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.2) 浸泡 10min 后取出, 每一组织切片上各加 50  $\mu\text{l}$  预杂交液 (20 mmol/L 磷酸缓冲液,  $1 \times \text{Denhardt's}$  溶液, 10% 硫酸葡聚糖, pH 6.5), 于  $50^\circ\text{C}$  保温 1.5h。除去预杂交液。

取适量探针溶液用杂交缓冲液 [50% (V/V) 甲酰胺, 10% 硫酸葡聚糖,  $1 \times \text{Denhardt's}$  溶液, 酵母 tRNA 1mg/ml,  $3 \times \text{SSC}$  溶液] 稀释至  $1-4 \times 10^6$  cpm/ml。每一组织切片上各加 50  $\mu\text{l}$  上述杂交液, 盖上盖玻片, 四周边缘用少量液体石蜡密封,  $50^\circ\text{C}$  保温 40h。

将载玻片放在氯仿中浸泡两次, 清除液体石蜡后取出。待氯仿挥发干后, 浸入  $2 \times \text{SSC}$  溶液中, 小心揭下盖玻片, 浸洗 10 min 取出。每一组织切片上各加 50  $\mu\text{l}$  RNA 酶 A 溶液 (500 mmol/L 氯化钠, 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, RNA 酶 A 0.1 mg/ml, pH 8.0),  $37^\circ\text{C}$  保温 1h。将载玻片转入  $2 \times \text{SSC}$  溶液中,  $50^\circ\text{C}$  10 min, 换成  $1 \times \text{SSC}$  溶液 10 min, 再换成  $0.5 \times \text{SSC}$  溶液 1h, 然后移入室温下的  $0.5 \times \text{SSC}$  中 10min, 取出晾干。

将载玻片的指甲油斑点除去, 放入 X 射线

暗匣中, 上覆 X 光片 (上海医用 X 光片), 压紧置低温冰箱。选择适当的曝光自显影时间, 使影像的密度处于 X 光片的线性密度范围内。冲洗, 定影后的 X 光片上的图像的局部密度值用 Videodensitometer Model 620 (Bio-Rad) 光密度计扫描得出。

## 结 果

### 一、原位杂交

反意义 RNA 探针与垂体中叶有极为显著的杂交 (图 1), 这一区域富含 POMC mRNA<sup>[1,7-9]</sup>; 垂体前叶显现出弱的杂交。中叶与前叶的影像光密度值之比为  $10.5 \pm 0.95$  ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n = 4$ )。垂体后叶几乎观察不到杂交。这一结果表明, 反意义 RNA 探针在垂体组织切片上的杂交具有解部分布特异性, 这种特异性分布与 POMC mRNA, POMC 衍生肽在垂体中的分布一致<sup>[1,7-13]</sup>。

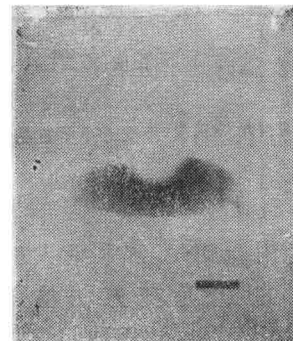


图 1 POMC 反意义 RNA 探针与垂体冠状切片杂交的放射自显影图像短线长度代表 1mm

### 二、竞争实验

为检验杂交特异性, 垂体切片先与非标记的反意义 RNA 探针杂交, 再与  $^{32}\text{P}$  标记的探针杂交, 仅显示极弱的杂交影像。

### 三、杂交分子的热稳定性

RNA-RNA 杂交分子的热稳定性用解链温度 ( $T_m$ ) 表示。它取决于 (G + C) 含量、盐浓度、杂交链长度和碱基误配率。控制其它因素不变, 碱基误配率决定了热稳定性, 因而用  $T_m$  值测定方法来检验是否是特异性杂交。组织切片经杂交并放射自显影后, 分别置于一系

列不同温度的  $0.5 \times \text{SSC}$  溶液中浸洗 1h, 再次放射自显影, 测定解链前后所得的两张 X 光片上中叶影像的光密度值, 计算并描出解链曲线(图 2), 呈 S 形,  $T_m$  值约为  $81^\circ\text{C}$ 。

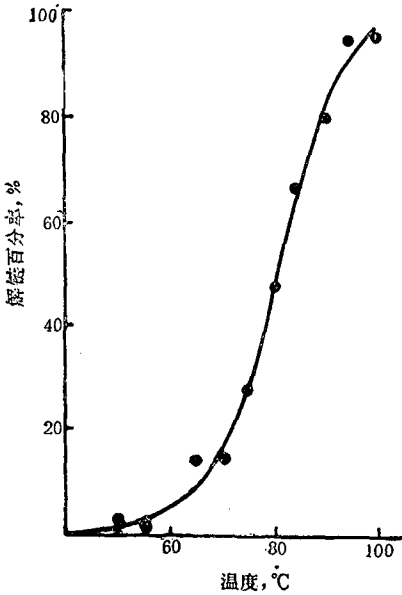


图 2 RNA-RNA 杂交分子解链曲线

## 讨 论

文献报道用 cDNA 片段和人工合成寡聚核苷酸为探针的原位杂交方法检测垂体中 POMC mRNA<sup>[1,7-9]</sup>。这里我们使用反意义 RNA 探针得到了满意的结果。

杂交的特异性由以下几方面检验。首先, 杂交显示的解剖分布与已知的 POMC mRNA 和 POMC 衍生肽在垂体中的分布完全符合。大鼠垂体中叶细胞都表达 POMC, 在垂体冠状切片与 POMC 的反意义 RNA 探针杂交后得到的放射自显影图像上, 整个半弧形的中叶区域影像密度很高, 显示中叶富含 POMC mRNA。处于中叶下侧的前叶, 只有少量散在的促皮质激素细胞表达 POMC, 影像密度低得多。后叶处于弧形中叶的内侧, 几乎见不到杂交的迹象, 此处不表达 POMC。其次, 用非标记的反意义 RNA 探针预先饱和特异的 mRNA, 也反映杂

交的特异性。因为与潜在的非特异性“杂交”位点相比, 特异性 mRNA 在数量上只是很小一部分, 只有杂交是特异的, 才能被预饱和和处理所阻止。此外, 对杂交分子的热稳定性的研究也说明了它的特异性。垂体中叶 RNA-RNA 杂交分子的  $T_m$  值经测定为  $81^\circ\text{C}$ 。常见含一、二十个碱基的寡聚核苷酸单链探针形成的杂交分子的理论及实测  $T_m$  值都大大低于这个数值。对于所用的长达两百多碱基的反意义 RNA 探针所形成的杂交分子, 没有合适的公式推测其理论  $T_m$  值并与实验值相比较, 然而这个数值本身就反映出这一杂交分子具有很好的热稳定性。更重要的是, 由图 2 曲线看出双链杂交分子在  $70^\circ\text{C}$  时开始解链。随着温度上升, 双链分子到单链分子的转化程度急剧增加,  $81^\circ\text{C}$  时有 50% 的杂交分子解链。  $90^\circ\text{C}$  以上这一过程趋于完成。反映这一解链过程的明显的 S 形解链曲线正是 RNA-RNA 杂交分子的特性之一, 进一步证实杂交形成的是特异的 RNA-RNA 杂交分子。解链温度的测定, 不仅对确定杂交特异性有作用, 而且便于选择合适的杂交和漂洗温度, 以便最大限度地消除非特异结合的影响。

RNA 酶水解处理, 能降解切片中的各种单链 RNA。杂交以后形成的双链 RNA 杂交分子很稳定, 能抗 RNA 酶降解。经 RNA 酶处理的切片, 其中的单链 RNA 包括过量的探针 RNA 被降解, 便于漂洗除去, 减少非特异性吸附, 降低本底。这是使用单链 RNA 探针的长处之一<sup>[2,4,14]</sup>。

利用近年来广泛使用的简单而有效的 SP6 体外转录系统, 可合成各种单链 RNA<sup>[6]</sup>。原位杂交组织化学中, 单链 RNA 探针比 cDNA 探针更具优越性。由于不存在双链探针的自身退火问题, 单链 RNA 探针比双链 DNA 探针杂交效率更高<sup>[6,14]</sup>。体外转录反应对核苷三磷酸底物的利用率很高, 只要加入足够量的放射标记的底物, 就可以使酶促合成的 RNA 探针达到很高的放射比活性, 从而提高检测灵敏度<sup>[2,4,6]</sup>。

RNA-RNA 杂交分子的稳定性高于 DNA-RNA 杂交分子,并且简便易得的 RNA 探针比寡聚核苷酸探针长得多,这就有利于使用严格的杂交条件。

垂体中 POMC mRNA 含量用杂交后放射自显影的光密度值表示。通常控制放射自显影的曝光时间(一般 1 至 4 天)使影像最大密度不超过 1.0 OD,此范围内我们所用 X 光片上的影像光密度与放射性强度成较好的线性关系。测定结果显示垂体中叶与前叶 POMC mRNA 含量之比略大于 10,比 Civelli 等<sup>[15]</sup>用液相杂交法得到的结果偏低,主要是由于前叶影像的光密度值很低而引入的误差。

放射性同位素 <sup>32</sup>P 发出的硬 β 射线能量高,散射比较严重。因此用 <sup>32</sup>P 标记的探针得到的杂交影像分辨率低,难以达到单个细胞水平。只有使用放射性同位素 <sup>3</sup>H 标记的探针才可以获得高分辨率的影像,才可以在单个细胞水平

上观察特异 mRNA 的分布及变化。

## 参 考 文 献

1. Hudson P *et al.* *Endocrinology*, 1981; 108: 353
2. Siegel R E, Young W S. *Neuropeptides*, 1985; 6(6): 573
3. Sherman T G *et al.* *J Neurosci*, 1986; 6(6): 1685
4. Chesselet M F *et al.* *J Comp Neurol*, 1987; 262(1): 125
5. Rogers K V *et al.* *Endocrinology*, 1987; 121(1): 90
6. Melton D A *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1984; 12: 7035
7. Gee C E, Roberts J L. *DNA*, 1983, 2: 157
8. Kelsey J E *et al.* *J Neurosci*, 1986; 6: 38
9. Lewis M E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 5419
10. Moriarty G C. *J Histochem Cytochem*. 1973; 21(10): 855
11. Moon H D *et al.* *Anat Rec*, 1973, 175(3): 529
12. Pelletier G *et al.* *Endocrinology*, 1977; 100(3): 770
13. Bloom F *et al.* *Life Sci*, 1977; 20: 43
14. Cox K H *et al.* *Dev Biol*, 1984, 101: 485
15. Civelli, O *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257(12): 6783

[本文于 1989 年 7 月 10 日收到]

(上接第 306 页)

并且对产品的某些理化性质及其在酶分析和组织化学中的应用价值进行了系统观察。上述实验结果说明:本实验室建立的 5-IlpPh 的合成方法稳定可靠,产品经提取和重结晶可达到层析纯标准。氢、氮、碳元素分析实际测定数据与理论结构计算值相符合。产品在常温条件下保存具有一定的稳定性。受酶催化特异性好,可以用于 PDEI 分析和组织化学研究。

目前用于检测 PDEI 的苯基磷酸单酯类底物主要有 4-硝基苯酚苯基磷酸酯(4-NPpPh)、4-甲基伞形酮苯基磷酸酯(MUpPh)和 2-萘酚苯基磷酸酯(2-NapPh)。其中 4-NPpPh 和 MUpPh 的水解产物易溶于水,因而只适用于 PDEI 的定量定性分析,不适合酶组织化学研究。2-NapPh 受酶作用分解出的 2-萘酚虽然可与固蓝 B 等结合呈色并原位沉淀。但因固蓝 B 类染料属重氮盐结构,在碱性溶液中很不稳定,易凝集而导致非特异性着色,所以其应用范围也受到限制<sup>[11-13]</sup>。

吗啉酚是一类良好的显色基团,在氧存在

下可发生分子间偶联,形成靛蓝色沉淀。后者在光镜下呈现清晰的紫罗蓝色,在电镜下具有较高的电子密度。因此,5-碘吗啉酚[3]苯基磷酸酯铵盐的合成将为充实和发展 PDEI 的研究方法提供帮助。

## 参 考 文 献

1. Khorana HG. In: Boger RD *et al* eds, *The enzymes*, 2nd ed, New York: Academic Press, 1961; 5: 79—94
2. Razzell WE. In: Colowick Sp *et al* eds, *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, 1963; 6: 236—258
3. 韩刚毅,解放军医学情报,1988;2(3): 133
4. Kelly SJ *et al.* *Biochemistry*, 1975; 14(22): 4983
5. Kelly SJ *et al.* *Biochemistry*, 1977; 16(6): 1102
6. 韩刚毅.生物化学与生物物理进展,1987;(2): 58
7. Ye ZG: *Organophosphorus monomers and polymers*. Chapter, London and New York: Academic Press, 1962: 93—140
8. Rabiger DJ *et al.* *J Heterocycl Chem*, 1970; 7: 307
9. Holt SJ *et al.* *J Chem Soci*, 1958; 4: 1217
10. 韩刚毅.中华医学检验杂志,1988;1: 8
11. Hawley DM *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 129: 522
12. Kelly SJ *et al.* US Patent 4041111, 1977
13. 韩刚毅.化学试剂,1990;12: 42

[本文于 1989 年 6 月 16 日收到]