

电镜原位分子杂交技术及其应用

谢潮添* 杨盛昌 缪颖 陈德海 张平

(厦门大学生命科学院植物基因与基因技术研究所, 厦门 361005)

摘 要 将原位分子杂交技术应用于电镜水平, 观察标记的特定 DNA、mRNA 和 RHA 在细胞和/或组织内的超微结构定位的方法, 称为电镜原位分子杂交技术。本文综述了电镜原位分子杂交技术的建立及其分类, 并详细介绍了非放射性电镜原位分子杂交技术的基本操作程序及注意事项, 最后对电镜原位分子杂交技术的应用做了简要介绍。

关键词 电镜, 原位分子杂交技术, 操作程序

中图分类号 Q-336 文献标识码 C 文章编号 1000-306X(2002)02-0249-04

1 概述

1.1 电镜原位分子杂交技术的建立

Gall G 和 Pardue M (1969)^[1]创立原位杂交 (*In situ hybridization*) 技术以来的 30 年内, 该技术在各个领域得到了广泛应用。但在大部分的研究工作中, 杂交信号都是用光学显微镜进行观察并记录的, 这样在分辨率上就存在很大的限制, 为了对检测的特异核酸进行更精确的亚细胞定位, 以便将组织、细胞和染色体等水平上 DNA 或 RNA 定位与超微结构相互联系起来, 许多学者就试图将其与电镜组织化学技术相结合, 并由此建立了电镜原位分子杂交技术 (Electron microscopic *in situ hybridization*)。

1971 年 Jacob J 等首先进行电镜水平的原位杂交获得成功, 但是超微结构的保存极不理想^[2]。随后很多学者对这一技术进行了改进, Binder M 等 (1986) 用生物素标记的 rDNA 探针及 UI 探针在用 Lowicryl K₄M 低温包埋的切片上进行杂交, 以蛋白 A 和胶体金复合体作为显示系统, 超微结构的保存及杂交效率有了明显的改善, 并获得了较高的信噪比^[3]。Fischer D 等 (1992) 率先采用地高辛作为标记, 金标抗地高辛抗体做显示剂进行原位杂交, 并用银显示法加强, 获得了极为满意的定位^[4]。

目前电镜原位分子杂交技术在国外还处在不断提高和完善的阶段, 而在国内则刚刚起步, 焦仁杰^[5], 梁凤霞^[6], 杨木兰^[7]等都对此技术进行了一定程度的探讨。

1.2 电镜原位分子杂交技术的分类

1.2.1 依标记物的不同分类 电镜原位杂交技术依据其标记物的不同可分为电镜放射性原位杂交技术和电镜非放射性原位杂交技术。

电镜放射性原位杂交技术应用放射性同位素作为标记, 具有敏感性高, 标记物不会干扰杂交反应, 并且结果适合于进行定量分析等特点。常用的几种放射性同位素: ³H, ³⁵S, ¹²⁵I 和 ³²P 都已经被用于电镜原位杂交, 但各有优缺点, 目前应用最广泛的放射性标记物是 ³⁵S。

电镜非放射性原位杂交技术由于无放射性污染, 不需耗时较长的放射自显影过程, 其杂交信号的亚细胞定位甚至比同位素探针好, 因此目前已有取代放射性原位杂交技术的趋势。其中地高辛标记的探针具有操作简便、灵敏度高、背景低等特点, 已成为目前应用最广泛的标记物^[8]。

1.2.2 按操作程序的不同分类 电镜原位杂交技术的操作程序, 它可分为包埋前电镜原位杂交, 包埋后电镜原位杂交和不包埋电镜原位杂交 3 种^[9]。它们也各有优缺点:

不包埋电镜原位杂交技术能最大程度地保存细胞和细胞中的核酸含量, 杂交信号也比较强, 但冷冻过程会在一定程度上损害细胞的超微结构, 包埋前电镜原位杂交技术操作比较容易掌握, 杂交反应不受电镜包埋过程的影响, 细胞的超微结构也比较清晰。缺点是反应产物大小难以控制, 大量反应产物有时会掩盖准确的超微结构定位, 包埋后原位杂交技术在原位杂交前的电镜生物样品处理过程中, 核酸降解量较多, 因此只适合于核酸含量较多的细胞和组织。

2 电镜原位分子杂交技术的基本操作程序

本文只以非放射性原位杂交技术为例介绍电镜原位杂交技术的基本操作程序。

2.1 材料的固定

在电镜原位杂交中, 要获得清晰完整的超微结构图像, 最大限度地保持细胞内的 DNA 或 RNA 分子的完整性, 使探

针容易进入细胞或组织,选择合适的固定剂及固定时间对新鲜的组织迅速固定是至关重要的。

常用的固定剂如戊二醛,甲醛等交联性固定剂能较好地保持细胞和组织的超微结构,也能有效地保存组织细胞中的核酸,但它们会和细胞浆内的生物大分子产生交联,影响探针的穿透力。而多聚甲醛等非交联性固定剂显然对探针具有很好的穿透性,但对核酸及超微结构的保存却较差。因此在实验中应试用不同的固定剂或它们的组合,以探求最合适的固定条件。现在文献中一般多推荐使用4%的多聚甲醛加0.5%的戊二醛作为固定液。

至于固定时间一般认为以2~4h为宜。固定的时间过长会影响探针的穿透力,减小杂交率,过短则会对超微结构产生危害。Jing Y等对鼠肾样品进行不同时间的固定,发现固定4h的样品可以达到杂交信号和超微结构保存的最佳结合^[10]。

2.2 包埋

常规的树脂包埋由于需要高温聚合等处理程序,组织内的核酸可能全部或部分遭到破坏,影响实验结果。因此,在电镜原位杂交技术方面要求采用低温技术如低温包埋和冰冻超薄切片等,后者需要配备冰冻超薄切片机,且技术难度较大,一般较少使用。目前使用较为广泛的低温包埋剂多为乙烯系化合物,如乙二醇甲基丙烯酸酯,Lowicryls,LR White等,其中又以Lowicryls使用最为广泛。

Lowicryls包括K₄M, HM₂₀, K₁₁M, KM₂₃等系列产品,其特点是在低温下保持低粘度和具有在光照下聚合的能力,且其光聚合与温度无关,其中K₄M和K₁₁M具有亲水性,特别适合于电镜原位杂交使用。商品提供的Lowicryls包埋剂由3个部分组成:单体,交联剂和引发剂。调整交联剂的比例,增加交联剂的量,组织块硬度增加。中等硬度的组织块配置比例如下:单体17.30g,交联剂2.70g,引发剂0.10g。包埋时,将新鲜的K₄M置于胶囊内,将组织转入,在-35℃紫外灯(波长360nm)下照射聚合24~48h,取出后置于室温,用紫外灯继续照射24h,使其聚合变硬易于进行超薄切片。

这类包埋剂具有挥发性,因此操作者必须带手套,在通风柜中进行,且不能靠近氧气。

2.3 探针的制备

电镜原位杂交获得成功与否的一个关键因素就是探针。探针的类型、长度、标记方法及所使用的浓度都是获得强杂交信号的关键。

探针的类型及其标记物应根据其最终的目标核酸来选择,具体同常规原位杂交。Denise E等在比较地高辛和生物素标记的探针后,认为采用地高辛标记的探针可获得比生物素标记的探针更强的杂交信号,更低的背景^[8]。

探针的长度以50~300bp为好,因为这个长度范围的探针在组织和细胞内的穿透能力最好,杂交效率高,在特殊情况下,如染色体中的基因定位,或为使探针交联成网络而增强杂交信号时,可应用长达1.5kb的探针。但Yang H等将长的探针水解成片段探针进行杂交反应,却获得了比未经水解

的探针杂交更弱的信号,其可能原因是虽然长的探针穿透能力差,却有更多的机会与目标核酸杂交,并获得稳定的杂交体^[12]。

至于探针的浓度一般很难事先确定,但要掌握一个原则,即探针浓度必须给予该实验最大的信噪比。

2.4 杂交前处理

杂交前处理的主要目的有:1.改善组织的通透性,增加探针核酸的可及性,提高杂交效率;2.当需定位的目标核酸是DNA(或RNA)时,就需抑制探针同相关RNA(或DNA)序列的特异性结合;3.减少组织样品中的非特异性结合;4.如果被检测的核酸或所使用的探针是双链DNA序列,则必须经预变性处理,变性方法有碱变性、酸变性和热变性等。

虽然用蛋白酶和去污剂处理,可以增加探针核酸的可及性,但却增加了非特异性结合的机会,甚至会对靶核酸和超微结构产生破坏。如Jing Y等为了增加原位杂交的胶体金信号,对切片用蛋白酶K和其他多种侵蚀性试剂(如NaCl, HCl, Triton X-200等)处理,结果并没有增强成纤维细胞的特异性标记,相反的,却增加了金颗粒在无关结构的非特异性结合,并且使超微结构遭到了严重破坏^[10]。Jacques C等(1997)认为在杂交预处理中应尽量避免使用侵蚀性试剂和消化酶^[13]。

组织标本在杂交前用Tris缓冲液配置的0.1mol/L甘氨酸(pH7.4)冲洗,可以除去醛类固定剂对杂交和检测的影响。杂交前将组织标本用不含探针的杂交液孵育可减低背景,提高信噪比,而这些处理并不影响细胞超微结构。

2.5 杂交反应

电镜原位杂交的杂交条件与光镜原位杂交基本相同,适宜的杂交反应条件主要取决于探针和靶核酸的性质。整个杂交过程均须在湿盒中进行,防止杂交液的挥发,杂交液的体积也应尽量缩小,杂交液过多不仅造成浪费,而且容易造成背景染色等不良后果,在实验中使用10%的硫酸葡聚糖可以提高探针的相对浓度,从而减少杂交液体积。

杂交过程一般是在低于 T_m 值20~30℃的较高温度下,经过较长的时间才能完成,这对超微结构的保存是极为不利的,通过增加杂交液中甲酰胺的浓度可以降低杂交温度,每增加1%的甲酰胺浓度可以降低0.72℃。如Tong Y等^[14]用含50%的甲酰胺杂交液在电镜水平检测细胞中的mRNA,杂交温度为40℃,获得了良好的杂交信号并利于超微结构的保存。但Binder等^[15]的研究却发现,在杂交液中加入甲酰胺,会对杂交信号和超微结构产生不良影响。

杂交反应的时间可随探针浓度的增加而缩短,杂交时间过长会造成杂交不完全,过长会增加非特异性染色, Binder等证明杂交1h就可以出现特异性,并在5h内不断增加^[3]。焦仁杰等发现杂交4h和杂交20h相当,但前者结构保存要好得多^[5],所以文献中一般使用的杂交时间为5~10h。

2.6 杂交后处理

杂交后处理包括不同浓度、不同温度盐溶液的彻底漂洗,这是实验中减少非特异性结合,降低背景染色,提高信噪

比的关键。一般应遵循的原则是盐溶液浓度由高到低,而温度则由低到高。漂洗时一定要小心,否则容易导致切片的破裂,一般采用大量漂洗液,漂洗中设置多个漂洗杯的方法进行洗涤。必须注意的是,勿使切片干燥,干燥的切片即使用大量的溶液漂洗也很难减少非特异性结合,从而增强背景染色。

2.7 杂交体的检测

非放射性标记探针的电镜原位杂交的杂交体,大多用免疫组织化学技术检测,不论是地高辛还是生物素标记,其显示系统反应物必须具有较高的电子密度,方能在电镜下识别。常用的有生物素(或地高辛)-辣根过氧化物酶-DAB 显示系统,胶体金标记的抗生物素(或地高辛)抗体,葡萄球菌 A 蛋白等。与辣根过氧化物酶相比,胶体金的分辨力更高,但敏感性较低,这是因为酶反应产物在探针标记处聚集成较大的团块。胶体金颗粒(一般为 20nm)的组织穿透性不如辣根过氧化物酶,但通过采用小颗粒(5nm)的胶体金能改善其组织穿透性。

从理论上讲,越小的金颗粒具有越小的空间障碍和电子斥力,可以获得更高的标记强度,但这些极小的金颗粒即使采用最高的放大倍数,也不能分辨清楚,必须通过其他方法进行增强,如银增强染色等,但这容易造成背景的增强和分辨力的下降。此外,Harold M 等(1995)提出了一种催化报道基因沉淀的信号放大方法——CARD 法,使得原位杂交的灵敏度提高了 2~100 倍,能在组织中检出多拷贝和单拷贝 1~5kb 的核酸序列^[15]。Jing Y 等(1995)比较了多种免疫系统来检测探针同相关 mRNA 的杂交结果,发现两步间接法比一步直接法更为敏感,获得了更强的杂交信号,且对超微结构没有影响^[10]。

2.8 对照的设置

对照实验的设置须根据核酸探针和靶核酸的种类及现有可能条件去选定,常用的对照实验有下列几种:

1. 与非特异性(载体)序列和不相关探针杂交;
2. 将切片用 RNA 酶或 DNA 酶进行预处理后杂交;
3. 以不加核酸探针杂交液进行对照;
4. 应用未标记探针做杂交进行对照;
5. 组织对照用已知确定为阳性或阴性的组织进行杂交对照。

3 电镜原位杂交技术的应用

3.1 基因定位与基因图谱

电镜原位杂交技术能在细胞超微结构水平上确切定位靶核酸的位置,从而获取高分辨力的基因图谱。如吴红阳等^[16]应用光镜及电镜原位杂交对胃癌前病变 APC 基因进行细胞和超微水平观察,定位了 APC 基因表达异常的部位。

3.2 基因的表达与细胞分化

电镜原位杂交可用来检测处在不同分化阶段的细胞群体中特异的 mRNA 与蛋白质的存在,而且可以显示其在某一细胞内的精确定位与相对含量。从而有助于了解细胞分化

的过程。在某些情况下,电镜原位杂交甚至是能对复杂组织的单个细胞表达特异基因进行精确识别的唯一方法。苏长青等^[19]采用 cDNA-mRNA 电镜原位杂交技术定位观察了胃粘膜及胃癌组织中角蛋白和 I 型胶原基因表达的变化。

3.3 病毒学

病毒感染的诊断,最可靠的证据来源于在组织细胞中直接证明病毒的存在,而电镜原位杂交技术能在超微结构水平上直接显示病毒的 DNA 或 RNA 的存在部位,并且还可同时观察到组织的病理变化,确定受染细胞的类型,从而有助于了解病毒性疾病的发病机理和病理过程。C. Canto 等^[17]利用电镜原位杂交技术对免疫缺陷病毒 RNA 进行超微结构定位,而 Francine P 等^[18]则更进一步用电镜原位杂交技术对被具活性腺病毒感染的 HeLa 细胞最后一阶段病毒的释放及病毒从核到细胞质的转运进行研究。

3.4 神经科学与内分泌学

电镜原位杂交技术可揭示神经递质和调节肽合成的亚细胞结构,而且可以了解他们的合成、合成后的加工、包装及分泌的胞内全过程,从而对神经系统和内分泌系统的整个调节过程可以有明确的了解。向正华等^[20]用地高辛标记反意前阿黑皮素(POMC)cRNA 探针在光镜和电镜水平观察了 POMC mRNA 在大脑垂体的分布,并就其在调节细胞合成功能方面可能起的作用进行了讨论。

3.5 其它

此外电镜原位杂交技术还被广泛应用于免疫学、发育生物学等领域的研究,这里就不再详述。随着电镜原位杂交技术实验流程的不断改进和完善,新的电镜原位杂交方法的不断涌现,它必将得到越来越广泛的应用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gall G, Pardue M. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Nat Acad Science*, 1969, **63**: 373 ~ 381
- [2] Jacob J, Todd K, Birstied M *et al.* Molecular hybridization of ³H-labelled ribosomal RNA with DNA in ultrathin sections prepared for electron microscopy. *Biochem Biophys Acta*, 1971, **228**: 761 ~ 766
- [3] Binder M, Tourmente S, Roth J *et al.* *In situ* hybridization at the electron microscope level: Localization of transcripts on ultrathin sections of lowicryls K4-M-Embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J Cell Biology*, 1986, **102**: 1646 ~ 1653
- [4] Fischer D, Weisenburger D, Scheel U. *In situ* hybridization of dig-labelled rRNA probes to mouse liver ultrathin section, Nonradioactive *in situ* hybridization application manual second edition, 1992, pp. 148 ~ 151
- [5] JIAO R X(焦仁杰), YU W X(于文斗), DING M X(丁明孝) *et al.* Localization of adenovirus DNA in its host cell using electron microscopic *in situ* hybridization. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*(电子显微学报), 1992, **2**: 81 ~ 84
- [6] LIANG F X(梁凤霞), DING M X(丁明孝), ZHAI Z H(翟中和). Study on differentiation of bladder urothelium by means of *in situ* hy-

- Chinese Electron Microscopy Society*(电子显微学报),1994, **4**:235~240
- [7] YANG M I(杨木兰),ZHOU Z B(周泽斌). A study on the technique of electron microscopic *in situ* hybridization using dig-labelled probe. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*(中国组织化学与细胞化学杂志),1999, **8**(2):208~210
- [8] Denise E, Monica T, Kurt B. Light and electron microscopic *in situ* hybridization: Non-radioactive labeling and detection double hybridization, and combined hybridization-immunocytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1994, **42**(6):815~812
- [9] WANG B Y(王伯云),LI Y S(李玉松),HUANG G S(黄高升). The technique of pathology: The electron microscopic *in situ* hybridization. Beijing People's Medical Publishing House(人民卫生出版社),2000, pp.346~353
- [10] Jing Y, Odile M, Caroline S *et al.* Electron microscopic location of mRNA in the rat kidney: improved post-embedding *in situ* hybridization. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1995, **43**(8):801~809
- [11] Pantija C R, Lightner D V. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp by *in situ* hybridization at the electron microscope level, diseases of aquatic organisms. *Dis Aquat Org*, 2001, **44**:87~96
- [12] Yang H, Wanner I, Roper S *et al.* An optimized method for *in situ* hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mma. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1999, **47**:431~445
- [13] Jacques C, Jing Y, Odile M *et al.* Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy *in situ* hybridization probes: where do we stand. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1997, **45**(4):481~491
- [14] Tong Y, Zhao H, Simar J *et al.* Electron microscopic autoradiographic localization of prolactin mRNA in rat pituitary. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1989, **37**:567~571
- [15] Harold M, Piho J, Antonius G. A novel *in situ* hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1995, **43**(4):347~352
- [16] WU H Y(吴红阳),YANG G I(杨光霖),DONG Y M(董聿明). APC gene expression in precancer lesions of stomach examined by light and electron microscopic *in situ* hybridization. *Chinese Journal of Oncology*(中华肿瘤杂志),2000, **22**(4):308~310
- [17] Canto-Nogues C, Hockley D, Grief C *et al.* Ultrastructural localization of the RNA of immunodeficiency viruses using electron microscopy *in situ* hybridization and *in vitro* infected lymphocytes. *Micron*, 2001, **32**:579~589
- [18] Francine P, Syluie B, Evelyne p *et al.* Release of viruses and viral DNA from nucleus to cytoplasm of hela cell at late stages of productive adenovirus as revealed by electron microscope *in situ* hybridization. *Biology of the Cell*, 1998, **90**:5~38
- [19] SU C Q(苏长青),LE M Z(乐美兆),Andres J *et al.* The observations of keratin mRNA and collagen I mRNA in gastric ganser by *in situ* hybridization and ultrastructural *in situ* Hybridization. *J Clin Exp Pathol*(临床与实验病理杂志),1995, **11**(2):81~84
- [20] XIANG Z H(向正华),CAI W Q(蔡文琴),LIU S Q(刘淑琴) *et al.* Distributon of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat pituitary with nonradioactive *in situ* hybridization and histochemistry at the light and electron microscopic levels. *Chinese Journal of Anatomy*(解剖学杂志),1994, **17**(2):135

The Electron Microscopic *in situ* Hybridization and Its Application

XIE Chao-Tian* YANG Sheng-Chang MIAO Ying CHEN De-Hai ZHANG Ping

(The Institution of Plant Gene and Gene Technology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The technique of electron microscopic *in situ* hybridization is applying *in situ* hybridization at the electron microscopic level. It is mainly used in the ultrastructural localization of the labled DNA, RNA and RHA in a cell and/or a tissue. In this paper I mainly elaborated its establishment and classification, and the operation procedure of nonradioactive electron microscopic *in situ* hybridization and some points for attention. In the end I also discussed its application for research.

Key words electron microscope, *in situ* hybridization, protocol