

RNA 原位杂交

RNA in-situ Hybridization

程珂, 陈炯炯, 鄢文豪, 欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 程珂, 陈炯炯, 鄢文豪, 欧阳亦聃. (2018). RNA 原位杂交. *Bio-101* e1010119. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010119.

How to cite: Cheng, K., Chen, J. J., Yan, W. H. and Ouyang, Y. D. (2018). RNA in-situ hybridization. *Bio-101* e1010119. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010119. (in Chinese)

实验原理和目的: RNA 原位杂交是基于反义 RNA 与靶基因 RNA 的碱基配对原理, 利用地高辛标记的反义 RNA 为探针, 与切片杂交, 从而原位显示 RNA 的表达部位和相对丰度。RNA 原位杂交是研究基因表达谱的重要方法。

关键词: RNA 原位杂交, 石蜡切片, 转录, 杂交

材料与试剂

1. 进口离心管 (RNase-free)
2. A4 纸
3. 切片盒
4. 载玻片
5. 手帕 (普通无尘手帕, 用于拭去载玻片表面灰尘)
6. 玻璃瓶
7. 纸盒
8. 面巾纸
9. Parafilm
10. 无水乙醇
11. 二甲苯
12. 石蜡
13. 碱水

14. DEPC-H₂O
15. 0.1% poly-L-lysine 溶液 (Sigma 或生工, RNase free)
16. Tris 饱和的苯酚
17. 氯仿(CHCl₃)
18. NaAc
19. DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, catalog number: 1 175 025)
20. DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, catalog number: 1 585 762)
21. DNase I (Invitrogen, catalog number: 18068-015)
22. EDTA
23. LiCl
24. 冰乙酸
25. *Nco*I 酶 (可根据需要选择其他内切酶)
26. SP6 转录酶
27. *Sa*II 酶 (可根据需要选择其他内切酶)
28. T7 转录酶
29. Glycine
30. 甲醛
31. Tris base
32. 浓盐酸
33. EDTA-2Na
34. NaOH
35. MgCl₂·6H₂O
36. NaCl
37. NaH₂PO₄
38. Na₂HPO₄
39. Yeast tRNA (Invitrogen, catalog number: 15401029)
40. Proteinase K buffer
41. Proteinase K (Invitrogen, catalog number: 25530049)
42. PBS
43. 去离子甲酰胺
44. BSA

45. Triton X-100
46. 50% FAA 固定液 (见溶液配方)
47. 70% FAA 固定液 (见溶液配方)
48. 1 M Tris-HCl (pH 7.5) (见溶液配方)
49. 1 M Tris-HCl (pH 9.5) (见溶液配方)
50. 0.5 M EDTA-2Na pH 8.0 (见溶液配方)
51. 1 M MgCl₂ (见溶液配方)
52. 5 M NaCl (见溶液配方)
53. 20x SSPE pH 7.4 (见溶液配方)
54. 10x PBS pH 7.4 (见溶液配方)
55. 50%硫酸葡聚糖(Detran sulfate) (见溶液配方)
56. 10 mg/ml yeast t-RNA (见溶液配方)
57. Proteinase K buffer (见溶液配方)
58. 10x Hybridization salts (见溶液配方)
59. Prehybridization solution (见溶液配方)
60. 1x Blocking buffer (见溶液配方)
61. BSA washing buffer (见溶液配方)
62. TNM-50 buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 脱蜡缸
2. 镊子
3. 剪刀
4. 镊子
5. 切片机
6. 展片台
7. 烘箱
8. 超净工作台
9. 紫外分光光度计

10. -20 °C 冰箱

11. 冷冻离心机

实验步骤

1. 取材、固定、脱水、包埋、切片

注：所有用到的玻璃器皿要洗净，并 180 °C 烘 6 h，载玻片先用 95%乙醇浸泡、擦干净，再 180 °C 烘 6 h；所用的试剂瓶需事先装 DEPC-H₂O 灭过菌；所用的固定液、乙醇溶液等都要用 DEPC-H₂O 配制。

1.1 配制 FAA 固定液(见溶液配方)

1.2 取材：将所需材料尽量剪小，加入预冷的 FAA 固定液中，固定液体积应不少于材料体积的 10 倍。固定液放冰上，抽真空 15 min，缓慢放气，再重复两次，直到材料沉底。

1.3 固定：将抽完真空的固定液吸走弃去，换成新的固定液。4 °C 固定 24 h。

1.4 脱水：如果是用 50% FAA 固定，先用 50%乙醇洗掉固定液，换三次，每次 30 min；如果是用 70% FAA 固定，先用 70%乙醇洗掉固定液，换三次，每次 30 min。然后梯度乙醇脱水(4 °C)：

| 乙醇溶液 | 时长 |
|------------|-------------------|
| 70%乙醇 | 至少 1 h，可过夜,亦可长期保存 |
| 85%乙醇 | 1 h |
| 95%乙醇(含伊红) | 至少 1 h，推荐过夜 |

1.5 继续脱水和透明(室温)

| 溶液 | 时长 |
|----------------------|-------|
| 无水乙醇 | 1 h |
| 无水乙醇 | 1 h |
| 3/4 体积无水乙醇+1/4 体积二甲苯 | 1.5 h |
| 1/2 体积无水乙醇+1/2 体积二甲苯 | 1.5 h |
| 1/4 体积无水乙醇+3/4 体积二甲苯 | 1.5 h |
| 二甲苯 | 1 h |
| 二甲苯 | 1 h |

1.6 浸蜡

| 溶液 | 温度 | 时长 |
|--------------------|-------|-------|
| 二甲苯+碎蜡尽量多 | 42 °C | 过夜 |
| 每 8-12 h, 继续补碎蜡 | 42 °C | 2-3 天 |
| 1/2 体积二甲苯+1/2 体积石蜡 | 48 °C | 2 h |
| 1/4 体积二甲苯+3/4 体积石蜡 | 50 °C | 2 h |
| 纯蜡 | 60 °C | 1 h |
| 纯蜡 | 60 °C | 1 h |
| 纯蜡 | 60 °C | 1 h |
| 纯蜡 | 60 °C | 1 h |

1.7 包埋

预先折好纸盒，并在电磁炉上熔化新的石蜡，置于 60 °C 温箱中备用，注意包埋蜡温度不要过高，以免烫坏组织。包埋时，先铺一层包埋蜡，再将玻璃瓶中的材料倒进纸盒中，镊子稍加热，均匀排列材料 (动作尽可能迅速，尤其是包埋蜡之后应尽快进行后续操作)。让材料自然冷却，可第二天再收。蜡块 4 °C 可以保存很久。注意包埋蜡不要倒太多，蜡块厚度以 1-2 cm 为宜，太厚不好切片。纯蜡的温度可以提升至 63 °C，防治操作过程中不迅速蜡块冷却凝固。

1.8 切片前的准备

切片盒先用碱水浸泡过夜，然后用 DEPC·H₂O 洗净，42 °C 烘干。

用于原位杂交的载玻片必须保证无 RNase，我们需要先用 95%乙醇浸泡，然后再用干净的手帕擦干，用锡纸包裹后，180 °C 烘 6 h。如果载玻片本身很干净无浮尘，也可以直接 180 °C 烘 6 h。但是如果载玻片不干净，会影响粘片和封片。

烘好后的玻片要涂上 0.1% poly-L-lysine 溶液(Sigma 或生工, RNase free)。

抹片方法：在超净台上，先铺一张干净的 A4 纸张，将载玻片正面朝上排成两列摆在纸上(磨砂面方便用铅笔写字，为正面)。在其中一列载玻片中央加 200 µl poly-L-lysine，然后依次将滴有 poly-L-lysine 的和无 poly-L-lysine 的载

玻片面对面涂抹均匀,注意不要有气泡,涂完后放置在干净的切片盒中。 37°C 烘干,至少 1 h。

1.9 切片

切片前,依次用 70%乙醇和 DEPC·H₂O 擦干净切片台面、切片机、展片台。切片厚度一般为 8-10 μm (如果不能得到连续蜡带或蜡带中出现较多空洞,可在取材后将材料进一步剪小,并适当延长脱水、透明和浸蜡各步骤的处理时间,使蜡渗透充分)。展片时,先滴 1 ml DEPC-H₂O 在载玻片上,选取需要的切片(光面朝下)漂浮在 DEPC-H₂O 水滴上。小心将载玻片转移到 40°C 左右的展片台上,待切片展开就用枪吸走 DEPC-H₂O,再稍微在展片台放置,甩掉剩余的 DEPC-H₂O,放入切片盒中。注意展片台温度不能过高,否则会产生气泡,破坏切片。

注:展片时间也不能过久,超过 5 min 会导致 RNA 降解。切好的切片 $37-42^{\circ}\text{C}$ 烘干 1-2 天,就可做杂交。切好的切片不能放置太久,最好其他步骤都准备好了再切片。

2. 探针的设计与合成

2.1 探针的设计原则:

- 1) 探针特异性要好,与其他基因的匹配长度不要超过 50 bp;
- 2) 用于杂交的探针长度为 150-200 bp,超过此长度的探针需要水解(见后面),用于转录的模板不要超过 1.5 Kb;
- 3) 探针的 GC 含量最好在 40-60%,没有连续重复的碱基。

2.2 探针模板的克隆与线性化:

将选取的 cDNA 片段扩增,克隆在含有 T7、SP6 启动子的载体上,如 p-GEM-T 或 p-GEM-T Easy 载体上。线性化需要用 5'突出末端的内切酶,如 *Sal* I 和 *Nco* I,酶切的质粒量为 20-50 μg ,酶切体系 200 μl ,酶切时间 2 h 至过夜。纯化前,需取 1 μl 酶切产物跑胶检测,确定酶切完全。

酶切完毕,需要纯化,以确保模板没有 RNase 等杂质。纯化在进口离心管中进行,试剂用 RNA 专用的。纯化步骤如下:

- 1) 将酶切体系补水至 500 μl ,向其加入 250 μl Tris 饱和的苯酚和 250 μl CHCl₃,震荡 5 min, 12,000 rpm 离心 5 min。

- 2) 吸上层水相上清，转移至新管中，加 500 μl CHCl_3 ，震荡 5 min，12,000 rpm 离心 5 min.
- 3) 吸上清，转移至新管中，加 1/10 体积的 3 M NaAc (pH 5.2, DEPC-H₂O 配)，2 倍体积的无水乙醇，-20 °C 冷冻 3 h 至过夜。
- 4) 4°C 冷冻离心，12,000 rpm 离心 15 min。
- 5) 70%乙醇浸洗沉淀，去上清，吹干。
- 6) 加 20 μl DEPC-H₂O 溶解沉淀，测浓度。

2.3 探针的转录：

探针转录用 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit(SP6/T7)，货号 1 175 02

5. 转录所用到的试剂均用 DEPC-H₂O 配制，转录的步骤如下：

1) 转录体系：

线性化的模板 1 μg

10x Transcription Buffer 2 μl

10x DIG RNA Labeling Mix 2 μl

Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa) 1 μl

T7/SP6 RNA Polymerase 2 μl

补充 DEPC·H₂O 至总体积 20 μl ，37 °C 转录 2-2.5 h

- 2) DNase I (invitrogen) 2.5 μl 37 °C 处理 15 min，去掉 DNA 模板。
- 3) 加 1 μl 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应。
- 4) 加 2.5 μl 4 M LiCl 和 75 μl 无水乙醇，-20 °C 冷冻 3 h 至过夜。
- 5) 0 °C 冷冻离心，12,000 rpm 离心 20 min。
- 6) 去掉上清，加 80%乙醇 150 μl 浸洗，0 °C 冷冻离心，12,000 rpm 离心 20min。
- 7) 小心吸走上清，超净台上吹干，加 20-40 μl DEPC·H₂O 溶解。测浓度，跑胶检测，-70 °C 保存。如果转录的探针长度合适，就此完成；如果长度过长，探针不易进入细胞，需要碱水解，继续往下进行。

a. 碱水解的时间计算公式如下：

$$T=(L_0-L_f)/(K\times L_0\times L_f)$$

L₀: 探针初始长度(Kb); L_f: 探针终长度(Kb); K: 0.11 Kb/min.

水解溶液为 20 μ l 100 mM NaHCO₃ 和 30 μ l 100 mM Na₂CO₃，加在总体积为 100 μ l。水解温度为 60 °C，水解时间按上述公式。

- b. 水解后加入 5 μ l 10%冰乙酸，10 μ l 3 M NaAc，2 倍体积的无水乙醇，-20 °C 冷冻 3 h 至过夜。
- c. 0 °C 冷冻离心，12,000 rpm 离心 20 min。
- d. 去掉上清，加 80%乙醇 150 μ l 浸洗，0 °C 冷冻离心，12,000 rpm 离心 20 min。
- e. 重复步骤 d。
- f. 小心吸走上清，超净台吹干。溶于 20 μ l DEPC·H₂O，测浓度，跑胶检测。保存于-70 °C。

2.4 探针方向的确定：

用于原位杂交检测的探针是与体内 mRNA 互补的 RNA，称为反义 RNA；用于阴性对照的探针是与体内 mRNA 方向相同的，称为正义 RNA。连接入 p-GEM-T 或 p-GEM-T Easy 载体的 cDNA 的方向决定了探针的方向。

如果 cDNA 在载体中的连接方向如图 1 所示时，用 Nco I 酶切、SP6 转录酶转录的探针是反义 RNA，用 Sal I 酶切、T7 转录酶转录的探针是正义 RNA。如果 cDNA 连接的方向相反，则探针方向也反过来。

注：这一点非常重要，建议重点强调，这个图示很简明清晰，很好。

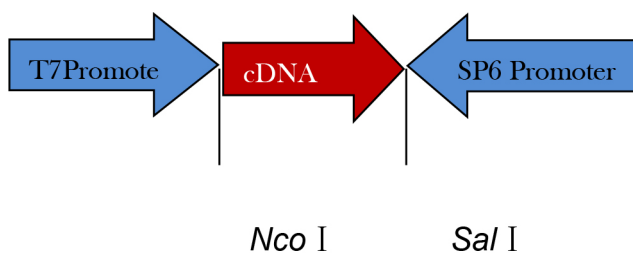


图 1. cDNA 在载体中的连接方向

3. 杂交

3.1 试剂配制 (见溶液配方)

3.2 杂交前的准备：脱蜡缸、镊子、剪刀等要 180 °C 烘 6 h，切片要 37-42 °C 烘 1-2 天。10x Blocking solution (3)从-20 °C 冰箱拿出解冻 (DIG Wash and Block

Buffer Set, Roche)。

杂交第一天 (步骤 3.3-3.7)

3.3 脱蜡和复水, 通风橱中进行:

| | |
|-----------------------|--------|
| 二甲苯 | 20 min |
| 二甲苯 | 20 min |
| 二甲苯+无水乙醇 | 2 min |
| 无水乙醇 | 2 min |
| 无水乙醇 | 2 min |
| 95%乙醇 | 2 min |
| 85%乙醇 | 2 min |
| 70%乙醇 | 2 min |
| 50%乙醇 | 2 min |
| 30%乙醇 | 2 min |
| 15%乙醇 | 2 min |
| DEPC·H ₂ O | 2 min |
| DEPC·H ₂ O | 2 min |

在脱蜡的同时配制并预热 Proteinase K buffer (见溶液配方), 37 °C 温箱中预热。

3.4 Proteinase K 处理

Proteinase K 稀释到 1 µg/ml, 37 °C 处理 40 min。PBS 洗一次, 2 mg/ml Glycine 浸泡 2 min, 再次用 PBS 洗一次。

3.5 脱水, 用刚才(3.3 脱蜡和复水)的溶液:

| | |
|-----------------------|-------|
| DEPC·H ₂ O | 2 min |
| DEPC·H ₂ O | 2 min |
| 15%乙醇 | 2 min |
| 30%乙醇 | 2 min |
| 50%乙醇 | 2 min |
| 70%乙醇 | 2 min |
| 85%乙醇 | 2 min |
| 95%乙醇 | 2 min |
| 无水乙醇 | 2 min |

超净台上吹干, 约 30-50 min。

3.6 预杂交:

先配制 10x Hybridization salts, 可 4 °C 保存 (见溶液配方)。

吸 50%硫酸葡聚糖需要剪去枪头, 配制过程尽量不要产生气泡, 有气泡需要离心消泡。预杂交液可以-20 °C 保存。

预杂交时, 取 150 μ l 预杂交液滴加在吹干的载玻片上, 并用大小合适的干净 parafilm 覆盖, 不能产生气泡。将载玻片转移至离心管盒子中, 盒中加 DEPC·H₂O, 盖严以保湿。42°C 预杂交 1-3 h。

3.7 杂交:

在预杂交液中加入探针, 使其浓度为 400-1000 ng/ml。取下载玻片上的 parafilm, 并在面巾纸上吸干, 将稀释好的探针滴加 150 μ l 于载玻片上, 用 parafilm 覆盖, 放入湿盒中。42°C 杂交 16-20 h。

杂交第二天 (步骤 3.8-3.14), 不再需要用 DEPC-H₂O 配制试剂

3.8 2x SSPE 洗三次 (见溶液配方)

第一次揭开 parafilm, 将玻片浸入 2x SSPE 中。第二次、第三次, 42 °C 15min。

3.9 0.2x SSPE 洗两次 (见溶液配方)

57°C 杂交炉中, 最小转速, 30 min, 两次。

3.10 1x Blocking buffer 洗, 室温摇床, 最小转速, 30 min。(见溶液配方)

3.11 免疫反应:

配制 BSA washing buffer (200 ml, 现配现用, 方法见溶液配方)。

先将 Anti-Digoxigenin-AP 离心 12000 rpm 5min, 取上清, 稀释在 BSA washing buffer(见溶液配方)中, 稀释比为 1:2500-1:5000, 室温杂交 2 hrs, 最小转速摇晃。

3.12 洗抗体:

BSA washing buffer 洗三次, 每次 15min, 最小转速摇晃。

在此期间配制 TNM-50 buffer(120ml)(见溶液配方)

3.13 TNM-50 buffer 洗三次, 每次 5 min。

3.14 显色反应:

避光配制显色液，30 ml TNM-50 buffer 中加入 0.3-0.8 ml NBT/BCIP stock solution (Roche, Cat. No. 1 681 451)，依照具体显色情况，避光显色过夜。

杂交第三天 (步骤 3.15-3.18)

3.15 待到实验组明显显色而阴性对照没有显色时，将载玻片转移至双蒸水中，洗三次，每次 2min。

3.16 脱水，用第一天的溶液：

| | |
|-----------------------|-------|
| DEPC·H ₂ O | 2 min |
| DEPC·H ₂ O | 2 min |
| 15%乙醇 | 1 min |
| 30%乙醇 | 1 min |
| 50%乙醇 | 1 min |
| 70%乙醇 | 1 min |
| 85%乙醇 | 1 min |
| 95%乙醇 | 1 min |
| 无水乙醇 | 1 min |
| 无水乙醇 | 1 min |
| 无水乙醇+二甲苯 | 1 min |
| 二甲苯 | 5 min |
| 二甲苯 | 5 min |

因为显出的颜色溶于乙醇，所以脱水的过程要比较快，特别是当显出的颜色比较浅的时候，每一级不要超过 10 sec。

3.17 封片，37 °C 烘干。

3.18 拍照观察。

溶液配方

1. 50%FAA 固定液 (100 ml)

无水乙醇 50 ml

37%甲醛溶液 10 ml

冰乙酸 5 ml

加 DEPC-H₂O 定容至 100 ml

2. 70% FAA 固定液 (100 ml)

无水乙醇 70 ml

37%甲醛溶液 10 ml

冰乙酸 5 ml

加 DEPC·H₂O 定容至 100 ml

注：50%FAA 适用于幼穗、SAM 等幼嫩组织的固定，70%FAA 适用于根、茎秆、叶片等成熟组织的固定。

3. 1 M Tris-HCl (pH 7.5) (500 ml)

Tris base 60.55 g

浓盐酸约 32 ml

加浓盐酸调 pH 至 7.5

定容至 500 ml

4. 1 M Tris-HCl (pH 9.5) (300 ml)

Tris base 36.33 g

浓盐酸 1 ml

加浓盐酸调 pH 至 9.5

定容至 300 ml

5. 0.5 M EDTA-2Na, pH 8.0 (500 ml)

EDTA-2Na 93.06 g

NaOH 约 10 g

完全溶解后，调 pH 至 8.0

定容于 500 ml

6. 1 M MgCl₂ (100 ml)

MgCl₂·6H₂O 20.331 g

定容至 100 ml

7. 5 M NaCl (500 ml)

NaCl 146.1 g

定容至 500 ml

8. 20x SSPE, pH 7.4 (1 L)

NaCl 175.3 g

- | | |
|----------------------------------|-------|
| NaH ₂ PO ₄ | 24 g |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 40 ml |
| 定容至 1 L | |
9. 10x PBS, pH 7.4 (500 ml)
- | | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 38 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 1.8 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 4.95 g |
| 定容至 500 ml | |
10. 50%硫酸葡聚糖(Detran sulfate)
- | | |
|----------------------------|-----|
| Detran sulfate | 5 g |
| 定容至 10 ml | |
| 分装至 1.5 ml 离心管中, 保存于-20 °C | |
- 注: 50%硫酸葡聚糖比较粘稠, 配好之后直接按照需要的量(1 ml)分装到 10 ml 的离心管中, 保存在 4 度, 用的时候可直接往离心管中加其他成分。*
11. 10 mg/ml yeast t-RNA
- 25 mg yeast t-RNA (invitrogen)
- 溶于 2.5 ml DEPC-H₂O 中
- 注:*
- 1) 所有试剂都要用灭菌的 DEPC-H₂O 配, 配试剂用到的量筒需要 180 °C 烘 6 h。
 - 2) 溶液 4-10 在配好后需要灭菌。用时都要在超净台上打开, 以免长菌。
12. Proteinase K buffer (100 ml)
- | | |
|-------------------------|-------|
| 1 M Tris-HCl (pH 7.5) | 10 ml |
| 0.5 M EDTA-2Na (pH 8.0) | 10 ml |
| DEPC-H ₂ O | 80 ml |
13. 10x Hybridization salts (10 ml)
- | | |
|-------------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl (pH 7.5) | 1 ml |
| 0.5 M EDTA-2Na (pH 8.0) | 200 μl |
| 5 M NaCl | 6 ml |
| DEPC-H ₂ O | 2.8 ml |
14. Prehybridization solution (10 ml)
- | | |
|-----------------------|---------|
| DEPC-H ₂ O | 1.85 ml |
|-----------------------|---------|

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| 去离子甲酰胺 | 5 ml |
| 10x Hybridization salts | 1 ml |
| 50%硫酸葡聚糖 | 1 ml |
| 10x Blocking solution (3) | 1 ml |
| 10 mg/ml yeast t-RNA | 150 μ l |
| 15. 1x Blocking buffer (40 ml, 现配现用) | |
| 10x Blocking buffer (3) | 4 ml |
| 10x Blocking buffer (2) | 3.6 ml |
| 加 ddH ₂ O 至 | 40 ml |
| 16. BSA washing buffer (200 ml, 现配现用) | |
| BSA | 2 g |
| Triton X-100 | 600 μ l |
| 1 M Tris-HCl (pH 7.5) | 20 ml |
| 5 M NaCl | 6 ml |
| 加 ddH ₂ O 至 | 200 ml |
| 17. TNM-50 buffer (120 ml) | |
| 1 M Tris-HCl (pH 9.5) | 12 ml |
| 5 M NaCl | 2.4 ml |
| 1 M MgCl ₂ | 6 ml |
| 加 ddH ₂ O 至 | 120 ml |