

原位杂交实验

1 探针的设计与合成

- 1) 根据实验室已有的 p8 基因 cDNA 全长序列，用 premier primer5.0 设计引物 p81 和 p82，以卤虫 cDNA 为模板，PCR 扩增得到 346bp 的产物，用 Takara 胶回收试剂盒回收纯化。

引物编号	引物序列	长度
p81	TGCGGACGAAACAGGAAG	18 bp
p82	GCTCAAACAGTGATGCCAGT	20 bp

2) 目的片段克隆

- a. 在无菌离心管中加入连接载体的各种成分，载体与片段的摩尔比控制在 1:3-1:8，根据凝胶电泳检测后的浓度及载体与片段分子大小来计算摩尔比。加入成分及比例如下：

目的 PCR 片段	5 μ l
pGM-T 载体 (约 50ng/uL)	1 μ l
10×T4 DNA Ligation Buffer	1 μ l
T4 DNA Ligase (3U/uL)	1 μ l
无菌去离子水	3 μ l
总体积	10 μ l

- b. 轻轻弹动离心管以混合内容物，短暂离心。置于 PCR 仪中 16℃过夜连接，反应结束后将离心管置于冰上。
- c. 向铺好的含有氨苄青霉素的固体平板表面加入 16 μ l 的 IPTG(50mg/ml)、40 μ l 的 X-gal (20mg/ml)，使用无菌的弯头玻璃棒将其均匀的涂开，避光置于 37℃培养箱 1-3 小时，使溶解 X-gal 的二甲基甲酰胺挥发干净。

d. 将 10 μ l 的连接产物加到 100 μ l DH5 α 感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴半小时，将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 秒，取出管后立即置于冰浴上放置 2-3 分钟，其间不要摇动离心管。

向离心管加入 500 μ l 37 $^{\circ}$ C 预热的 LB（不含抗生素）培养基，150rpm 摇床 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45 分钟。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。将菌液于 4000g 下离心 10 分钟，去掉上清，加入 100 μ l 培养液重溶并加入到配制好的 LB 固体培养基上，用无菌的弯头玻璃棒轻轻将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时。

e. 挑取白色菌落直接进行 PCR 检测，筛选转化子。

f. 将转化子接种于 LB 液体培养基中培养 24 小时，吸取 1mL 菌液送至大连宝生物公司进行序列测序。

3) 重组质粒的线性化

取 6 μ l 以测序的重组质粒，选取 NcoI 内切酶 37 $^{\circ}$ C 酶切 4h。酶切反应体系为 20 μ l：

质粒	6 μ l
10xK Buffer	2 μ l
NcoI 酶	1 μ l
0.1% BSA	2 μ l
灭菌水	9 μ l
终体积	20 μ l

取酶切前后的质粒各 4 μ l，经 1% 琼脂糖电泳检测，确认酶切完全，将酶切产物用 Takara 胶回收试剂盒回收纯化，作为探针合成的模板。

4) 探针合成

按罗氏 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 试剂盒使用指南，标记反义 RNA 探针。

使用的所有试剂和器皿均经去 RNase 处理，合成方法如下：先准备反应体系。冰上向

RNase-Free 的微离心管中顺序加入下列试剂:

纯化的线形质粒	1 μ g
Rnase-free dH ₂ O	up to 13 μ l
10xNTP labeling mixture	2 μ l
10xTranscription buffer	2 μ l
Rnase inhibitor	1 μ l
SP6 RNA Polymerase	2 μ l
总体积	20 μ l

稍混匀, 短暂离心将反应液集于管底, 37°C 2 h。反应结束后再补加 2 μ l DNase I, 37°C 15 min, 反应结束后加入 0.2M EDTA 2 μ l 终止反应。取 3-5 μ l 反应产物 1%琼脂糖凝胶电泳检测。 -20°C保存备用。

2. 石蜡切片的制备

◆本实验在杂交结束前均必须保证 RNase-free.玻璃器皿采用 180°C烘烤 10 小时。其它采用 DEPC 处理, 高温灭菌锅高温降解 DEPC。若仪器不能高温处理, 可用 3%的 H₂O₂ 处理半小时以上, DEPC 水冲洗干净, 烘干。

1) 组织的固定与包埋

选取不同发育时期 (0h, 5h, 10h, 15h, 20h, 40h, 3d, 5d, 7d) 的卤虫, 经 DEPC 处理水冲洗表面盐分后, 加入新鲜配制的 4%多聚甲醛, 于 4°C固定 5-8 h, 再分别按下列顺序进行脱水、透明和包埋: 30%乙醇脱水 1 h, 50%乙醇脱水 1 h, 70%乙醇脱水 1 h, 80%乙醇脱水乙醇脱水 1 h, 90%乙醇脱水 1 h, 无水乙醇脱水 1 h, 无水乙醇脱水 1 h, 无水乙醇:二甲苯(1:1)透明 10 min, 二甲苯透明 10 min、二甲苯:54°C石蜡(1:1)浸蜡 30 min, 54°C石蜡浸蜡 1 h, 54°C石蜡包埋。

2) 组织切片:将包埋的组织按 7 μm 的厚度切片,在多聚赖氨酸处理的载玻片上滴加 DEPC 处理水,组织片于 42°C 展片台上展片 1 小时,再置于 40°C 恒温箱中烘片 12 小时后放于 4°C 密封保存备用。

3. 杂交前处理

切片经二甲苯脱蜡 2×15 min, 无水乙醇:二甲苯(1:1) 5 min, 100%-95%-80%-50%-30% 乙醇脱水各 5 min, 后 DEPC 处理水 2×5 min, 然后进行杂交前切片处理, 具体步骤如下:

- 1) 1xPBS(pH7.4)室温孵育 2×5 min。
- 2) 0.3%TritonX-100 的 PBS 中去膜处理 15 min。
- 3) 1xPBS 洗涤 2×5 min。
- 4) 无 RNase 的蛋白酶 K(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)37°C消化 30 min。
- 5) 100mM Glycine/PBS 中洗 2×5 min。
- 6) 1xPBS 洗涤 2×5 min。
- 7) 4%多聚甲醛(4°C)固定 5min。
- 8) 1xPBS 洗涤 2×5 min。
- 9) 含有 0.25%(W/v)的乙酸酐的 100mM 的三乙醇胺缓冲液(pH8.0)去电荷处理 15 min(现配现用)。
- 10) 1xPBS 洗涤 2×5 min。

4. 预杂交和杂交

- 1) 滴加预杂交液于载玻片上, 然后置于湿盒中, 50°C预杂交 2 小时。
- 2) 弃去预杂交液, 立即滴加杂交液, 置于湿盒中 52°C杂交过夜。

5. 杂交后处理

杂交完, 以后的步骤不必要特意防 RNA 酶。

- 1) 弃去杂交液, 载片浸入 2xSSC 中 2x15 min。
- 2) 载片浸入 1xSSC 中 55°C 水浴摇动 2x15 min。
- 3) 用含 20 μ g/mL 的 RNaseA 的 NTE 缓冲液 37°C 消化 30 分钟, 以去除未结合的探针。
- 4) 载片浸入 0.5xSSC 中 55°C 水浴摇动 2x15 min。
- 5) 载片浸入 0.5xSSC 中室温 10 min。

6. 抗体反应

- 1) 用 washing buffer 清洗组织片 5 min。
- 2) 滴加封闭液缓冲液室温下处理组织片 30 min。
- 3) 用抗体液覆盖封闭后的组织片, 置于湿盒中孵育 3h 以上。
- 4) Washing buffer 洗 2x15 min。
- 5) Detection buffer 中平衡 2-5 min。

7. 显色: 加入显色液于湿盒中黑暗静止显色 16h

8. 封片与观察:

- 1) 显色合适时, 用 TE buffer 终止着色反应, 再用蒸馏水清洗。
- 2) 滴加封片剂封片, 显微镜下观察和摄影。