果蝇胚胎原位杂交实验方案

In situ Hybridization in *Drosophila* Embryos

李美霞^{1,2}, 温省云¹, 许孟博¹, 崔名扬^{1,2}, 刘力^{1,2,*}

¹脑与认知国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: liuli@ibp.ac.cn

引用格式: 李美霞, 温省云, 许孟博, 崔名扬, 刘力. (2019). 果蝇胚胎原位杂交实验方案. *Bio-101* e1010246. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010246.

How to cite: Li, M. X., Wen, S. Y., Xu, M. B., Cui, M. Y. and Liu, L. (2019). *In situ* hybridization in *Drosophila* embryos. *Bio-101* e1010246. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010246. (in Chinese)

实验原理: 在一定的温度和离子浓度下, 使具有地高辛标记的特异序列的 RNA 探针通过碱基互补规则与果蝇胚胎组织内待测的 RNA 结合, 之后通过探针上所标记的检测系统将待测 RNA 在果蝇胚胎组织中的位置进行定位。

实验目的: 检测某种特定 RNA 在果蝇胚胎中的表达分布情况。

关键词: RNA 探针, 地高辛, 胚胎, 果蝇

材料与试剂

一、一次性耗材

1. 离心管 50 ml, 10 ml
2. 一次性枪头 1,000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
3. 一次性吸管, 容量为 3 ml
4. 15 cm 培养皿
5. 软毛笔
6. 尼龙网
7. 纱网
8. 小圆片 (Zweckform Verstaerkungsringe, catalog number: 3510)
9. 铝箔纸
10. 1.5 ml 离心管

11. 玻片：20 mm × 40 mm，厚度小于 20 μm

玻片首先用浓硫酸浸泡过夜，用大量去离子水清洗，再用 **RNase free** 水冲洗 3 遍，放在脱色架上，60 °C 烘干，用锡箔纸包好，室温保存备用。使用时用玻璃刀从中间划分为两半，即 20 mm × 20 mm 的大小作为载玻片。同时用玻璃刀把 20 mm × 40 mm 的玻片平均分成 3 份，即 20 mm × 13 mm 大小的作为盖玻片。

二、溶液与试剂

1. 指甲油
2. 显色剂 (BM Purple) (Roche, catalog number: 11442074001), 直接使用
3. 无水乙醇
4. 正庚烷 (heptane)
5. RNase AWAY (Invitrogen, catalog number: 7491543)
6. Paraformaldehyde (北京益利精细化学品有限公司)
7. NaCl (北京精细化工有限公司)
8. Triton X-100
9. 次氯酸钠溶液
10. KCl
11. Na₂HPO₄·12H₂O
12. KH₂PO₄
13. NaOH
14. 无水甲醇
15. Sucrose (北京益利精细化学品有限公司)
16. Agar (石狮市环球琼胶工业有限公司)
17. Apple Juice (汇源 100%苹果汁)
18. Tween-20 (Sigma, catalog number: P1379)
19. Bovine serum albumin (BSA) (华美 Sino-American Biotec, BP 0042)
20. Ficoll™ (华美 Sino-American Biotec, BIO 322)
21. PVP (华美 Sino-American Biotec, BR 2205)
22. 柠檬酸钠 (北京精细化工有限公司)
23. HCl

24. Formamide (Amresco, catalog number: 1167B35)
25. Torula RNA, Type IX (Sigma, catalog number: R3629)
26. Heparin (Sigma, catalog number: H3125)
27. Sonicated salmon sperm DNA (Stratagene, catalog number: 201190)
28. CHAPS (Sigma, catalog number: C3023)
29. MgCl₂
30. Levamisol, an inhibitor of endogenous phosphatase (Sigma, catalog number: L9756)
31. Maleic Acid (ACROS, catalog number: 110-16-7, MW = 116.07)
32. EGTA (Amresco, catalog number: 0732)
33. EDTA (Amresco, catalog number: 0322)
34. Tris (Amresco, catalog number: 0497)
35. Proteinase K (Amresco, catalog number: 0706)
36. 0.1 M 三乙醇胺 (Triethanolamine) (上海生工, catalog number: TT0776, MW = 149.9)
37. 乙酸酐 (Acctic anhydride) (属于毒品原料, 需要经特殊部门批准方可购买)
38. 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, 北京益利精细化学品有限公司)
39. RNase A (BBI, catalog number: RB0473)
40. 封闭剂, Blocking Reagent (Roche, catalog number: 11096176001)
41. 羊血清原液 (中杉金桥 ZL1-9021)
42. Anti-Dig-AP 抗体 (Roche, catalog number: 11093274910)
43. 甘油 (汕头市西陇化工有限公司)
44. RNase free 水 (见溶液配方)
45. 甲醛固定液 (终浓度为 8%) (见溶液配方)
46. 胚胎洗液 (见溶液配方)
47. 漂液 (见溶液配方)
48. 10× PBS (pH = 7.4) (见溶液配方)
49. PTw (见溶液配方)
50. 0.5 M EGTA (见溶液配方)
51. 0.5 M EDTA (见溶液配方)
52. 1 M Tris (见溶液配方)

53. Proteinase K (见溶液配方)
54. 0.1 M 三乙醇胺 (Triethanolamine) 溶液 (见溶液配方)
55. 乙酸酐 (Acctic anhydride) (见溶液配方)
56. 4%多聚甲醛 (见溶液配方)
57. 50× Denhardt's Solution (见溶液配方)
58. 20× SSC (见溶液配方)
59. 杂交液 (whole mount hybridization buffer) (见溶液配方)
60. RNase A 储存液(见溶液配方)
61. AP Buffer (Alkaline Phosphatase Buffer) (见溶液配方)
62. 5× MAB (Maleic Acid Buffer, pH = 7.5) (见溶液配方)
63. 封闭剂 (Blocking Reagent) (见溶液配方)
64. 羊血清封闭液 (见溶液配方)
65. Anti-Dig-AP 抗体溶液(见溶液配方)
66. 甘油溶液 (见溶液配方)

注：所需溶液均须用 *RNase free* 水配制，提前配好并在 15lbf/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。

仪器设备

1. 玻璃器皿

量筒 1,000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml, 25 ml, 10 ml

烧杯 1,000 ml, 500 ml, 400 ml, 250 ml, 200 ml, 100 ml, 50 ml

细口瓶 1,000 ml

称量瓶 20 ml

玻璃棒

蓝口瓶

2. 孵育器皿

容量为 4 ml 的带密闭瓶盖的玻璃小瓶

3. 镊子

注：所有玻璃器皿和金属用具进行无 RNA 酶处理，具体操作：洗净烘干后用锡箔纸封口，180 °C 烘烤 4 小时。所有不能烘烤的器皿用大量 RNase free 水冲洗，然后用擦镜纸沾取 RNase AWAY (Invitrogen) 擦拭。实验台面用纸巾沾取无水乙醇擦拭。

4. 多道计时器
5. MilliQ 纯水仪 (Millipore)
6. 水浴锅 (电热恒温水箱) (北京市长风仪器仪表公司, model: HHW21)
7. DHG 恒温鼓风干燥箱 (山东德瑞克仪器有限公司)
8. 微量恒温器 (北京市方通达科技有限公司, model: TDW-1)
9. 全自动数显立式高压蒸汽灭菌器 (青岛胜方分析仪器有限公司, model: YXQ-LS-50SII)
10. 电子秤 (Acculab, model: ALC-11002) 及微量电子称 (Sartorius, model: CP124S)
11. pH 计 (Sartorius, model: PB-10)
12. 摇床 (Heidolph, model: Polymax 1040)
13. 体式显微镜 (麦克奥迪, model: SMZ168, 需要配 20 倍的目镜)
14. 冷光源 (北京福凯仪器有限公司, model: LGY-150)
15. Leica DM 2500 显微镜
16. 微波炉
17. 通风橱
18. -20 °C 冰箱
19. 移液器
20. 37 °C 烘箱
21. 电磁炉

实验步骤

一、配制收集胚胎的各种溶液 (Kosman 等, 2004)

1. 制作产卵碟

1.1 在 500 ml 烧杯中加入：

7.5 g sucrose (北京益利精细化学品有限公司)

7.5 g agar (石狮市环球琼胶工业有限公司)

75 ml Apple Juice (汇源 100%苹果汁)

150 ml 去离子水

1.2 用玻璃棒搅拌均匀，放入微波炉内加热煮沸。煮沸至产生大量气泡取出，略微冷却至较少气泡，再次煮沸，取出，如此反复 2 到 3 次 (第一次煮沸气泡消融很慢，多次煮沸后，气泡较快消失，此时琼脂完全变性，即可取出)。

1.3 选择直径 15 cm 培养皿若干，打开盖子，并集中水平放置。将琼脂溶液依次倒入培养皿中 (每个培养皿约 20 ml)，培养皿静置到琼脂凝固，盖好盖子备用。

1.4 使用前将煮熟的酵母，点在已经凝固的产卵碟中间。

2. 甲醛固定液 (Fixation Solution) 10 ml

3. 胚胎洗液 (Embryo Wash Buffer) 1 L

4. 漂白液 (Bleach Solution) 20 ml

二、胚胎的收集与固定 (Kosman 等, 2004)

1. 胚胎的收集

收集 4~5 日龄果蝇，放入 25 °C 黑暗环境产卵，第一次预产卵 1 小时，更换产卵碟，正式产卵 4~16 个小时。

2. 胚胎的固定和保存

2.1 在产卵碟中倒入一些胚胎洗液，用软毛笔将胚胎轻轻刷到尼龙网上，再用大量的胚胎洗液冲掉胚胎上附着的酵母。

2.2 把纱网和胚胎一起浸泡在漂白液培养皿 (直径 4 cm 磨口盖) 中 2~3 分钟，期间轻轻摇动漂白液。这样可以去掉胚胎表面的绒毛膜。

2.3 交替使用胚胎洗液和去离子水冲洗胚胎 5~6 次，彻底洗去漂白液，最后一次冲洗用 RNase free 水，这样胚胎会聚集在一起，用软毛笔轻刷胚胎团，胚胎团很容易就附着在毛笔上。

2.4 把胚胎团放入固定液瓶中，固定液中的两种成分互不相溶，正庚烷在上层，固定液在下层。这时胚胎会自动散开，均匀分布在正庚烷和固定液中间。盖上固定液瓶子的盖子，并将其放在摇床上，室温 25 转/分 (最大设置) 摇动 25 分钟。

- 2.5 把固定液瓶从摇床上取下，放在通风橱中静置几分钟使正庚烷和固定液中间的气泡消散，或者用吸管把气泡驱散。用吸管尽量吸走下层的固定液，这时瓶中只剩下胚胎和上层的正庚烷。
- 2.6 加入 8 ml 无水甲醇，此时甲醇和正庚烷仍旧是分层的，甲醇在下层，胚胎会在中间层。盖上瓶盖，用力摇 20~30 秒后放回通风橱中静置。去掉卵黄膜的胚胎会沉底。留在中间，瓶壁和上层可能是没有去掉卵黄膜的胚胎，所以不可要。用吸管吸掉上层的正庚烷，中间层的胚胎和二分之一甲醇，只在瓶中留下底部的胚胎和二分之一甲醇。
- 2.7 用吸管把胚胎和甲醇一起转移到一个新小玻璃瓶（容量为 4 ml）中，吸掉多余的甲醇后加 2 ml 新鲜甲醇洗胚胎，如此用甲醇洗三次后，再用无水乙醇洗 4 次。这样的胚胎浸泡在无水乙醇中，放入 -20 °C 冰箱中，可以长时间保存。

三、原位杂交 (Tautz 和 Pfeifle, 1989; Inagaki 等, 2005)

第一天杂交 (保持无 RNA 酶污染)

以进行 5 瓶胚胎原位杂交为例，第一天需要的溶液量如下：

75%乙醇 (25% RNase free水)	20 ml
50%乙醇 (50% RNase free水)	20 ml
25%乙醇 (75% PTw)	20 ml
PTw	280 ml (20 ml用来配制5%甲醛溶液) (20 ml用来配制Proteinase K溶液)
5%甲醛溶液	20 ml (2.5 ml 40%甲醛溶液 + 17.5 ml PTw)
10 µg/ml Proteinase K溶液	20 ml
0.1 M (pH 7.8) 三乙醇胺溶液	80 ml (20 ml用来配制乙酸酐溶液A) (20 ml用来配制乙酸酐溶液B)
乙酸酐溶液A	20 ml
乙酸酐溶液B	20 ml
4%多聚甲醛	20 ml
杂交液	5 ml, 提前放入60 °C水浴锅中预热
5种不同RNA探针液 (探针终浓度: 0.5~1 µg/ml)	各0.4 ml, 提前放入60 °C水浴锅中预热

1. 复水 (Rehydrate)

- 1.1 把胚胎从-20 °C 冰箱中取出，室温放置 15 分钟。
- 1.2 用吸管吸掉 100%乙醇，加入 4 ml 75%乙醇 (25% MilliQ H₂O)，室温放置 5 分钟。
- 1.3 用吸管吸掉 75%乙醇，加入 4 ml 50%乙醇 (50% MilliQ H₂O)，室温放置 5 分钟。
- 1.4 用吸管吸掉 50%乙醇，加入 4 ml 25%乙醇 (75% PTw)，室温放置 5 分钟。
- 1.5 用吸管吸掉 25%乙醇，加入 4 ml PTw，室温放置 5 分钟。
- 1.6 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml PTw，室温放置 5 分钟。
2. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml 5%甲醛溶液，放在摇床上 20 转/分钟，室温固定 25 分钟。
3. 用吸管吸掉甲醛溶液，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。
4. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。重复该步骤 3 次。
5. 用吸管吸掉 PTw，加入 10 µg/ml Proteinase K 溶液，室温孵育 5 分钟。此步时间要精确，静置，不能放在摇床上。
6. 用吸管吸掉 Proteinase K 溶液，加入 4 ml 0.1 M 三乙醇胺溶液，室温静置 5 分钟。
7. 用吸管吸掉三乙醇胺溶液，加入 4 ml 0.1 M 三乙醇胺溶液，室温静置 5 分钟。
8. 用吸管吸掉三乙醇胺溶液，加入 4 ml 乙酸酐溶液 A，室温静置 5 分钟。
9. 用吸管吸掉乙酸酐溶液 A，加入 4 ml 乙酸酐溶液 B，室温静置 5 分钟。
10. 用吸管吸掉乙酸酐溶液 B，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。
11. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。
12. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml 4%多聚甲醛溶液，放在摇床上 20 转/分，室温 20 分钟。
13. 用吸管吸掉多聚甲醛溶液，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。
14. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。重复该步骤 4 次。
15. 用吸管吸掉 PTw，加入 0.5 ml 已预热的杂交液，放入 60 °C 水浴锅中 10 分钟。
16. 用吸管吸掉杂交液，加入 0.5 ml 已预热的杂交液，放入 60 °C 水浴锅中，预杂交 4~6 个小时。
17. 用 200 µl 移液器吸掉杂交液，加入 0.4 ml 探针液，放入 60 °C 水浴锅中过夜杂交。

注：在步骤 15 和 16 中所用杂交液应回收，成为回收杂交液。

第二天 洗涤和抗体孵育

以做 5 瓶胚胎原位杂交为例，第二天需要的溶液量如下：

回收杂交液	2.5 ml
2× SSC	130 ml (80 ml提前放入60 °C水浴锅中预热) (4 ml用来配制0.2× SSC) (20 ml放在37 °C预热，用来配制RNase A溶液) (20 mlss放在室温)
0.2× SSC	40 ml (提前放入60 °C水浴锅中预热)
1× MAB	170 ml (3 ml用来配制2% blocking reagent) (3 ml用来配制2% blocking reagent, 20%羊血清) (3 ml用来配制抗体)
2% blocking reagent	2.5 ml
2% blocking reagent 20%羊血清	2.5 ml
抗体溶液	2 ml

1. 提前打开 37 °C 烘箱。2× SSC 和 0.2× SSC 应提前分装好，分别按用量放入 60 °C，37 °C 和室温下备用。
2. 回收探针液，加入 0.5 ml 回收杂交液，60 °C 水浴锅中 10 分钟。此步骤中的探针液可回收后供下次使用，可以重复使用 5 次。
3. 用吸管吸掉回收杂交液，加入 4 ml 2× SSC，60 °C 水浴锅中 10 分钟。此步骤中杂交液要丢弃。
4. 用吸管吸掉 2× SSC，加入 4 ml 2× SSC，60 °C 水浴锅中 20 分钟。重复此步骤 3 次。
5. 用吸管吸掉 2× SSC，加入 4 ml 20 µg/ml RNase A 溶液，在 37 °C 孵育 30 分钟。
6. 用吸管吸掉 RNase A 溶液，加入 4 ml 2× SSC，室温静置 10 分钟。
7. 用吸管吸掉 2× SSC，加入 4 ml 0.2× SSC 在 60 °C 水浴锅中 30 分钟。
8. 用吸管吸掉 0.2× SSC，加入 4 ml 0.2× SSC 在 60 °C 水浴锅中 30 分钟。

9. 用吸管吸掉 0.2× SSC，加入 4 ml 1× MAB，室温静置 10 分钟。
10. 用吸管吸掉 1× MAB，加入 4 ml 1× MAB，室温静置 10 分钟。
11. 用吸管吸掉 1× MAB，加入 0.5 ml 2% blocking reagent，摇床 20 转/分钟，室温封闭 1 小时。
12. 用吸管吸掉 2% blocking reagent，加入 0.5 ml 2% blocking reagent，20%羊血清，摇床 20 转/分钟，室温封闭 1 小时。
13. 用 200 μl 移液器吸掉 2% blocking reagent，20%羊血清，加入 0.4 ml 1/2,500 Anti-dig-AP 抗体溶液，摇床 20 转/分钟，室温孵育 4 小时。
14. 用 200 μl 移液器吸掉抗体溶液，加入 4 ml 1× MAB，室温静置 5 分钟。
15. 用吸管吸掉 1× MAB，加入 4 ml 1× MAB，摇床 20 转/分钟，室温 1 小时。重复该步骤至少 5 次。最后一次可以在 4 °C 过夜。

第三天 洗涤和染色

以做 5 瓶胚胎原位杂交为例，第三天需要的溶液量如下：

AP buffer	80 ml
PTw	40 ml

1. 用吸管吸掉 1× MAB，加入 4 ml AP buffer，室温静置 5 分钟。
2. 用吸管吸掉 AP buffer，加入 4 ml AP buffer，室温静置 5 分钟。
3. 用吸管吸掉 AP buffer，加入 0.4 ml BM purple，避光染色。
此时需注意观察，如果 BM purple 变色 (浅紫)，可以换掉加入新鲜的 BM purple。
如希望染色慢些，可以放入 4 °C。染色时间由于探针的不同而不同，有些探针 10 分钟就有信号，有些探针染色时间则长达 3 天。
4. 当信号明显时，用吸管吸掉 BM purple，加入 4 ml AP buffer，室温静置 5 分钟。
5. 用吸管吸掉 AP buffer，加入 4 ml AP buffer，室温静置 5 分钟。
6. 用吸管吸掉 AP buffer，加入 4 ml PTw，室温静置 5 分钟。
7. 用吸管吸掉 PTw，加入 4 ml PTw 室温静置 10 分钟，该步骤可以重复 2~3 次。
8. 用吸管吸掉 PTw，加入 0.6 ml 50% glycerol，等几小时后样品沉底。

9. 用吸管吸掉 50% glycerol, 加入 0.6 ml 70% glycerol, 此时的胚胎可以封片拍照也可以放入-20 °C 保存。
10. 封片: 将两片小圆片 (Zweckform Verstaerkungsringe) 重叠后, 贴在载玻片上, 加入 7 μ l 70% glycerol, 用样品勺依次把 3~5 个样品放入, 用镊子夹着一根头发丝, 在显微镜下把样品的位置摆正后, 在小圆片周围涂上指甲油, 不能太多和太少, 与小圆片等高即可。用镊子将切好尺寸的盖玻片盖上。并在玻片上记下探针名称, 果蝇品系和封片时间。

溶液配方

1. RNase free 水

使用高温烘烤后的细口瓶, 接取纯水仪处理后的超纯水, 用铝箔纸将瓶口裹紧, 在 15lbf/in² (1,034 $\times$ 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 冷却至室温后使用

2. 甲醛固定液 (终浓度为 8%) 10 ml

Fix buffer	1 ml 10 $\times$ PBS
	0.5 ml EGTA (0.5 M pH 8.0)
	1.5 ml RNase free 水
使用之前加入	2 ml 40% formaldehyde
	5 ml heptane

3. 胚胎洗液 (1 L)

100 ml 1 M NaCl

0.4 ml Triton X-100

加 RNase free 水定容至 1 L

4. 漂白液 (20 ml)

10 ml 次氯酸钠溶液

10 ml RNase free 水

5. 10 $\times$ PBS (pH = 7.4)

10× PBS 的配方		
NaCl (MW = 58.44; 1,370 mM)	40.03 g	80.06 g
KCl (MW = 74.55; 27 mM)	1.005 g	2.01 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (MW = 358.14; 100 mM)	17.905 g	35.81 g
KH ₂ PO ₄ (MW = 136.09; 20 mM)	1.36 g	2.72 g
加 RNase free 水至	500 ml	1,000 ml
加 10 M NaOH 调 pH = 7.4	600 µl	1,200 µl

以配制 1,000 ml 10× PBS 为例:

- 1) 称量 80.06 g NaCl; 2.01 g KCl; 35.81 g Na₂HPO₄·12H₂O; 2.72 g KH₂PO₄ 加入 1,000 ml 烧杯中
- 2) 加入 800 ml RNase free 水, 把烧杯放在设定为 60 °C 的水浴锅中, 同时用玻璃棒搅拌使颗粒溶解
- 3) 用 10 M NaOH 溶液调 pH 值至 7.4 (大约 1,200 µl)
- 4) 用 1,000 ml 量筒定容后, 倒入蓝口瓶中, 在 15lb/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。保存于室温

用 RNase free 水稀释 10× PBS 配制成 1× PBS

6. PTw

1× PBS + 0.1% Tween-20 (使用当天配)

以配制 1,000 ml PTw 为例:

用 1,000 ml 量筒量取 1,000 ml 1× PBS

加入 1 ml Tween-20, 充分混匀

7. 0.5 M EGTA

以配制 100 ml 0.5 M EGTA 溶液为例:

- 1) 称量 19.02 g EGTA 加入到 250 ml 烧杯中
- 2) 加入 80 ml RNase free 水, 把 pH 计电极浸入溶液中, 缓慢加入 NaOH 颗粒, 同时用玻璃棒搅动
- 3) 等溶液澄清后用 10 M NaOH 溶液调 pH 值为 8.0
- 4) 用 100 ml 量筒定容为 100 ml, 倒入蓝口瓶中, 在 15lb/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 保存于室温

8. 0.5 M EDTA

以配制 100 ml 0.5 M EDTA 溶液为例:

- 1) 称量 14.6 g EDTA 加入到 250 ml 烧杯中
- 2) 加入 80 ml RNase free 水, 把 pH 计电极浸入溶液中, 缓慢加入 NaOH 颗粒, 同时用玻璃棒搅动
- 3) 等溶液澄清后用 10 M NaOH 溶液调 pH 值为 8.0
- 4) 用 100 ml 量筒定容为 100 ml, 倒入蓝口瓶中, 在 15lbf/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 保存于室温

9. 1 M Tris

1 M Tris 溶液分为三种, 分别为 pH = 7.5、pH = 7.8、pH = 9.5

以配制 100 ml pH = 9.5 1 M Tris 溶液为例:

- 1) 称量 12.11 g Tris 加入到 250 ml 烧杯中
- 2) 加入 80 ml RNase free 水, 用玻璃棒搅拌使颗粒溶解
- 3) 用浓盐酸调 pH 值为 9.5
- 4) 用 100 ml 量筒定容为 100 ml, 倒入蓝口瓶中, 在 15lbf/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 保存于室温

10. Proteinase K

以配制 1 ml 10 mg/ml 储存液为例:

- 1) 称量 10 mg Proteinase K, 加入到 1.5 ml 离心管中
- 2) 加入 980 µl RNase free 水、10 µl 1 M Tris (pH 7.8)、10 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) 充分混合均匀, 但不可以剧烈震荡
- 3) 分装为 22 µl/管, 保存在 -20 °C 冰箱

使用时吸取 10 µl 加入到 10 ml PTw 中, 混匀后就是 10 µg/ml Proteinase K 溶液

11. 0.1 M 三乙醇胺 (Triethanolamine) 溶液 (使用当天配)

以配制 100 ml 0.1 M 三乙醇胺溶液为例:

- 1) 在 200 ml 烧杯中加入大约 90 ml RNase free 水
- 2) 加入 1.332 ml 三乙醇胺, 用玻璃棒搅拌均匀
- 3) 用浓盐酸调 pH 值至 7.8
- 4) 用 RNase free 水在 100 ml 量筒定容至 100 ml

(所加浓盐酸的量为各次经验值，仅供参考):

配制体积	三乙醇胺	浓盐酸	pH 值
130 ml	1.732 ml	580 μ l	7.81
120 ml	1.60 ml	640 μ l	7.84
100 ml	1.332 ml	520 μ l	7.83
80 ml	1.067 ml	387 μ l	7.82
40 ml	0.532 ml	206 μ l	7.84
25 ml	0.333 ml	106 μ l	7.78

12. 乙酸酐 (Acetic anhydride) (使用当天配)

乙酸酐溶液 A (以配制 100 ml 乙酸酐溶液 A 为例):

- 1) 用 100 ml 量筒量取 100 ml 0.1 M 三乙醇胺溶液
- 2) 加入 250 μ l 乙酸酐充分混合均匀
- 3) 乙酸酐溶液 B (以配制 100 ml 乙酸酐溶液 B 为例):
- 4) 用 100 ml 量筒量取 100 ml 0.1 M 三乙醇胺溶液
- 5) 加入 500 μ l 乙酸酐充分混合均匀

注: 乙酸酐属于毒品原料, 需要经特殊部门批准方可购买, 其配制需在通风橱中进行。

13. 4%多聚甲醛

- 1) 打开恒温水浴箱电源, 设置温度为 60 °C
- 2) 称量 2 g 多聚甲醛 (Paraformaldehyde), 放入 200 ml 烧杯中
- 3) 加入 45 ml RNase free 水, 15 μ l 10 M NaOH 溶液, 用锡箔纸密封烧杯口
- 4) 把烧杯放在 60 °C 水浴锅中加热 20 分钟, 中间轻轻摇动烧杯几次, 等待溶液澄清后取出烧杯, 放在冰上冷却
- 5) 加入 5 ml 10 $\times$ PBS, 仍旧用锡箔纸密封, 放在 4 °C 冰箱中, 三天内均可使用

14. 50 $\times$ Denhardt's Solution (100 ml)

1 g Bovine serum albumin (BSA) 1% (w/v)

1 g Ficoll™ 1% (w/v)

1 g PVP 1% (w/v)

用 RNase free 水定容至 100 ml, 分装为 1 ml/管, -20 °C 保存

15. 20× SSC (pH = 7.0) (1 L)

- 1) 称量 175.3 g NaCl; 88.2 g 柠檬酸钠加入 1,000 ml 烧杯中
- 2) 加入 800 ml RNase free 水, 把烧杯放在设定为 60 °C 的加热器上, 同时用玻璃棒搅拌使颗粒溶解
- 3) 用浓 HCl 调 pH 值至 7.0
- 4) 用 1,000 ml 量筒定容后, 倒入蓝口瓶中, 在 15lb/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。保存于室温

用 RNase free 水稀释 20× SSC 配制成 2× SSC, 0.2× SSC

16. 杂交液 (whole mount hybridization buffer)

杂交液中含有的封闭成分比较多, 有利于降低杂交的背景。溶液配好后放在-20 °C 保存。

终浓度	加入量
50% formamide, deionized	25 ml 100% formamide
5× SSC	12.5 ml 20× SSC
1 mg/ml Torula RNA	50 mg Torula RNA
100 µg/ml Heparin	0.5 ml 10 mg/ml Heparin
100 µg/ml sonicated salmon sperm DNA	0.5 ml 10 mg/ml sonicated salmon sperm DNA
1× enhart's Solution	1 ml 50× Denhart's Solution
0.1% Tween-20	0.05 ml Tween-20
0.1% CHAPS	0.5 ml 10% CHAPS
10 mM EDTA	1 ml 0.5 M EDTA (pH = 8.0)
	用RNase free水定容至50 ml

注: 杂交液的配制需在通风橱中进行。

17. RNase A 储存液

一般配制成 10 mg/ml 的储液。以配制 10 ml 为例:

- 1) 称量 100 mg RNase A 加入到 20 ml 称量瓶中
- 2) 加入 9 ml RNase free 水、100 µl 1 M Tris (pH 7.5)、150 µl 1 M NaCl, 用一个 1 ml 枪头搅拌溶液, 使之溶解

- 3) 用电磁炉煮沸一锅水，把称量瓶放入沸水中 15 分钟
- 4) 取出称量瓶，放在室温下等溶液冷却至室温
- 5) 用 10 ml 量筒定容至 10 ml
- 6) 分装为 22 μ l/管，保存在-20 °C 冰箱

使用时吸取 20 μ l 加入到 10 ml 2 $\times$ SSC，混匀后就是 20 μ g/ml RNase A 溶液

18. AP Buffer (Alkaline Phosphatase Buffer) (使用当天配)

终浓度	加入量
100 mM Tris	1 ml 1 M Tris (pH 9.5)
50 mM MgCl ₂	1 ml 500 mM MgCl ₂
100 mM NaCl	1 ml 1 M NaCl
0.1% Tween-20	10 μ l Tween-20
2 mM levamisol	5 mg levamisol (使用前加入)
	用RNase free水定容至10 ml

19. 5 $\times$ MAB (Maleic Acid Buffer, pH = 7.5)

以配制 1,000 ml 5 $\times$ MAB 为例：

- 1) 称量 58.04 g Maleic Acid, 43.83 g NaCl 加入 1,000 ml 烧杯中
- 2) 加入 800 ml RNase free 水，把 pH 计电极浸入溶液，慢慢加入 NaOH 颗粒，同时用玻璃棒搅拌，当 pH 值达到 7.0 时 Maleic Acid 才会完全溶解
- 3) 用 10 M NaOH 溶液调 pH 值至 7.5
- 4) 用 1,000 ml 量筒定容后，倒入蓝口瓶中，在 15lb/in² (1,034 $\times$ 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。保存于室温

20. 封闭剂 (Blocking Reagent)

一般配成 10% 储存液。以配制 50 ml 储存液为例：

- 1) 称量 5 g 封闭剂放入 100 ml 烧杯中
- 2) 加入约 40 ml 1 $\times$ MAB，用玻璃棒搅拌均匀，并水浴锅中 60~80 °C 加热溶解
- 3) 用 1 $\times$ MAB 在 50 ml 量筒定容至 50 ml，倒入离心管中，在 15lb/in² (1,034 $\times$ 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min
- 4) 分装为 1 ml/管，放于-20 °C 保存

5 ml 胚胎用 2% block reagent:

4 ml 1× MAB

1 ml 10% block reagent

21. 羊血清封闭液

封闭用正常羊血清原液 (10 ml/瓶)

灭活:

- 1) 把羊血清放入 56 °C 水浴锅中, 加热 30 分钟
- 2) 取出放在冰上冷却, 分装为 1 ml/管
- 3) 放入-20 °C 冰箱保存

5 ml 胚胎用 2% block reagent 和 20%羊血清封闭液:

3 ml 1× MAB

1 ml 10% block reagent

1 ml 羊血清

22. Anti-Dig-AP 抗体溶液

胚胎用抗体的准备 35 ml (30 ml):

- 1) 1× MAB 5.6 ml (4.8 ml) +羊血清 1.4 ml (1.2 ml) 在 4 °C 预冷 10 分钟
- 2) 加 14 µl (12 µl) Anti-Dig-AP 在 4 °C 孵育 1 个小时
- 3) 加入 10% blocking reagent 7 ml (6 ml), 1× MAB 15.4 ml (13.2 ml), 羊血清 5.6 ml (4.8 ml)

23. 甘油溶液

- 1) 50%甘油

用 25 ml 量筒称量 25 ml 1× PBS, 倒入 50 ml 离心管中, 然后直接向离心管中倒入甘油至管壁上 50 ml 刻度线处。充分混合均匀放在 4 °C 冰箱

- 2) 70%甘油

用 25 ml 量筒称量 15 ml 1× PBS, 倒入 50 ml 离心管中, 然后直接向离心管中倒入甘油至管壁上 50 ml 刻度线处。充分混合均匀放在 4 °C 冰箱

致谢

该文章得到国家自然科学基金 (31571033, 91632107) 和中国科学院前沿重点研究计划 (QYZDY-SSW-SMC015) 的资助; 该实验方案改编自中国科学院生物物理研究所温省云博士毕业论文 (2012); 使用该实验方案发表的文章: Li等 (2012和2014)。

参考文献

1. Inagaki, S., Numata, K., Kondo, T., Tomita, M., Yasuda, K., Kanai, A. and Kageyama, Y. (2005). [Identification and expression analysis of putative mRNA-like non-coding RNA in *Drosophila*](#). *Genes Cells* 10(12): 1163-1173.
2. Kosman, D., Mizutani, C. M., Lemons, D., Cox, W. G., McGinnis, W. and Bier, E. (2004). [Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos](#). *Science* 305(5685): 846.
3. Li, M., Wen, S., Guo, X., Bai, B., Gong, Z., Liu, X., Wang, Y., Zhou, Y., Chen, X., Liu, L. and Chen, R. (2012). [The novel long non-coding RNA CRG regulates *Drosophila* locomotor behavior](#). *Nucleic Acids Res* 40(22): 11714-11727.
4. Li, M., Xu, M., Wen, S., Bai, B., Chen, R. and Liu, L. (2014). [One novel long noncoding RNA *Inc10* in *Drosophila*](#). *J Genet Genomics* 41(2): 79-82.
5. Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). [A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback](#). *Chromosoma* 98(2): 81-85.