果蝇幼虫 CNS 原位杂交实验方案

In situ Hybridization in CNS of *Drosophila* Larvae

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). 果蝇幼虫 CNS 原位杂交实验方案. *Bio-101* e1010247. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010247.

How to cite: Li, M. X., Wen, S. Y., Xu, M. B., Cui, M. Y. and Liu, L. (2019). *In situ* hybridization in CNS of *Drosophila* larvae. *Bio-101* e1010247. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010247. (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 RNA 探针通过碱基互补规则与果蝇幼虫中枢神经组织中待测的 RNA 结合, 之后通过探针上所标记的检测系统将待测 RNA 在果蝇幼虫中枢神经组织中的位置进行定位。

实验目的: 检测某种特定 RNA 在果蝇幼虫中枢神经组织细胞中的表达分布情况。

关键词: RNA 探针, 地高辛, 神经系统, 幼虫, 果蝇

材料与试剂

一、实验器具

1. 一次性耗材

离心管 50 ml, 10 ml, 1.5 ml

一次性枪头 1,000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l

封口膜或保鲜膜

小圆片 (Zweckform Verstaerkungsringe, catalog number: 3510)

指甲油

铝箔纸

2. 孵育器皿

1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)

3. 解剖器具

- 1) 解剖用塑料培养皿 (直径 55 mm): 其底部要铺一层胶 (Dow Corning, Sylgard® 184), 这样可避免镊子尖碰到底部时被弄弯
- 2) 培烧皿 (直径约4 cm带有磨口的盖子): 内装少量脱脂棉, 并倒入少许75%的酒精。在解剖时当镊子尖端附着组织时, 可以轻轻把镊子在酒精棉上擦拭, 把镊子尖端的组织去掉
4. 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. RNase AWAY (Invitrogen, catalog number: 7491543)
2. Glycerol
3. KCl
4. Na₂HPO₄·12H₂O
5. KH₂PO₄
6. NaOH
7. 多聚甲醛 (Paraformaldehyde) (北京益利精细化学品有限公司)
8. Tween-20 (Sigma, catalog number: P1379)
9. Triton X-100 (ICN Biomedicals, catalog number: 58404)
10. Bovine serum albumin (BSA) (华美 Sino-American Biotec BP 0042)
11. Ficoll™ (华美 Sino-American Biotec BIO 322)
12. PVP (华美 Sino-American Biotec BR 2205)
13. NaCl (北京精细化工有限公司)
14. 柠檬酸钠 (北京精细化工有限公司)
15. HCl
16. Formamide (Amresco, catalog number: 1167B35)
17. Torula RNA (Type IX) (Sigma, catalog number: R3629)

18. Heparin (Sigma, catalog number: H3125)
19. Sonicated salmon sperm DNA (Stratagene, catalog number: 201190)
20. CHAPS (Sigma, catalog number: C3023)
21. Levamisole, an inhibitor of endogenous phosphatase (Sigma, catalog number: L9756)
22. DMF (Dimethylformamide, 二甲基甲酰胺) (防化学院化工厂)
23. NBT (硝基四氮唑蓝) (Amresco, catalog number: E1181)
24. BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸) (Amresco, catalog number: E1041)
25. EDTA (Amresco, catalog number: 0322, MW = 292.25)
26. Tris (Amresco, catalog number: 0497, MW = 121.14)
27. RNase A (BBI, catalog number: RB0473)
28. 封闭剂 (Blocking Reagent) (Roche, catalog number: 11096176001)
29. Anti-Dig-AP 抗体 (Roche, catalog number: 11093274910)
30. 甘油 (汕头市西陇化工有限公司)
31. RNase free 水 (见溶液配方)
32. 10× PBS (pH = 7.4) (见溶液配方)
33. 4%多聚甲醛 (见溶液配方)
34. PTw (见溶液配方)
35. PTX (见溶液配方)
36. 0.5 M EDTA (见溶液配方)
37. 1 M Tris (见溶液配方)
38. 50× Denhardt's Solution (100 ml) (见溶液配方)
39. 20× SSC (pH = 7.0) (见溶液配方)
40. 杂交液 (whole mount hybridization buffer) (见溶液配方)
41. RNase A 储存液 (BBI, catalog number: RB0473) (见溶液配方)
42. AP Buffer (Alkaline Phosphatase Buffer) (使用当天配) (见溶液配方)
43. 封闭剂 (Blocking Reagent) (见溶液配方)
44. 羊血清封闭液 (见溶液配方)
45. Anti-Dig-AP 抗体溶液 (见溶液配方)
46. NBT/BCIP 显色剂 (见溶液配方)

47. 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 x 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。

仪器设备

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。

1. 玻璃器皿

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

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

细口瓶 1,000 ml

称量 20 ml

玻璃棒

蓝口瓶

2. 镊子: DUMONT #5 一把; DUMONT #55 一把

3. 样品勺: 是取果蝇脑样本的关键, 一般用直径 0.5 mm 铂金丝制作而成 (普通的不锈钢和铜丝易生锈影响实验, 而且这些材料质地不够细密, 易粘果蝇的组织)

4. MilliQ 纯水仪 (Millipore)

5. 水浴锅 (电热恒温水箱) (北京市长风仪器仪表公司, model: HHW21)

6. DHG 恒温鼓风干燥箱 (山东德瑞克仪器有限公司)

7. 微量恒温器 (北京市方通达科技有限公司, model: TDW-1)

8. 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-L S-50SII)

9. 电子秤 (Acculab, model: ALC-11002) 及微量电子称 (Sartorius, model: CP1 24S)

10. pH 计 (Sartorius, model: PB-10)

11. 体式显微镜 (麦克奥迪, model: SMZ168, 需要配 20 倍的目镜)

12. 冷光源 (北京福凯仪器有限公司, model: LGY-150)

13. 多道计时器
14. Leica DM 2500 显微镜
15. 移液器
16. 冰箱 (4 °C 和-20 °C)
17. 加热器
18. 电磁炉

实验步骤

实验步骤参考 Inagaki 等, (2005); Li 等, (2012 和 2014); Tautz 和 Pfeifle, (1989)。

第一天

一、解剖和固定 (保持无 RNA 酶污染)

以做 5 管幼虫 CNS 原位杂交为例, 第一天需要的溶液量:

1× PBS	50 ml
4%多聚甲醛	5 ml (5 ml 4%多聚甲醛+ 15 µl Triton X-100)

1. 在预冷的 1× PBS 中解剖三龄幼虫 CNS (如图 1), 用样品勺把解好的 CNS 转移固定液中。不必解剖的很干净, 但不要带表皮, 可以带 mouthhook 和 discs。解剖一个固定一个, 每个离心管中加入 1 ml 4%多聚甲醛, 离心管放在冰上。每个离心管中可放 10 个幼虫 CNS。
2. 三龄幼虫 CNS 在 4%多聚甲醛中 4 °C 过夜固定。

图 1. 三龄幼虫 CNS. Scale bar = 100 微米。

第二天

二、杂交 (保持无 RNA 酶污染)

以做 5 管幼虫 CNS 原位杂交为例，第二天需要的溶液量：

PTw	20 ml
杂交液	3 ml
5 种 RNA 探针液 (探针终浓度：10~50 ng/ul)	各 0.3 ml

1. 用 1 ml 移液器吸掉 4%多聚甲醛，加入 1 ml PTw，室温静置 10 分钟。
2. 用 1 ml 移液器吸掉 PTw，加入 1 ml PTw，室温静置 10 分钟。重复该步骤 3 次。
3. 把杂交液在 85~90 °C 中加热 5~7 分钟，然后放在冰上快速冷却至少 5 分钟。
4. 用 1 ml 移液器吸掉 PTw，加入 0.2 ml PTw，再加入 0.2 ml 杂交液，轻弹管壁，混合均匀后，室温静置 10 分钟。
5. 用 1 ml 移液器吸掉 PTw/杂交液，加入 0.3 ml 杂交液，60 °C 水浴锅中预杂交至少 1 小时，最好 4~5 个小时。
6. 把探针液放入 85~90 °C 加热 7 分钟，然后放在冰上快速冷却至少 5 分钟。
7. 用 200 µl 移液器吸掉杂交液，加入 0.2~0.3 ml 探针液，用封口膜或保鲜膜把口封好，放入 60 °C 水浴锅中杂交过夜。

注：步骤 6 和 8 中的杂交液可以回收成为回收杂交液。

第三天

三、洗涤和抗体孵育

以做 5 管幼虫 CNS 原位杂交为例，第二天需要的溶液量：

PTw	25 ml (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
回收杂交液	3 ml (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
4:1 杂交液:PTw	1.5 ml (1.2 ml 杂交液 + 0.3 ml PTw) (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
3:2 杂交液:PTw	1.5 ml (0.9 ml 杂交液 + 0.6 ml PTw) (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
2:3 杂交液:PTw	2 ml (0.8 ml 杂交液 + 1.2 ml PTw) (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
1:4 杂交液:PTw	3 ml (0.6 ml 杂交液 + 2.4 ml PTw) (提前放入 60 °C 水浴锅中预热)
2× SSC	15 ml (10 ml 放在室温) (5 ml 用来配 RNase A 溶液)
20 µg/ml RNase A 溶液	5 ml (提前放在 37 °C 水浴锅中预热)
PTX	15 ml
0.5% block reagent	2 ml
0.5% block reagent 和 10%羊血清	2 ml
抗体溶液	1 ml

1. 回收探针液后，加入 0.3 ml 回收杂交液，60 °C 水浴锅中 10 分钟。
2. 用 1 ml 移液器吸掉杂交液，加入 0.3 ml 回收杂交液，60 °C 水浴锅中，10 分钟。
3. 用 1 ml 移液器吸掉杂交液，加入 0.3 ml 4:1 杂交液:PTw，60 °C 水浴锅中，20 分钟。
4. 用 1 ml 移液器吸掉 4:1 杂交液:PTw，加入 0.3 ml 3:2 杂交液:PTw，60 °C 水浴锅中，20 分钟。
5. 用 1 ml 移液器吸掉 3:2 杂交液:PTw，加入 0.4 ml 2:3 杂交液:PTw，60 °C 水浴锅中，20 分钟。

6. 用 1 ml 移液器吸掉 2:3 杂交液:PTw, 加入 0.6 ml 1:4 杂交液:PTw, 60 °C 水浴锅中 20 分钟。
 7. 用 1 ml 移液器吸掉 1:4 杂交液:PTw, 加入 1 ml PTw, 60 °C 水浴锅中, 20 分钟。
- 注: 步骤 2~7 中的杂交液应予以丢弃, 不再回收使用。*
8. 用 1 ml 移液器吸掉 PTw, 加入 1 ml PTw, 60 °C 水浴锅中, 20 分钟。重复该步骤 5 次。
 9. 用 1 ml 移液器吸掉 PTw, 加入 1 ml 2× SSC, 室温静置 5 分钟。
 10. 用 1 ml 移液器吸掉 2× SSC, 加入 1 ml 20 µg/ml RNase A 溶液, 在 37 °C 水浴锅中孵育 10 分钟。
 11. 用 1 ml 移液器吸掉 RNase A 溶液, 加入 1 ml 2× SSC, 室温静置 5 分钟。
 12. 用 1 ml 移液器吸掉 2× SSC, 加入 1 ml PTX, 室温静置 20 分钟。
 13. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 1 ml PTX, 室温静置 20 分钟。
 14. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 0.4 ml 0.5% block reagent (in PTX) 室温封闭至少 1 个小时。
 15. 用 1 ml 移液器吸掉 0.5% block reagent, 加入 0.4 ml 0.5% block reagent 和 10%羊血清室温封闭至少 1 个小时。
 16. 用 200 µl 移液器吸掉 0.5% block reagent 和 10%羊血清, 加入 0.2 ml 提前在胚胎中孵育后的抗体孵育, 4 °C 过夜。

第四天

四、洗涤和染色

PTX	40 ml
AP buffer	12 ml (2 ml 用来配染色剂)
NBT/BCIP 染色剂	2 ml (2 ml AP buffer + 9 µl NBT + 7 µl BCIP)

1. 回收抗体, 放在 4 °C 保存。加入 1 ml PTX, 室温静置 5 分钟。
2. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 1 ml PTX, 室温静置 5 分钟。
3. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 1 ml PTX, 室温静置 30 分钟。重复该步骤 4 次。

4. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 1 ml RNase free 水, 室温静置 3 分钟。
5. 用 1 ml 移液器吸掉 RNase free 水, 加入 1 ml AP buffer, 室温静置 5 分钟。
6. 用 1 ml 移液器吸掉 AP buffer, 加入 1 ml AP buffer, 室温静置 5 分钟。
7. 用 1 ml 移液器吸掉 AP buffer, 加入 0.4 ml NBT/BCIP 染色剂避光染色。
此时需注意观察, 如果染色剂变色 (浅紫), 可以换掉加入新鲜的染色剂。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。
8. 染色完成后, 用 200 µl 移液器吸掉染色剂, 加入 1 ml 去离子水洗 1 次, 室温静置 3 分钟。
9. 用 1 ml 移液器吸掉去离子水, 加入 1 ml PTX, 室温静置 10 分钟。
10. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 1 ml PTX, 室温静置 1 小时。重复该步骤 3~5 次。这个过程中可以继续解剖染色后的样品, 去掉 CNS 上其他的附着物。
11. 用 1 ml 移液器吸掉 PTX, 加入 0.4 ml 50% glycerol, 几个小时后等样品沉底。
12. 用 1 ml 移液器吸掉 50% glycerol, 加入 0.4 ml 70% glycerol, 此时的样品可以封片拍照也可以放入 -20 °C 保存。
13. 封片: 将两片小圆片 (Zweckform Verstaerkungsringe) 重叠后, 贴在载玻片上, 加入 7 µl 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, 和小圆片等高即可。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, 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 15lb/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 冷却至室温后使用

2. 10× 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

- 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 (经验值为 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

3. 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 μl 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× PBS, 仍旧用锡箔纸密封, 放在 4 °C 冰箱中, 三天内均可使用

4. 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

5. PTX

1× PBS + 0.3% Triton X-100 (使用当天配)

以配制 1,000 ml PTX 为例:

用 1,000 ml 量筒量取 1,000 ml 1× PBS, 加入 3 ml Triton X-100, 充分混匀

6. 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

7. 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 1 M Tris (pH = 9.5) 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, 用铝箔纸将瓶口裹紧, 在 15lbf/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min, 保存于室温

8. 50× Denhardt's Solution (100 ml)

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

1 g 1% (w/v) Ficoll™

1 g 1% (w/v) PVP

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

9. 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

10. 杂交液 (whole mount hybridization buffer)

提供两个配方供参考, 在与 RNA 探针杂交实验中使用配方 1, 因为其中含有的封闭成分比较多, 有利于降低杂交的背景。但在杂交后的洗涤中使用不含 sperm DNA 的配方 2, 因为洗涤的要求不高, 使用成分少的杂交液可以降低实验成本。

溶液配好后放在 -20 °C 保存

杂交液配方 1

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 (Type IX)
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× Denhart'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

杂交液配方 2

终浓度	加入量
50% formamide, deionized	25 ml 100% formamide
5× SSC	12.5 ml 20× SSC
100 µg/ml sonicated salmon sperm DNA	0.5 ml DNA 10 mg/ml sonicated salmon sperm
50 µg/ml Heparin	0.25 ml 10 mg/ml Heparin
0.1% Tween-20	0.05 ml Tween-20
	用 RNase free 水定容至 50 ml

11. 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 20ml 称量瓶中
- 2) 加入 9 ml RNase free 水, 100 μ l 1 M Tris (pH = 7.5), 150 μ l 1 M NaCl, 用 1 ml 枪头搅拌溶液, 使之溶解
- 3) 用电磁炉煮沸一锅水, 将称量瓶放入沸水中 15 分钟
- 4) 取出称量瓶, 放在室温中自然冷却至室温
- 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

12. 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

13. 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

20 ml 幼虫 CNS 用 0.5% block reagent:

19 ml 1x PTX

1 ml 10% block reagent

14. 羊血清封闭液

封闭用正常羊血清原液

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

20 ml 幼虫 CNS 用 0.5% block reagent 和 10%羊血清封闭液:

17 ml 1× PTX

1 ml 10% block reagent

2 ml 羊血清

15. Anti-Dig-AP 抗体

幼虫 CNS 用抗体的准备

- 1) 首先把胚胎处理至胚胎原位杂交步骤中复水后的胚胎 (李美霞等, 2019)
- 2) 用 10%羊血清 (in PTX) 在 4 °C 预孵育胚胎 1 个小时
- 3) 按照 1:2,000 的比例加入抗体 Anti-Dig-AP 在 4 °C 孵育 12 个小时

16. NBT/BCIP 显色剂

- 1) 每毫升 AP Buffer 中加入 4.5 µl NBT 保存液和 3.5 µl BCIP 保存液
- 2) 在 0.7 ml DMF (Dimethylformamide) 中加入 0.3 ml RNase free 水, 混合均匀后为 70% DMF
- 3) NBT 保存液
75 mg NBT (硝基四氮唑蓝) 溶解于 1 ml 70%的DMF, 分装为200 µl/管, -20 °C避光保存, 保存期为1年
- 4) BCIP 保存液
50 mg BCIP (5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸) 溶解于 1 ml 100%的 DMF, 分装为 200 µl/管, -20 °C 避光保存, 保存期为 1 年

17. 甘油

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. 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.
2. 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.
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.