果蝇翅成虫盘 RNA 原位杂交技术

RNA *in situ* Hybridization in *Drosophila* Wing Imaginal Discs

张延松^{1, #}, 刘敏^{1, 2, #}, 朱健^{1, 2, *}

¹生命科学学院, 北京大学, 北京; ²生命科学联合中心, 前沿交叉学科研究院, 北京大学, 北京

*通讯作者邮箱: zhua@pku.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 张延松, 刘敏, 朱健. (2019). 果蝇翅成虫盘 RNA 原位杂交技术. *Bio-101* e1010261. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010261.

How to cite: Zhang, Y. S., Liu, M. and Zhu, A. J. (2019). RNA *in situ* hybridization in *Drosophila* wing imaginal discs. *Bio-101* e1010261. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010261. (in Chinese)

摘要: 原位杂交 (*in situ* hybridization) 是指利用单链核酸分子之间互补碱基配对的原理, 将带有标记的核酸探针与组织内核酸杂交成稳定的杂交双链核苷酸。经过显色反应, 通过光学显微镜或电子显微镜可以对细胞内 mRNA、tRNA 和 rRNA 等 RNA 分子的存在与定位进行检查。原位杂交可以使用 DNA 或者 RNA 探针, 本实验介绍使用 RNA 探针, 对果蝇翅成虫盘组织 mRNA 的原位杂交。

关键词: 果蝇, 翅成虫盘, 原位杂交

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 1.5 ml 塑料离心管 (Corning, AXYGEN, catalog number: MCT-150-C)
3. 果蝇三龄幼虫
4. VectorRed AP substrate Kit (Maravai LifeSciences, Vector Laboratories, SK-5100)
5. NBT/BCIP (Thermo Fisher Scientific, catalog numbers: LA01, LA02)
6. 抗地高辛碱性磷酸酶抗体 (Roche, catalog number: 11093274910)
7. 抗地高辛辣根过氧化物酶抗体 (Roche, catalog number: 1207733)
8. PBS 缓冲液 (Coolaber, catalog number: PM272215100)
9. 吐温-20 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 30189380)

10. 甲酰胺 (VWR Life Science, AMRESCO, catalog number: 0314-500ML)
11. 20× SSC (Solarbio, catalog number: S1035)
12. 肝素 (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: S9276)
13. 鲑鱼精子 DNA (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: D1626)
14. 氯化钠 (NaCl, Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: S7653)
15. 六水合氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: M2393)
16. 左旋咪唑 (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: L9756)
17. 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (1 M Tris-HCl pH 8.8, Solarbio, catalog number: T1010)
18. 4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 441244)
19. 醋酸铵 (NH_4OAc , Merck, Sigma-Aldrich, 631-61-8)
20. 乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: E7148)
21. 甲醇 (CH_3OH , Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 67-56-1)
22. DEPC (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: D5758)
23. 转录缓冲液 (Transcription buffer, Roche, catalog number: 11465384001)
24. 地高辛 RNA 标记混合液 (DIG RNA Labeling Mix, Roche, catalog number: 11277073910)
25. T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA Polymerase, Roche, catalog number: 10881767001)
26. SP6 RNA 聚合酶 (SP6 RNA Polymerase, Roche, catalog number: 10810274001)
27. RNA 酶抑制剂 (RNAase inhibitor, Roche, catalog number: 3335399001)
28. 碳酸钠 (Na_2CO_3 , Merck, Sigma-Aldrich, 497-19-8)
29. 碳酸氢钠 (Na_2HCO_3 , Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: Q0380)
30. 醋酸钠 (NaOAc , Merck, Sigma-Aldrich, 6131-90-4)
31. 氯化锂 (LiCl , Merck, Sigma-Aldrich, 7447-41-8)
32. 转运 RNA (tRNA, Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: A5253-500G)
33. PBSTw 溶液 (见溶液配方)
34. Hyb B (见溶液配方)
35. Hyb A (见溶液配方)

36. 碱性磷酸酶染色溶液 (见溶液配方)

37. DEPC 水 (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液器 (Gilson, models: P2-P1000)
2. -80 °C 超低温冰箱 (Esco, Lexicon, model: UUS-668B-1)
3. 4 °C 及-20 °C 冰箱 (Haier, model: BCD-539WT)
4. 恒温水浴锅 (Thermo Fisher Scientific, model: ISOTEMP 202)
5. 摇床 (杭州米欧, model: RH-24)
6. 冷冻离心机 (Eppendorf, model: 5415D)
7. 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica, model: TCS SP8)
8. 电子天平 (Mettler Toledo, model: PL602-S)

实验步骤

1. RNA 探针制备

RNA 探针一般设计为 200 nt 以上, 探针浓度一般在 500 µg/µl 左右。

用来合成 RNA 探针的模板 DNA 通过 PCR 方法制备, 正义链 5'端加 SP6 RNA 聚合酶结合序列, 反义链 5'端 (即模板 DNA 的 3'端) 加 T7 RNA 聚合酶结合序列, 以供转录。

反义探针用于检测目标 RNA, 正义探针为阴性对照。

- 1.1 在 1.5 ml 塑料离心管中依次加入 13 µl DNA 片段 (总量 2 µg), 2 µl 转录缓冲溶液, 2 µl 地高辛 RNA 标记混合液, 2 µl T7/SP6 RNA 聚合酶 (T7 反义探针, SP6 正义探针), 1 µl RNAase 抑制剂。将离心管置于 37 °C 恒温金属浴孵育 5~10 h。反应结束后, 取 1 µl 反应产物进行 DNA 凝胶电泳, 用于检测探针合成质量。
- 1.2 在离心管中加入 30 µl DEPC 水, 25 µl 240 mM Na₂CO₃, 25 µl 160 mM Na₂HCO₃, 混合均匀置于 60 °C 恒温金属浴孵育 10 min 对探针进行碳酸化处理。

- 1.3 在离心管中依次加入 100 μ l 0.3 M NaOAc, 20 μ l 6 M LiCl, 4 μ l 50 μ g/ μ l tRNA 和 600 μ l 乙醇。
- 1.4 将离心管置于-20 °C 冰箱过夜用以沉淀 RNA 探针。
- 1.5 将离心管置于 4 °C 冷冻离心机以 20,000 $\times$ g 转速离心 30 min。弃上清。
- 1.6 加入 500 μ l 70%乙醇/DEPC 水, 颠倒 5~10 次使 RNA 沉淀漂浮进行洗涤。将离心管置于 4 °C 冷冻离心机以 20,000 $\times$ g 转速离心 30 min。弃上清。
- 1.7 晾干沉淀并加入 100 μ l DEPC 水, 将探针储存于-80 °C 超低温冰箱。

2. 组织原位杂交

准备

- 2.1 在 PBS 缓冲液中解剖果蝇三龄幼虫, 暴露翅成虫盘。具体流程请参照“果蝇翅成虫盘免疫荧光染色”(高远等, 2019) 中组织解剖部分。将解剖完毕的果蝇组织置于 1.5 ml 离心管中。
- 2.2 (预固定处理) 在离心管中加入含 4% PFA 的 PBS 缓冲液 (固定剂), 置于室温固定 20 min。
- 2.3 去除固定剂, 并加入 500 μ l 的 0.3 M NH_4OAc 溶液。再去除 0.3 M NH_4OAc 溶液, 并加入新的 500 μ l 的 0.3 M NH_4OAc 溶液。逐滴加入 500 μ l 乙醇并轻轻颠倒混匀。
- 2.4 (脱水) 去除溶液后加入无水乙醇, 在摇床上 10 min 以完全脱水, 重复此步骤 3 次。此时组织可被储存于-20 °C。

第一天

- 2.5 (脱水) 去除离心管中的乙醇, 加入 1 ml 甲醇置于摇床上洗涤 2 min, 重复 1 次。
- 2.6 (再水化) 去除离心管中的甲醇, 依次加入不同浓度的 PBSTw (PBS 缓冲液加入 0.05%吐温-20)/甲醇混合溶液 (30% PBSTw/70%甲醇、50% PBSTw/50% 甲醇、70% PBSTw/30%甲醇) 各洗涤 2 次, 每次均置于摇床上洗涤 2 min。
- 2.7 使用 PBSTw 溶液洗涤 2 次, 每次均置于摇床上洗涤 2 min。

- 2.8 (固定) 去除 PBSTw 溶液, 加入含 4% PFA 的 PBSTw 溶液 (固定剂), 置于摇床上固定 20 min。
- 2.9 去除固定剂, 使用 PBSTw 溶液中洗涤 5 次, 每次均置于摇床上洗涤 5 min, 以彻底去除固定剂。预留一部分果蝇组织用以预处理抗地高辛碱性磷酸酶抗体 (见步骤 2.15)。
- 2.10 加入 50% PBSTw/50% Hyb B 溶液, 置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.11 去除 50% PBSTw/50% Hyb B 溶液, 加入 Hyb B 溶液中置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.12 (预杂交) 去除 Hyb B 溶液, 加入 150 μ l Hyb A 溶液, 置于 65 °C 恒温金属浴孵育 2 h。
- 2.13 在 99 μ l Hyb A 溶液中加入 1 μ l 探针, 在 80 °C 恒温金属浴孵育 5 min 用以破坏探针可能存在的二级结构, 并立即置于冰上 10 min 防止二级结构再生。
- 2.14 去除 65 °C 孵育所用 Hyb A 溶液, 并加入探针/Hyb A 溶液, 65 °C 恒温金属浴孵育过夜使得探针与目的 RNA 进行杂交。
- 2.15 预处理抗地高辛碱性磷酸酶抗体(1:50 溶于 PBSTw 溶液)用于第二天与探针的地高辛标记进行后续免疫显色反应。将抗体稀释液加入第 2.9 步预留的果蝇组织, 置于摇床上 4 °C 过夜。

第二天

- 2.16 去除探针/Hyb A 溶液, 使用 500 μ l Hyb B 溶液 65 °C 恒温金属浴润洗 7~12 次, 每次 30 min。
- 2.17 去除 Hyb B 溶液, 依次加入 PBSTw (PBS 溶液加入 0.05%吐温)/Hyb B 混合溶液 (30% PBSTw/70% Hyb B、50% PBSTw/50% Hyb B、70% PBSTw/30% Hyb B) 中各洗涤 2 次, 每次均置于摇床上洗涤 30 min。
- 2.18 使用 PBSTw 溶液洗涤 5 次, 每次均置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.19 去除 PBSTw 溶液, 加入 150 μ l 预处理的抗地高辛碱性磷酸酶抗体与探针的地高辛标记反应 (将预处理的抗体 1:40 稀释于 PBSTw 溶液中, 抗体终浓度为 1:2,000), 置于摇床上 4 °C 过夜。

第三天

- 2.20 去除抗体稀释液，使用 PBSTw 溶液洗涤 5 次，每次均置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.21 去除 PBSTw 溶液，使用碱性磷酸酶染色溶液洗涤 3 次，每次均置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.22 加入碱性磷酸酶底物显色溶液 (5.85 μ l NBT/3.3 μ l BCIP)，室温避光在摇床上孵育 5~30 min。如使用红色荧光底物 (VectorRed AP substrate Kit)，参见试剂盒说明书。
- 2.23 去除显色溶液，使用 PBSTw 溶液洗涤 5 次，每次均置于摇床上洗涤 5 min。
- 2.24 将翅成虫盘置于甘油中制片，具体流程请参照“果蝇翅成虫盘免疫荧光染色”(高远等，2019) 中制片部分。

结果与分析

原位杂交结果示例 (图 1):

图 1. 原位杂交实验结果. w^{1118} 基因型果蝇翅成虫盘使用 *wg* 反义荧光探针(A) 和 *wg* 正义荧光探针 (B) 的 VectorRed 红色荧光底物显色。比例尺为 100 μ m。

注意事项

1. 探针的质量

探针质量是决定原位杂交结果的关键环节。我们一般会通过 DNA 凝胶电泳对探针质量进行检测。探针应检测到一条轻微弥散的 RNA 带，过于弥散或者没有条带则代表探针合成质量差 (图 2)。

图 2. *wg* 反义荧光探针的合成检测。泳道左一，DNA Marker (上数第三条最亮条带为 750bp)。泳道左二，*wg* 反义荧光探针反应产物 (RNA 探针制备步骤一)。

2. 所有操作及溶液配制均应在没有 RNA 酶活性的情况下进行。
3. 为保证较低的背景，用幼虫组织预处理抗体，以去除抗体中的杂质信号。
4. DEPC 剧毒，注意防止污染。

溶液配方

1. PBSTw 溶液

PBS 溶液中加入 0.05%吐温-20

2. Hyb B (20 ml)

甲酰胺 10 ml

20× SSC (pH 5.0) 5 ml

PBS 溶液 5 ml

-20 °C 保存

3. Hyb A (10 ml)

甲酰胺 5 ml

20× SSC (pH 5.0) 2.5 ml

肝素 (5 mg/ml) 100 μl

10%吐温-20/PBS 100 μl

鲑鱼精子 DNA (9.5 mg/ml) 105 μl (终浓度 100 μg/ml)

加入 PBS 溶液至 10 ml

-20 °C 保存

4. 碱性磷酸酶染色溶液 (10 ml)

5 M NaCl	200 μ l
1 M Tris-Cl (pH 8.8)	1 ml
1 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	500 μ l
10%吐温-20	100 μ l
100 mM 左旋咪唑	100 μ l
加入 DEPC 水至	10 ml
现用现配	

5. DEPC 水 (1 L)

1 ml DEPC 溶于 1 L 水中，常温过夜以除去水中 RNA 酶活性，高压灭菌

致谢

本实验室的工作得到细胞增殖与分化重点教育部重点实验室、膜生物学国家重点实验室、生命科学联合中心、国家自然科学基金和科学技术部的资金支持。本实验方案改编自本实验室的发表文章 Du 等 (2016)。

参考文献

1. 高远, 刘敏, 朱健. (2019). [果蝇翅成虫盘免疫荧光染色](#). *Bio-101* e1010260. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010260.
2. Du, J., Zhang, J., He, T., Li, Y., Su, Y., Tie, F., Liu, M., Harte, P. J. and Zhu, A. J. (2016). [Stuxnet facilitates the degradation of polycomb protein during development](#). *Dev Cell* 37(6): 507-519.