

果蝇组织荧光原位杂交

Fluorescence *in Situ* Hybridization of *Drosophila* Tissues

刘冀珑^{1, 2, 3, *}

¹生命科学与技术学院, 上海科技大学, 上海, 中国; ²生理学、解剖学和遗传学系, 医学部, 牛津大学, 牛津, 英国; ³胚胎生物学系, 卡内基研究所, 巴尔的摩, 马里兰州, 美国

*通讯作者邮箱: liujl3@shanghaitech.edu.cn 或 jilong.liu@dpag.ox.ac.uk

引用格式: 刘冀珑. (2019). 果蝇组织荧光原位杂交. *Bio-101* e1010301. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010301.

How to cite: Liu, J. L. (2019). Fluorescence *in situ* hybridization of *Drosophila* tissues. *Bio-101* e1010301. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010301. (in Chinese)

摘要: 荧光原位杂交用于 RNA 和 DNA 在组织和细胞中的定位, 而免疫组织化学用于蛋白质的定位。传统的荧光原位杂交技术非常复杂, 耗时, 而且效果不稳定。本文结合作者十几年的果蝇研究经验, 介绍一个快速高效的荧光原位杂交技术。该方法通过设计短的目标序列而定制合成的 DNA 作为模板, 体外转录制备荧光标记的 RNA 探针。针对 DNA 和 RNA 目标采用不同的温度杂交, 然后将样品放在杂交混合液直接制片在激光扫描共聚焦显微镜下直接观察。此外, 结合免疫组织化学和荧光原位杂交可以同时观察蛋白质和核酸在组织及细胞中的分布和定位。

关键词: 果蝇, 原位杂交, 荧光原位杂交, 核酸与蛋白质定位分析

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 培养皿
3. 载玻片
4. 盖玻片
5. 500 μ l 离心管
6. 雌性果蝇成虫
7. Grace's Insect Medium
8. 4%多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)

9. PBS (10×) (Beyotime, ST476)
10. Triton™ X-100
11. 20% Tween 20
12. 马血清
13. 一抗 (特异性结合目标蛋白)
14. 二抗 (带有荧光基团, 特异性结合一抗)
15. DNA 染料: DAPI 或者 Hoechst 33342
16. 凡士林
17. 指甲油
18. C/A/GTP
19. UTP
20. Fluor-UTP (Alexa Fluor® 488-5-UTP, Alexa Fluor® 546-14-UTP 或者 BODIPY®-TR-14-UTP, 产自 Molecular Probes™)
21. 5×转录缓冲液
22. DEPC·H₂O (酸二乙酯处理过的纯水)
23. 模版 DNA
24. T3 RNA 聚合酶
25. 甲酰胺
26. 20×盐水-柠檬酸钠缓冲液
27. 肝素
28. 酵母 tRNA
29. 柠檬酸
30. 丙酮
31. 原位混合液 (见溶液配方)
32. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)
33. PST (1×) (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子
2. 解剖显微镜 (Olympus, SZ61)

3. 移液器 (200 μ l 和 20 μ l)
4. 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica Sp5II 或 SP8)
5. 果蝇二氧化碳麻醉工作站

实验步骤

一、DNA 模板的序列设计

本技术先从 DNA 寡聚体中通过体外转录制备短的荧光标记的 RNA 探针。下面是 DNA 寡聚体模板的序列设计方法。

1. 找到一个成熟的 RNA 序列 (mRNA, miRNA, lncRNA 等)。
2. 将所有“U”替换为“T”。
3. 从替换后的序列中选择一段 (20~50 核苷酸长)。

注：对于短 RNA (< 50 核苷酸)，可使用整个成熟序列。对于长 RNA，使用 50 个核苷酸。

4. 确保所选择的片段中有> 10 “A”s (即 10 个 A 碱基)。如果少于 10“A”s，在 5'端加上一些“A”s，组成 10“A”s (确保片段中含有 10 个以上的 A 碱基)。DNA 模板包含 10 个以上的 “A” 碱基的目的是后面经体外转录生成的 RNA 探针有足够的 U 碱基获得标记。
5. 在 3'端添加 T3 启动子标签 (CCCTTTAGTGGGTTAATT)。如果目标序列以“C”结尾，则删除多余的“C”。
6. 用整个寡核苷酸序列 BLAST 基因组，确保基因组中没有类似的序列。如果是，改变目标序列以避免交叉反应。
7. 如果目标 RNA 足够长，设计两个非重叠探针。
8. 订购 DNA 寡聚体。

二、体外转录制备荧光标记的 RNA 探针

1. 将下表所示的化学品添加到 500 μ l 的离心管中。

化合物	体积 (μl)	备注
20 mM C/A/GTP	1	20 mM C/A/GTP = 20 mM CTP + 20 mM ATP + 20 mM GTP
10 mM UTP	1.4	
1 mM Fluor-UTP	2	Alexa Fluor® 488-5-UTP, Alexa Fluor® 546-14-UTP 或者 BODIPY®-TR-14-UTP (产自 Molecular Probes™)
5×转录缓冲液	4	STRATEGENE® 5×转录缓冲液比较好用
DEPC·H ₂ O	7.6	酸二乙酯处理过的纯水
模版 DNA	2	模版 DNA 的体积依据其浓度而改变。一般而言，模版 DNA 总量控制在 500 ng 线化质粒 DNA 或者 100 ng PCR 产物。
T3 RNA 聚合酶	2	在 20 μl 反应中使用 50 单位的 RNA 聚合酶。
总计	20	

2. 简单混合和离心。
3. 在 37 °C 下孵育 2 小时。
4. 用层析柱或乙醇沉淀法纯化 RNA 探针。
5. (可选) 用非变性琼脂糖凝胶电泳 (含或不含溴化乙锭染色) 分析 0.5 μl 荧光标记的 RNA 探针。
6. 将荧光标记的 RNA 探针按 1:50 比例稀释在原位混合液中作为探针储存液。将探针储存液存放在-20 °C 下。

三、果蝇组织即速荧光原位杂交

1. 在 Grace's Insect Medium 中解剖果蝇 (解剖方法参见: 吴铮和刘冀珑 [2019]; Tastan 和 Liu [2015])。
2. 将样品 (压片或者全组织标本) 固定在固定剂中 (1× PBS 中 4% 多聚甲醛用于检测 RNA, 或 95% 乙醇用于检测 DNA) 室温 15~30 分钟。
3. 对于压片样品希望检测 DNA, 请转到第 8 步。对于所有其他样品, 用 PBS 清洗样品两次, 每次 5 min。
4. 对于压片样品希望检测 RNA, 请转到第 7 步。对于全组织标本, 将 20 μl 20% 吐温添加到 1 ml 洗涤液 (= PBS) 中 (以防止粘性), 并将组织转移到 500 μl 小管中。尽可能地丢弃液体。
5. 用 100 μl 原位混合液清洗, 5 分钟。

6. 将样品储存在-20 °C 原位混合液中 (样品可储存数月至数年), 或执行第 9 步。
7. 对于压片样品, 转移到 95%乙醇中, 5 分钟。
8. 将载玻片一个一个地浸入丙酮中, 每个 5 秒, 然后让载玻片在通风橱中风干。
9. 加荧光标记探针, 使用 1:50~5K (取决于探针强度)。无热处理。
10. 42 °C (RNA) 或 52 °C (DNA) 过夜。也可以只在 90 °C 处理 5 分钟。
11. 将杂交后的样品放进-20 °C 保存 (样品可储存几天至数年), 或者制片放在显微镜下观察及成像 (效果参见 Liu 等, 2006 一文中图 1, 6D-E, 8 和 Liu 和 Gall, 2007 一文中图 1C-H)。

四、果蝇组织蛋白质和 RNA/DNA 定位

1. 如果希望定位蛋白质和 RNA 和 (或) DNA, 可以先按照正常免疫组织化学, 分别用一抗和二抗过夜将蛋白质染色。
2. 免疫荧光染色完的样品用 4%多聚甲醛在室温下再固定 5 分钟。
3. 然后用 PBS 洗去固定液 (4%多聚甲醛)。
4. 将样品放入杂交混合液, 储存在-20 °C 原位混合液中 (样品可储存数月至数年), 或执行第 5 步。
5. 加荧光标记探针 (注意荧光探针必须与蛋白质荧光染料发射光谱有所不同, 必须在显微镜下可以区别开蛋白质标记的荧光和核酸标记的荧光), 使用 1:50~5K (取决于探针强度)。无热处理。
6. 42 °C (RNA) 或 52 °C (DNA) 过夜。
7. 将杂交后的样品放进-20 °C 保存 (样品可储存几天至数年), 或者制片放在显微镜下观察及成像 (效果参见 Liu 等, 2006 一文中图 2-4, 6A-C, 7 和 Liu 和 Gall, 2007 一文中图 1A-B, 2D)。

五、制片和成像

1. 在干净的工作台上铺两层纸巾。
2. 用镊子夹住盖玻片 (18 mm × 18 mm) 的一角, 把盖玻片轻轻放置在纸巾上。
3. 在盖玻片四角涂上凡士林。
4. 使用移液器把杂交后的组织和 15 μ l 左右的杂交混合液转移至盖玻片上。如果组织太大, 需要把移液枪头末端用锋利的刀片切去末端, 使得开口足够大。

5. 将载玻片轻轻压在盖玻片上，注意同时接触到盖玻片四角的凡士林。使得盖玻片通过凡士林粘在载玻片上。翻转载玻片，使得盖玻片在上面，轻轻将载玻片放置于纸巾上。
6. 使用干净的移液管轮流轻压盖玻片四角，使得四角的高度一致。如果有气泡，可以倾斜载玻片并且轻压盖玻片来赶出气泡。如果有液体溢出，轻轻用纸巾吸取多余的液体。
7. 使用指甲油将盖玻片的四周密封。注意保持盖玻片中心和有样品的位置没有指甲油。
8. 待指甲油干了之后，仔细检查密封情况。必要时补充指甲油。
9. 密封好的样品可以立即使用荧光显微镜或者激光扫描共聚焦显微镜观察并进行成像。
10. 制片尽量在使用显微镜成像之前半小时至 4 小时之内完成。对于非新鲜的含样品的载玻片可以放在-20 °C 保存。

溶液配方

1. 原位混合液 (*In situ* mix)

按如下比例配制 50 ml 原位混合液：

化合物 (中文名)	化合物 (英文名)	体积 (ml)
甲酰胺	Formamide	25
20 倍盐水-柠檬酸钠缓冲液	20× SSC	12.5
肝素 (5 毫克/毫升)	Heparin (5 mg/ml)	0.5
酵母 tRNA (50 毫克/毫升)	Yeast tRNA (50 mg/ml)	0.5
柠檬酸 (0.5 M pH 6.0)	Citric acid (0.5 M, pH 6.0)	0.92
酸二乙酯处理过的纯水	DEPC·H ₂ O	10.28
20% 吐温 20	20% Tween 20	0.25
DNA 染料 (1 毫克/毫升 DAPI 或 Hoechst 33342)	DNA Dye (1 mg/ml DAPI or Hoechst 33342)	0.05
总计	TOTAL	50

配制原位混合液，在室温充分混匀，以 2 ml 为单位分装在 25 个离心管中，保存于-80 °C

2. 磷酸缓冲液 (1× PBS)

使用去离子水稀释 PBS (10×) (Beyotime ST476) 至 1×

3. PST (1×)
1× PBS
0.3% TritonTM X-100
0.5% 马血清

致谢

早期方法为作者在美国卡内基研究所 Joseph Gall 实验室做博士后期间优化。刘冀珑实验室的工作得到上海科技大学，英国牛津大学以及英国医学理事会的支持。本文实验方案改编自 Liu 等 (2006), Liu 和 Gall (2007) 以及 Nizami 等 (2015).

参考文献

1. 吴铮 , 刘冀珑. (2019). [果蝇组织免疫组织化学.](#) *Bio-101*:e1010256. 10.21769/BioProtoc.1010256.
2. Liu, J. L., Murphy, C., Buszczak, M., Clatterbuck, S., Goodman, R. and Gall, J. G. (2006). [The *Drosophila melanogaster* Cajal body.](#) *J Cell Biol* 172(6): 875-884.
3. Liu, J. L. and Gall, J. G. (2007). [U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28): 11655-11659.
4. Nizami, Z. F., Liu, J. L. and Gall, J. G. (2015). [Fluorescent *in situ* hybridization of nuclear bodies in *Drosophila melanogaster* ovaries.](#) *Methods Mol Biol* 1328: 137-149.
5. Tastan Ö. Y and Liu J. L. (2015). [Visualizing Cytoophidia Expression in *Drosophila* Follicle Cells via Immunohistochemistry.](#) *Methods Mol Biol* 1328:179-189.