

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00522

斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程

张春霞, 刘峰

中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 整胚原位杂交技术是利用反义 RNA 探针检测体内 mRNA 表达的一项技术, 在利用模式动物研究基因时空表达方面有着重要的应用。如何使用该技术得到特异、高敏感度的表达结果, 对每一个使用该技术的实验室来说都很重要。本实验室参经常规的实验方法, 对该技术加以改进, 使之更加灵敏, 结果更加特异。文章主要以斑马鱼为例, 介绍了整胚原位杂交技术的发展历史, 并重点介绍了本实验室所用的整胚原位杂交实验流程, 同时还分析了实验结果不理想的原因及其解决方法。

关键词: 斑马鱼; 整胚原位杂交

A brief protocol for high-resolution whole mount *in situ* hybridization in zebrafish

ZHANG Chun-Xia, LIU Feng

State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Whole mount *in situ* hybridization (WISH) is a popular technique that is used to study temporal-spatial gene expression at mRNA level in model systems. Sensitive and high-resolution WISH is important for every laboratory that uses this technique to study expression pattern of genes in wildtype and perturbed embryos. Based on the commonly used protocols in fish community, our lab optimizes them to get more sensitive and specific results. Here, we briefly summarize the history of this technology using zebrafish as an example, describe a detailed experimental protocol, and provide troubleshooting for imperfect results and their solution.

Keywords: zebrafish; whole mount *in situ* hybridization

整胚原位杂交技术是利用反义 RNA 探针检测体内 mRNA 表达的一项技术, 在研究基因时空表达方面有着重要的应用。其原理如图 1 所示: 在胚胎组织或细胞结构保持不变的情况下, 根据碱基互补配对原则, 地高辛标记的反义 RNA 探针与细胞内的

mRNA 特异性结合, 利用免疫组织化学的方法, 碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体与杂交的核酸探针特异性结合, 然后用碱性磷酸酶的发光底物进行显色。这一过程可将基因在体内的表达信号放大, 利用显微镜检测基因的时空表达方式及其表达水平。

收稿日期: 2012-11-14; 修回日期: 2012-12-27

作者简介: 张春霞, 在读博士研究生, 专业方向: 细胞生物学。Tel: 010-64807562; E-mail: zhangchxa@163.com

通讯作者: 刘峰, 研究员, 研究方向: 血液与心血管发育生物学。E-mail: liuf@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2013-1-30 16:14:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130130.1614.003.html>

整胚原位杂交技术已经广泛应用在各种模式动物中。以斑马鱼为例, 整胚原位杂交技术主要应用在以下方面: (1) 检测基因的时空表达, 为研究该基因功能以及基因分类提供线索; (2) 在高通量药物筛选或突变体筛选中, 特异表达的基因标记可作为筛选的重要依据。

自 1969 年 Gall 和 Pardue 利用放射性标记 DNA 在爪蟾组织切片中检测基因表达以后^[1], 原位杂交的方法就逐渐应用到基因定位的研究中。在后续的应用中, 原位杂交的方法不断得以改进并广泛应用。在斑马鱼发展成为一种动物模型后, Westerfield 等^[2]使用该技术在斑马鱼切片中检测基因的表达。同年, Nusslein-Volhard 等^[3]将 Cox 建立的 RNA 原位杂交技术进行了改进, 用地高辛标记的 RNA 在斑马鱼胚胎中检测基因表达^[4]。随后, 整胚原位杂交技术

迅速应用于斑马鱼领域。2008 年, Bernard Thisse 等将该技术进一步优化, 使之更敏感, 也提高了基因表达检测的分辨率。

自 2009 年成立实验室以来, 我们一直致力于斑马鱼造血干细胞发育的研究, 整胚原位杂交技术成为实验室的一项基本技术, 用于检测造血干细胞发育相关调控因子的表达变化^[6]。我们参考“*The Zebrafish Book*”^[7]以及 Bernard Thisse^[5]提供的方法, 根据需要加以优化, 成功降低了染色背景, 提高了敏感度。现将本实验室常规使用的斑马鱼整胚原位杂交的具体实验方法与流程介绍如下。

1 材料

1.1 探针制备及原位杂交所需试剂

T7RNA polymerase(Promega, P2075); SP6 RNA

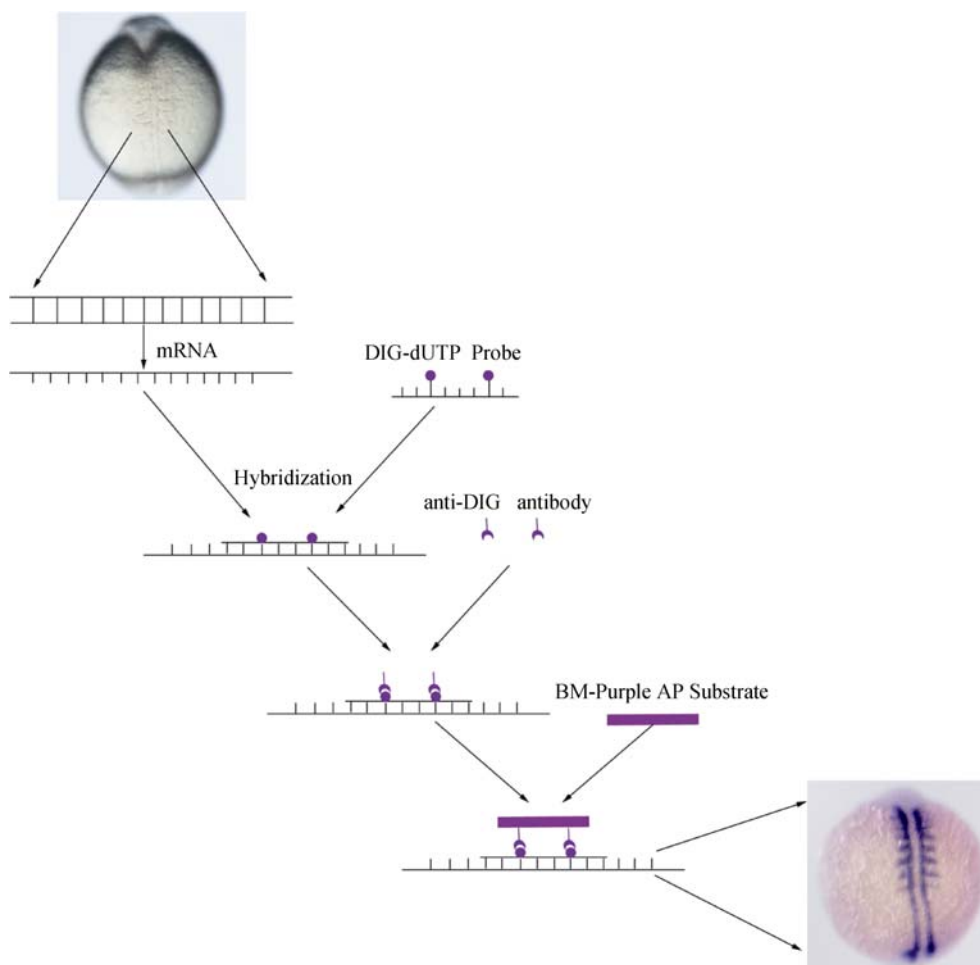


图 1 斑马鱼整胚原位杂交技术原理

地高辛标记的反义 RNA 探针与细胞内的 mRNA 特异性结合, 利用免疫组织化学的方法, 碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体与杂交的核酸探针特异性结合, 然后用碱性磷酸酶的发光底物进行显色。图中原位杂交结果为 14 hpf *myoD* 基因表达情况。

polymerase(Promega, P1085); DNase I(NEB, M0303S); Heparin sodium salt (Sigma, H4784); tRNA(RNA from torlua yeast, Type VI, Sigma, R6225); Pronase (Sigma, P6911); Protease K(Amresco, 0706); Blocking Reagent(Roche, 11096176001); anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments(Roche, 11093274910); BM Purple(Roche, 11442074001), PFA(Paraformaldehyde, Merck, 104005); 其余试剂均购自北京化工。

1.2 探针制备及原位杂交所需器材

LF-杂交炉, ZF-A4 原位杂交仪(北京直方, 可选)。

1.3 原位杂交所需溶液配制

10×PBS 储液(1L, 室温保存): 80 g NaCl, 2 g KCl, 27.98 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.4 g KH_2PO_4 , 溶于 1 L 双蒸水。

1×PBST(1 L, 室温保存): 100 mL 10×PBS, 1 mL Tween 20, 用双蒸水定容至 1 L。

4% PFA(500 mL, 4 保存): 20 g PFA 粉末, 溶于 500 mL 1×PBS。PFA 不易溶解, 需要加热搅拌, 但加热温度不能高于 70 。

20×SSC 储液(pH7.0, 1 L, 室温保存): 175.3 g NaCl, 100.5 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 溶于 1 L 双蒸水。

2×SSC(200 mL, 使用前 65 预热): 20 mL 20×SSC, 200 μL Tween-20, 用双蒸水定容至 200 mL。

0.2×SSC(500 mL, 使用前 65 预热): 5 mL 20×SSC, 500 μL Tween-20, 用双蒸水定容至 500 mL。

Pronase(Pronase, 30 mg/mL, 20 保存): 390 mg Pronase 粉末, 溶于 13 mL 缓冲液中, 然后置于 37 水浴 1 h, 分装, -20 保存。使用时, 用 1×PBS 稀释至 1 mg/mL, 可回收利用 2~3 次。缓冲液(100 mL): 121.1 g Tris, 58.5 g NaCl, 溶于 100 mL 双蒸水中。

Protease K(-20 保存): 将 Protease K 按照 10 mg/mL 的浓度, 溶于双蒸水中制成储液。使用时, 按照 1:1000 的比例将储液加入 1×PBST 中, 使其终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

预杂交液 Hybe-(1 L, 室温保存, 使用前 65 预热): 500 mL 甲酰胺, 250 mL 20×SSC, 9.2 mL 1 mol/L 柠檬酸, 1 mL Tween-20, 用双蒸水定容至 1 L。

杂交液 Hybe+(4 保存, 使用前 65 预热): 向 Hybe-溶液中加入 tRNA 和肝素, 使其终浓度分别为 500 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

tRNA 储液(50 mg/mL, 4 保存) 5 g tRNA 粉末,

溶于 100 mL 双蒸水中。注意: tRNA 不易溶解, 配制时间相对较长。

肝素储液(100 mg/mL, -20 保存): 100 mg 肝素粉末, 溶于 1 mL 双蒸水中。

MAB 溶液(1 L, 室温保存): 11.6 g 马来酸, 8.8 g NaCl, 溶于 950 mL 双蒸水中, 约用 8 g NaOH 固体调节 pH 值至 7.5, 用双蒸水定容至 1 L。

MABT 溶液(1 L, 室温保存): 1 L MAB 溶液中加入 1 mL Tween-20 使其终浓度为 0.1%(v/v)。

封闭液(MAB Block, 1 L, -20 保存): 20 g Blocking Reagent, 溶于 1 L MAB 溶液, 使之终浓度为 2%(w/v), 在 65 加热, 每隔几分钟摇晃一次, 彻底溶解后分装, -20 保存, 使用时提前解冻。

抗体溶液(现用现配): 将 anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments 按照 1 5000 溶于封闭液中。

平衡缓冲液(BCL Buffer, 200 mL, 现用现配): 1 mol/L Tris-HCl(pH9.5)20 mL, 5 mol/L NaCl 4 mL, 0.5 mol/L MgCl_2 10 mL, 20% Tween-20 1 mL, 用双蒸水定容至 50 mL。

2 实验流程

2.1 探针制备实验流程

反义 RNA 探针的获得是通过 DNA 转录而来的。本实验室常采用的方法是以总 RNA 反转录产物为模板, 克隆得到相应的 DNA 片段, 并将该片段连接到 pGEM-T 或 pGEM-T easy 载体中, 通过转化获得反向重组质粒。并以此为模板, 在体外用相应的 T7 或 SP6 RNA 聚合酶进行转录。相对于直接用 PCR 产物为模板转录得到反义 RNA 探针的方法, 该方法所需时间比较长, 但探针获得量较大, 而且各阶段所得的产物相对比较稳定, 可长时间储存。

引物设计原则: 为避免反义 RNA 探针的非特异性结合, 在设计引物时, 一般选择 3'非翻译区, PCR 产物长度一般为 800~1 200 bp。

在获得重组质粒后, 需将质粒线性化: 以 T7 正向为例, 选择片段中不含有、T7 方向含有的酶切位点进行线性化。在后期转录时, 以线性化质粒为模板, 用 SP6 进行转录。转录结束后, 取 1 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。获得转录产物后, 每管加入 1 μL DNase 置于 37 水浴消化 15 min。消化完毕,

每管用 RNase Free ddH₂O 补至 100 μL, 加入 2 倍体积(200 μL)RNase Free 的无水乙醇和 1/10 体积(10 μL)RNase Free 的醋酸钠(3 mol/L), 点振混匀, 置于 -20℃ 沉淀至少 30 min。沉淀后的 RNA 产物, 每管加入 50~80 μL(按电泳条带亮度确定)RNase Free ddH₂O 充分溶解 RNA, 浓度约为 30~100 ng/μL。用 Hybe+稀释至 1:10 储液, -80℃ 储存, 使用时用 Hybe+稀释至 1:200。

表 1 体外转录反应体系

成分	体积
DNA template	11 μL
5×Buffer	4 μL
DDT	2 μL
DIG-Labeling Mix	2 μL
RNase inhibitor	0.5 μL
SP6 RNA Polymerase	1 μL
	37℃ 水浴, 1.5 h

2.2 整胚原位杂交实验流程

本实验室整胚原位杂交第 1 d 步骤手动操作, 第 2 d 与第 3 d 的清洗步骤使用 ZF-A4 原位杂交仪(可选)进行操作。

2.2.1 整胚原位杂交准备工作

1. 取所需时期的斑马鱼胚胎(24 hpf 以后的胚胎需用含 0.003% PTU 的鱼水培养以防色素生成), 用 Pronase 除掉卵壳或在显微镜下用显微镊徒手剥去卵壳, 然后加入 4% PFA, 置于 4℃ 过夜固定。

2. 吸出 4% PFA, 加入无水甲醇, 置于 -20℃ 脱水至少 2 h。

2.2.2 第 1 d 探针杂交

1. 选择合适时期的胚胎(每管胚胎不超过 30 枚), 按如下步骤逐步复水至 PBST:

- 75% methanol + 25% PBST, 5 min;
- 50% methanol + 50% PBST, 5 min;
- 25% methanol + 75% PBST, 5 min;
- 100% PBST, 5 min, 4 次;

2. 用 10 μg/mL Protease K 处理胚胎, 进行通透。处理时间根据时期作不同处理, 参考值: 24 hpf 之前的时期不用处理, 24 hpf 胚胎处理 8~9 min, 36 hpf 胚胎处理 13 min, 4 dpf 胚胎处理 40 min;

- 3. 用 PBST 洗 5 min, 2 次;
- 4. 用 4% PFA 室温固定 20 min;
- 5. 用 PBST 洗 5 min, 5 次, 在室温下放在摇床上慢速摇晃;
- 6. 用 50% PBST + 50% Hybe-洗 5 min;
- 7. 加入预杂交液 Hybe-, 65℃ (LF-杂交炉)预杂交至少 1 h;
- 8. 加入 100~200 μL 用杂交液 Hybe+按照 1:200 稀释的 RNA 探针(200 μL 杂交液约含 30~100 ng RNA), 65℃ 杂交过夜。

注意: 如果晚期胚胎长有色素, 需在步骤 4 固定后进行以下脱色处理。

脱色液需现用现配: 10 mL 脱色液含有 5.67 mL H₂O, 3.33 mL H₂O₂, 1 mL(50% formamide+5×SSC), 充分混合均匀, 加入装有胚胎的 EP 管中, 置于强光下进行脱色(一般置于显微镜下, 打底光照射), 4 d 的胚胎需用 8~10 min, 在脱色过程中要及时放气, 以防 EP 管崩开。脱色完毕, 转至上述步骤 3。

2.2.3 第 2 d 抗体孵育

若采用手动清洗, 按照以下步骤进行:

- 1. 将探针吸出回收, 贮存于 -20℃ (探针可回收利用约 4~6 次);
- 2. 在 65℃ 进行如下梯度洗涤:
100% Hybe-, 10 min;
75% Hybe- + 25% 2×SSC, 10 min;
50% Hybe- + 50% 2×SSC, 10 min;
25% Hybe- + 75% 2×SSC, 10 min;
2×SSC, 10 min;
0.2×SSC, 15 min, 4 次;
- 3. 在慢速摇晃的摇床上室温进行下列梯度洗涤:
75% 0.2×SSC + 25% MABT, 5 min;
50% 0.2×SSC + 50% MABT, 5 min;
25% 0.2×SSC + 75% MABT, 5 min;
100% MABT, 5 min;
- 4. 用封闭液(即 MAB Block)进行封闭, 室温 1 h, 慢速摇晃;

5. 吸走 MAB Block, 加入 1:5000 稀释的抗体(Roche), 室温摇晃 1 h, 放于 4℃ 过夜。

若采用机器自动清洗, 按照以下步骤进行:

- 1. 按上述步骤 1 回收探针后, 每管加入 500 μL 65℃ 预热的 Hybe-溶液, 用塑料吸管轻轻将胚胎吹起, 并将之缓慢转移至含有足量 65℃ 预热 Hybe-溶液的杂交槽中;

2. 将杂交槽放入原位杂交仪中, 选择第 2 d 程序, 按顺序摆放第 2 d 所需溶液, 如图 2 程序所示, 进行清洗;
3. 100% MABT 清洗完毕后, 将杂交槽从杂交仪中取出, 加入足量封闭液(即 MAB Block, 提前从 -20 取出)进行封闭, 室温 1 h, 慢速摇晃;
4. 吸走 MAB Block, 加入足量 1 : 5000 稀释的抗体(Roche), 室温摇晃 1 h, 放于 4 过夜。

2.2.4 第 3 d 染色

若采用手动清洗, 按照以下步骤进行 :

1. 将隔夜孵育的样品置于室温摇晃 1 h, 然后

- 吸走抗体(抗体可回收利用 2 次);
2. 室温下用 MABT 洗涤 15 min, 8 次;
3. 用 BCL Buffer 洗涤 5 min, 3 次;
4. 用 BCL Buffer 与 BM Purple 按 1 : 1 配成显色液, 在室温下避光显色;
5. 显色完成后, 用 4% PFA 室温固定至少 20 min;
6. 用 PBST 洗涤 5 min, 3 次;
7. 最后吸走 PBST, 加入 90% glycerol, 置于 4 储存, 用于后续观察和拍照。

注意 :在显色过程中, 如果染色速度很快, 则可在 4 进行缓慢染色或稀释显色液。

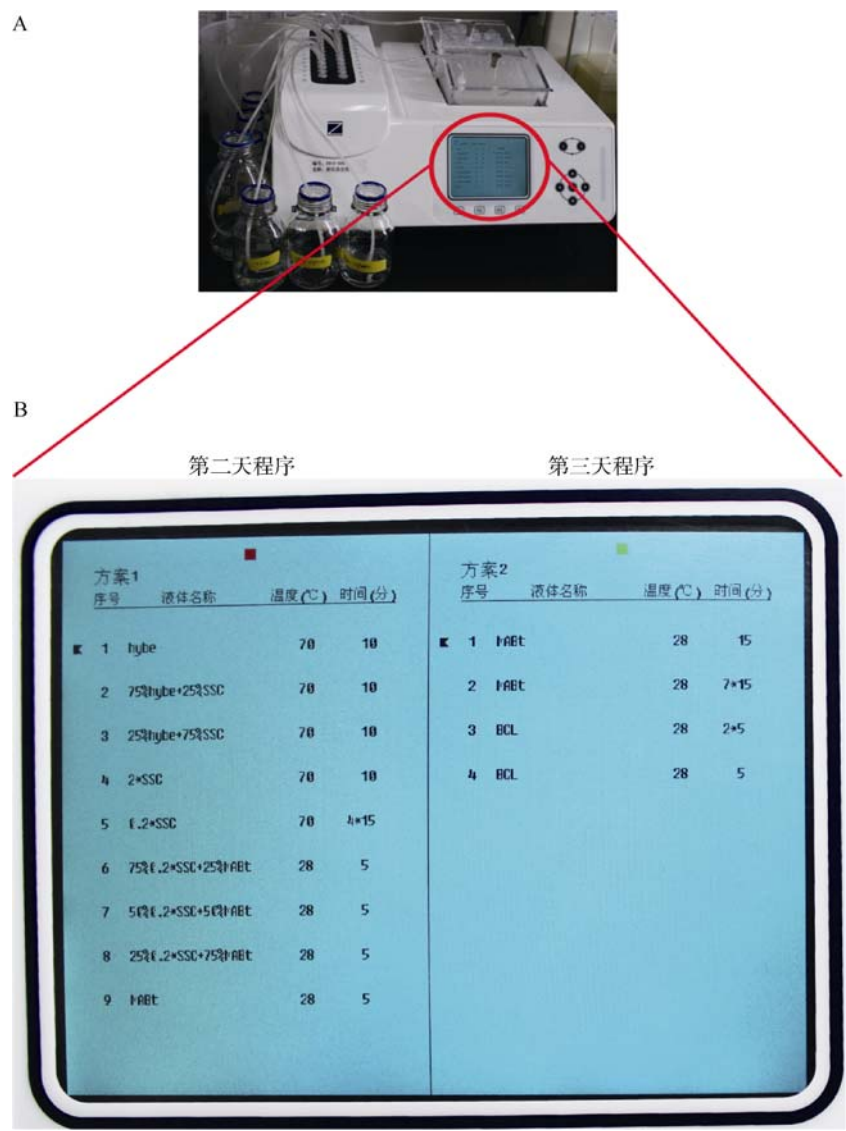


图 2 斑马鱼整胚原位杂交自动程序
A: ZF-A4 原位杂交仪; B : 原位杂交仪中设定的第 2 d 和第 3 d 的程序。

若采用机器自动清洗, 按照以下步骤进行:

1. 按上述步骤 1 回收抗体后, 将杂交槽放入原位杂交仪中, 按顺序摆放第 3 d 所需溶液, 如图 2 程序所示, 进行清洗。

2. 将杂交槽从杂交仪中取出, 用塑料吸管轻轻将胚胎转移至新的 EP 管中, 用 BCL Buffer 与 BM Purple 按 1:1 配成显色液, 分别加入各管中, 在室温下避光显色;

3. 显色完毕, 按上述步骤 5~7 进行终止。

2.2.5 图像采集

90%glycerol 储存的染色胚胎置于玻璃反应板中, 如图 3A 所示, 在外置光源下, 用 Nikon SMZ1500 体视显微镜和 Nikon DIGITAL SIGHT DS-Ri1 数码摄像头进行拍照。

3 常见问题及解决方案

常见问题及解决方案见表 2。

4 结果示例及经验总结

使用本文所述的实验流程得到的结果如图 3B 和 3C 所示, 胚胎染色清晰, 结构完整。而且, 使用原位杂交仪进行清洗, 省时省力, 同时避免了人为因素的影响, 实验结果更加稳定。但是需要注意, 转移胚胎的过程动作一定要轻柔, 使用杂交槽之前, 务必确保杂交槽干净, 以免有杂物沾染胚胎。

相对于常规原位杂交方法, 本方法对胚胎处理及清洗过程都进行了严格的优化, 能够成功降低背景, 提高特异性。例如, 在清洗过程中进行充分的梯度溶液转换, 避免胚胎受不同溶液的影响; 清洗时

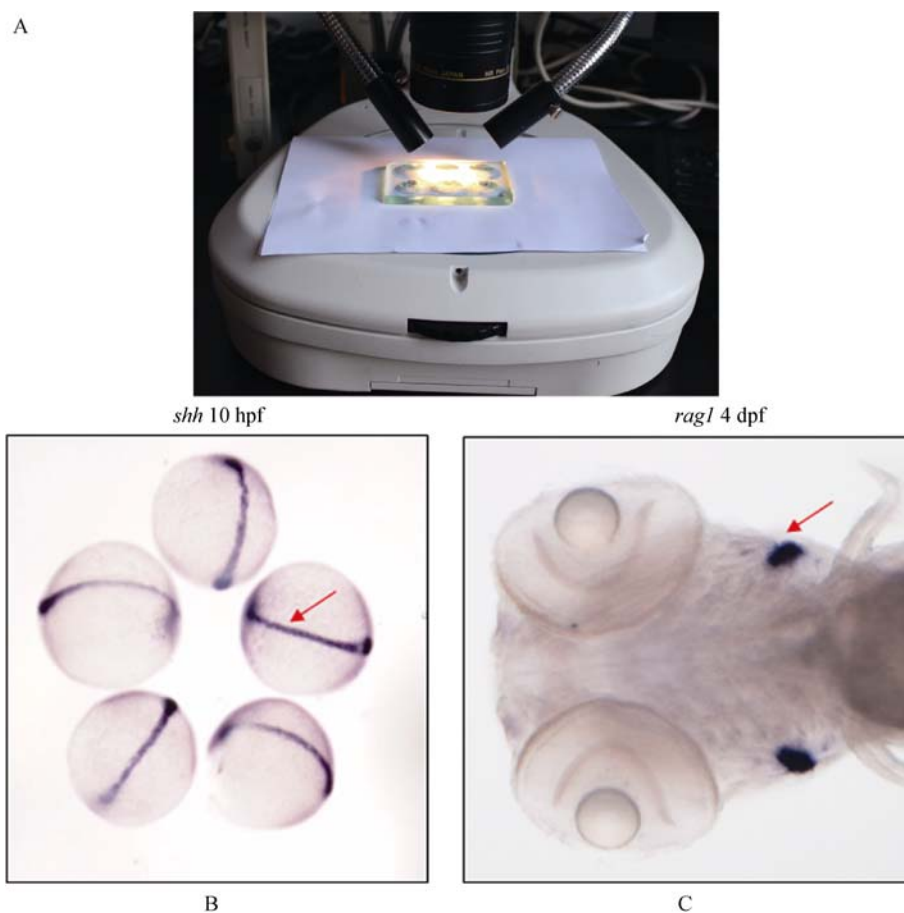


图 3 斑马鱼整胚原位杂交结果拍照及范例

A: 原位杂交结果图像采集, 将在 90% glycerol 储存的染色胚胎置于玻璃反应板中, 在外置光源下进行拍摄; B 和 C 分别为 10 hpf *shh* 和 4 dpf *ragl* 表达结果。

表 2 整胚原位杂交技术常见问题及解决方案

常见问题	原因	解决方案
胚胎破碎	蛋白酶 K 处理太过	严格控制好蛋白酶 K 处理的浓度和时间
	胚胎固定问题	最好用新鲜配制的 4%PFA 溶液进行固定, 控制好固定时间
	吸取胚胎用力过猛	胚胎操作, 动作一定要轻柔
染色背景过高	杂交温度太低	RNA-RNA 杂交温度最好为 65 , 严格控制杂交温度
	清洗不彻底	保证清洗所需的时间及温度
	蛋白酶 K 处理不足	严格控制好蛋白酶 K 处理的浓度和时间
染色呈蓝绿色	探针浓度过高	将探针稀释至合适浓度
无染色	探针合成问题或探针降解	探针合成后一定要跑电泳检测探针合成的质量
	基因表达时间与胚胎时期不一致	用 RT-PCR 检测基因表达时间
染色只在表面	PFA 固定时间太长或固定温度过高	最好用新鲜配制的 4%PFA 溶液进行固定, 控制好固定时间和温度
	胚胎发生黏连	控制好蛋白酶 K 处理时间, 遇到黏连情况应及时将胚胎轻轻吹散开

间也比较充分, 降低染色背景; 另外, 如果样品量大, 可以选择本文提供的原位杂交仪清洗步骤。对于低表达基因, 建议适当提高探针浓度(可稍高于 100 ng), 延长染色时间。

本文所述的整胚原位杂交技术流程主要是以地高辛标记的 RNA 探针-抗地高辛抗体-BM Purple 为例介绍的, 除此之外, 荧光素等可代替地高辛、NBT/BCIP 等可代替 BM Purple 来进行实验, 可参考本文提供的步骤并按照相应试剂说明书进行改进。

参考文献(References):

[1] Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, 63(2): 378-383. [DOI](#)

[2] Ekker M, Akimenko MA, Bremiller R, Westerfield M. Regional expression of three homeobox transcripts in the inner ear of zebrafish embryos. *Neuron*, 1992, 9(1): 27-35. [DOI](#)

[3] Cox KH, DeLeon DV, Angerer LM, Angerer RC. Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol*, 1984, 101(2): 485-502. [DOI](#)

[4] Schulte-Merker S, Ho RK, Herrmann BG, Nüsslein-Volhard C. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development*, 1992, 116(4): 1021-1032. [DOI](#)

[5] Thisse C, ThisseB. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*, 2008, 3(1): 59-69. [DOI](#)

[6] Wang L, Zhang PP, Wei YL, Gao Y, Patient R, Liu F. A blood flow-dependent *klf2a*-NO signaling cascade is required for stabilization of hematopoietic stem cell programming in zebrafish embryos. *Blood*, 2011, 118(15): 4102-4110. [DOI](#)

[7] WesterfieldM. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio ' (Brachydanio) rerio*. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000. [DOI](#)