



生命科学实验指南系列

Environmental Genomics

# 环境基因组学 实验指南

〔德〕C.C.马丁 主编  
杨军 主译



科学出版社  
[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

生命科学实验指南系列

# 环境基因组学实验指南

Environmental Genomics

〔德〕 C. C. 马丁 主编

杨 军 主译

科学出版社

北 京

图字：01-2008-3814 号

## 内 容 简 介

随着后基因组时代的到来,生命科学已从针对单个基因、单一细胞或个体的研究向整合的系统生物学方向发展。推动这一发展的核心力量就是新的高通量分析技术,如基因组学、蛋白质组学、代谢组学等技术的出现。许多传统的学科在与这些新兴技术结合后,得到了飞速的发展。正是在这样一种新“革命”形势下,本书应运而生。本书以方法学为主,集中介绍了在机体对环境应答中基因表达谱、全基因组和染色体突变,以及基因组多样性和多态性三方面检测的新技术、新进展。

本书对于从事环境科学、毒理学、生态学等相关学科的科研人员而言是一本极好的实验指南参考书。

Translation from the English language edition:  
*Environmental Genomics* edited by C. C. Martin  
Copyright© 2008 Springer Science+Business Media  
All Rights Reserved

### 图书在版编目(CIP)数据

环境基因组学实验指南/(德)马丁(Martin, C. C.)主编,杨军主译. —北京:科学出版社,2009

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-023317-2

I. 环… II. ①马…②杨… III. 基因组-实验-指南 IV. Q343.1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 170552 号

责任编辑:夏 梁/责任校对:包志虹

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2009 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张:18 1/4 插页:1

印数:1—2 500 字数:413 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

## 致 谢

在本书翻译过程中，浙江大学公共卫生学院毒理系的师生提供了极大的帮助，在此表示感谢。杨军受国家“863”项目（2004AA649120）、国家自然科学基金（30771826，30872140）、浙江省卫生高层次创新人才培养工程资助。

# METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY

丛书主编: J. M. Walker

410. **Environmental Genomics**, edited by C. Cristofre Martin, 2007
409. **Immunoinformatics: Predicting Immunogenicity In Silico**, edited by Darren R. Flower, 2007
408. **Gene Function Analysis**, edited by Michael Ochs, 2007
407. **Stem Cell Assays**, edited by Mohan C. Vemuri, 2007
406. **Plant Bioinformatics: Methods and Protocols**, edited by David Edwards, 2007
405. **Telomerase Inhibition: Strategies and Protocols**, edited by Lucy Andrews and Trygve O. Tollefsbol, 2007
404. **Topics in Biostatistics**, edited by Walter T. Ambrosius, 2007
403. **Patch-Clamp Methods and Protocols**, edited by Peter Molnar and James J. Hickman, 2007
402. **PCR Primer Design**, edited by Anton Yuryev, 2007
401. **Neuroinformatics**, edited by Chiquito J. Crasto, 2007
400. **Methods in Lipid Membranes**, edited by Alex Dopico, 2007
399. **Neuroprotection Methods and Protocols**, edited by Tiziana Borsello, 2007
398. **Lipid Rafts**, edited by Thomas J. McIntosh, 2007
397. **Hedgehog Signaling Protocols**, edited by Jamila I. Horabin, 2007
396. **Comparative Genomics, Volume 2**, edited by Nicholas H. Bergman, 2007
395. **Comparative Genomics, Volume 1**, edited by Nicholas H. Bergman, 2007
394. **Salmonella: Methods and Protocols**, edited by Heide Schatten and Abe Eisenstark, 2007
393. **Plant Secondary Metabolites**, edited by Harinder P. S. Makkar, P. Siddhuraju, and Klaus Becker, 2007
392. **Molecular Motors: Methods and Protocols**, edited by Ann O. Sperry, 2007
391. **MRSA Protocols**, edited by Yinduo Ji, 2007
390. **Protein Targeting Protocols, Second Edition**, edited by Mark van der Giezen, 2007
389. **Pichia Protocols, Second Edition**, edited by James M. Cregg, 2007
388. **Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols, Second Edition**, edited by David W. Murhammer, 2007
387. **Serial Analysis of Gene Expression (SAGE): Digital Gene Expression Profiling**, edited by Kare Lehmann Nielsen, 2007
386. **Peptide Characterization and Application Protocols**, edited by Gregg B. Fields, 2007
385. **Microchip-Based Assay Systems: Methods and Applications**, edited by Pierre N. Floriano, 2007
384. **Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols**, edited by Philippe Schmitt-Kopplin, 2007
383. **Cancer Genomics and Proteomics: Methods and Protocols**, edited by Paul B. Fisher, 2007
382. **Microarrays, Second Edition: Volume 2, Applications and Data Analysis**, edited by Jang B. Rampil, 2007
381. **Microarrays, Second Edition: Volume 1, Synthesis Methods**, edited by Jang B. Rampil, 2007
380. **Immunological Tolerance: Methods and Protocols**, edited by Paul J. Fairchild, 2007
379. **Glycovirolgy Protocols**, edited by Richard J. Sugrue, 2007
378. **Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols**, edited by Maher Albitar, 2007
377. **Microarray Data Analysis: Methods and Applications**, edited by Michael J. Korenberg, 2007
376. **Linkage Disequilibrium and Association Mapping: Analysis and Application**, edited by Andrew R. Collins, 2007
375. **In Vitro Transcription and Translation Protocols: Second Edition**, edited by Guido Grandi, 2007
374. **Quantum Dots**, edited by Marcel Bruchez and Charles Z. Holtz, 2007
373. **Pyrosequencing® Protocols**, edited by Sharon Marsh, 2007
372. **Mitochondria: Practical Protocols**, edited by Dario Leister and Johannes Herrmann, 2007
371. **Biological Aging: Methods and Protocols**, edited by Trygve O. Tollefsbol, 2007
370. **Adhesion Protein Protocols, Second Edition**, edited by Amanda S. Coutts, 2007
369. **Electron Microscopy: Methods and Protocols, Second Edition**, edited by John Kuo, 2007
368. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition**, edited by John G. Day and Glyn Stacey, 2007
367. **Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics**, edited by Rune Matthiesen, 2007
366. **Cardiac Gene Expression: Methods and Protocols**, edited by Jun Zhang and Gregg Rokosh, 2007
365. **Protein Phosphatase Protocols**, edited by Greg Moorhead, 2007
364. **Macromolecular Crystallography Protocols: Volume 2, Structure Determination**, edited by Sylvie Doublié, 2007
363. **Macromolecular Crystallography Protocols: Volume 1, Preparation and Crystallization of Macromolecules**, edited by Sylvie Doublié, 2007
362. **Circadian Rhythms: Methods and Protocols**, edited by Ezio Rosato, 2007
361. **Target Discovery and Validation Reviews and Protocols: Emerging Molecular Targets and Treatment Options, Volume 2**, edited by Mouldy Sioud, 2007
360. **Target Discovery and Validation Reviews and Protocols: Emerging Strategies for Targets and Biomarker Discovery, Volume 1**, edited by Mouldy Sioud, 2007
359. **Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry**, edited by Salvatore Sechi, 2007
358. **Metabolomics: Methods and Protocols**, edited by Wolfram Weckwerth, 2007
357. **Cardiovascular Proteomics: Methods and Protocols**, edited by Fernando Vivanco, 2007

## 编者名单

- ANTOON D. L. AKKERMANS • *Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*
- WILMA AKKERMANS VAN VLIET • *Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*
- DIONYSIOS A. ANTONOPOULOS • *Michigan State University, Department of Microbiology & Molecular Genetics, East Lansing, MI*
- JUN-ICHI ASAKAWA • *Department of Genetics, Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan*
- JASON L. BLUM • *Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, Gainesville, FL*
- LINDSAY E. BURTON • *Center for Advanced Research in Environmental Genomics (CAREG), Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada*
- DEBBY CABREROS • *School of Public Health, University of California at Berkeley, Berkeley, CA*
- JIA CHEN • *Department of Community and Preventive Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY*
- SUZANNE CHIU • *National Wildlife Research Center, Canadian Wildlife Service, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada*
- MICHEL CHRÉTIEN • *Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Faculty of Medicine, Ottawa, Ontario, Canada*
- LOUISE E. COVERDALE • *Center for Advanced Research in Environmental Genomics (CAREG), Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada*
- SUSANA CRISTOBAL • *Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Stockholm, Sweden*
- DOUG CRUMP • *National Wildlife Research Center, Canadian Wildlife Service, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada*
- NANCY D. DENSLOW • *Center for Environmental and Human Toxicology, Department of Physiological Sciences, University of Florida, Gainesville, FL*
- JEREMY R. deWAARD • *Department of Integrative Biology, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

- FUMIN DONG • *Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Faculty of Medicine, Ottawa, Ontario, Canada*
- SEAN F. EDDY • *Women's Health Interdisciplinary Research Center, Department of Biochemistry Boston University School of Medicine, Boston, MA*
- MICHAEL FENECH • *CSIRO Human Nutrition, Adelaide BC, South Australia, Australia*
- ELIZABETH A. GALBRAITH • *Agtech Products, Inc., Waukesha, WI*
- MEHRDAD HAJIBABAEI • *Department of Integrative Biology, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*
- PAUL D.N. HEBERT • *Department of Integrative Biology, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*
- HANS G. H. J. HEILIG • *Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*
- NATALIA V. IVANOVA • *Department of Integrative Biology, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*
- SEAN W. KENNEDY • *National Wildlife Research Center, Canadian Wildlife Service, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada*
- LOREN D. KNOPPER • *Jacques Whitford, Ottawa, Ontario, Canada*
- KEVIN LARADE • *Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Hematology Division, Boston, MA*
- LIMING MA • *Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Faculty of Medicine, Ottawa, Ontario, Canada*
- FRANCESCO MARCHETTI • *Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA*
- C. CRISTOFRE MARTIN • *Center for Advanced Research in Environmental Genomics (CAREG), Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada; and Department of Biochemistry, St. George's University Medical School, St. George's, Grenada, West Indies*
- MAJAMBU MBIKAY • *Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Faculty of Medicine, Ottawa, Ontario, Canada*
- JAMES P. MCNAMEE • *Health Canada, Consumer and Clinical Radiation Protection Bureau, Ottawa, Canada*
- FRANCESCA PACCHIEROTTI • *Section of Toxicology and Biomedical Sciences, ENEA CR Casaccia, Rome, Italy*
- VISHAL J. PATEL • *Bionomics Research and Technology Center, Environmental and Occupational Health Sciences Institute, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ*
- MELINDA S. PRUCHA • *Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, Gainesville, FL*

- ANTONELLA SGURA • *Department of Biology, Università Roma Tre, Rome, Italy*
- HAUKE SMIDT • *Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*
- KENNETH B. STOREY • *Institute of Biochemistry, Departments of Biology and Chemistry, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada*
- MASANORI TAMAOKI • *Biodiversity Conservation Research Project, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan*
- VANCE L. TRUDEAU • *Centre for Advanced Research in Environmental Genomics (CAREG), University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada*
- VESELA A. TZENEVA • *NIZO Food Research B. V., Ede, The Netherlands*
- MARK R. VIANI • *School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, UK*
- WILLEM M. de VOS • *Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*
- JAMES G. WETMER • *Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY*
- BRYAN A. WHITE • *University of Illinois at Urbana-Champaign, Departments of Animal Sciences & Pathobiology, Division of Nutritional Sciences, North American Consortium for Genomics of Fibrolytic Ruminant Bacteria, Urbana, IL*
- ANDREW J. WYROBEK • *Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA*

## 前 言

环境基因组学试图预测一个或多个有机体在基因水平如何应答它们外部环境的变化。由于这些基因组反应的复杂多样性,环境基因组学必须整合分子生物学、生理学、毒理学、系统生物学、流行病学以及人类遗传学等形成一个跨学科的研究领域。环境基因组学是一个通用的名词,所有探讨环境条件对基因转录、蛋白质水平、基因组稳定性或一个群体中基因组多样性的影响的研究都属于这一范畴。在这些基因组检测之后,进一步研究的命名则往往反映其特殊的目的性。

比如,生理基因组学 (physiogenomics) 研究在不同的生理或病理状态下基因表达的动态变化。毒理基因组学 (toxicogenomics) 研究天然或人造的毒物对基因组的影响,而代谢组学 (metabolomics) 则鉴定代谢产物的改变。生态基因组学 (ecological genomics) 分析在一个环境样本中作为基因组补充的“生物组”(biome)。群体中基因组的多态性也可通过对不利环境条件的易感性得到分析。考虑到现有领域对完整环境基因组学研究的重要性,本书分为三个主要部分:(1) 基因表达谱分析;(2) 全基因组和染色体突变检测和(3) 在一个特定环境中对基因组多样性和多态性进行分析的方法。

环境基因组学研究可在实验室中通过使用生物性状明确、已知全基因组序列的模式系统(包括人)进行模拟。但是,大多数环境基因组学研究针对全基因组信息有限或完全没有的野生非模式生物。研究非模式生物的局限性使得基因组学研究更具挑战性。因此,我们将注意力集中在不需要全基因组序列信息的基因组学技术上。当考虑可能的技术策略来回答环境基因组学问题时,很明显没有一套这些研究者使用的特定的技术。相反,至今大多数环境基因组学研究都依赖于不特异属于这一领域的相对标准的基因组和蛋白质组学技术。所以本书的内容可能含有一些与 *Methods in Molecular Biology* 丛中覆盖的其他类似的基因组学和蛋白质组学领域的内容重复。此外,我们也知道许多进入环境基因组学领域的研究者缺乏分子生物学和基因组学背景。许多进行这类研究的研究者具有不同的背景,如环境科学、毒理学和生态学。因此我们努力将重点放在不是过于严格、在比较标准的分子生物学实验室都可完成的研究方案上。本书的目标是为希望使用基因组学回答环境问题的环境科学家提供一本手册。相反的,经典的分子生物学家也开始进入这一领域。尽管这些研究者精通于研究技术,但他们常常不了解进行环境研究时需加以考虑的事项。而这些实验设计和分析的考虑在环境研究中又往往是非常重要的,对于工业活动、政府政策、风险分析评估模型和环境健康都有很重要的影响。因此,在可能的情况下我们都注意包含了对设计、实验对照和数据解释的重要性的讨论。在认真思考设计的前提下,环境基因组学可以提供有益于我们深入理解不利的或变化的环境条件的特异性分子靶点的信息。比较模式生物和野生非模式生物的基因组学数据可

使我们更好地理解如何将实验室结论推广应用到野外。一旦得到足够多的数据，环境基因组学可促进预测模型的产生，以用来在明显的不利影响出现之前发现环境威胁（如毒物暴露）。由此，希望这些研究的总和能够降低环境风险评估的不确定性，并提供一个决定环境效应、保证人类健康和自然物种可持续性的系统化框架。

C. C. 马丁

（杨军）

# 目 录

致谢  
前言

## I 基因表达谱分析

|     |                                                                   |     |
|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 第一章 | 高通量整体原位杂交检测环境干扰斑马鱼胚胎组织特异性基因表达改变·····                              | 3   |
| 第二章 | 荧光 RNA 随机引物触发的聚合酶链反应——一种新的用于检测野生物种中<br>由污染物引起的基因表达改变的差异显示方法 ..... | 12  |
| 第三章 | cDNA 宏阵列方法分离拟南芥的臭氧应答基因 .....                                      | 22  |
| 第四章 | 通过 cDNA 宏阵列和基因表达谱检测环境毒物的毒理效应 .....                                | 33  |
| 第五章 | cDNA 文库的构建和筛选——在外界环境压力条件下,新表达基因的鉴定<br>方法 .....                    | 42  |
| 第六章 | 比较分子生理基因组学——cDNA 阵列的异种杂交 .....                                    | 62  |
| 第七章 | 以 AtT20 脑垂体细胞作为模型进行神经内分泌肽能系统干扰中的蛋白质组<br>学分析 .....                 | 86  |
| 第八章 | 应用蛋白质组学方法对海洋环境中过氧化物酶体增殖污染物进行风险评估<br>.....                         | 97  |
| 第九章 | 应用 <sup>1</sup> H-NMR 波谱的环境代谢组学研究.....                            | 107 |

## II 检测全基因组突变

|      |                                             |     |
|------|---------------------------------------------|-----|
| 第十章  | 限制性酶切标记基因组扫描检测基因突变.....                     | 121 |
| 第十一章 | 彗星实验在环境毒理学中的应用.....                         | 135 |
| 第十二章 | 微核实验在染色体水平检测 DNA 损伤 .....                   | 145 |
| 第十三章 | 荧光素原位杂交探测环境毒物导致的染色体畸变和非整倍体.....             | 167 |
| 第十四章 | 使用荧光原位杂交技术对人类和小鼠精子中染色体结构畸变探测的实验<br>室方法..... | 184 |

## III 物种多样性的鉴定

|      |                                     |     |
|------|-------------------------------------|-----|
| 第十五章 | DNA 条形码的收集——分析方案 .....              | 211 |
| 第十六章 | 应用抑制性消减杂交检测环境样品中元基因组多样性.....        | 226 |
| 第十七章 | 16S RNA 靶向变性梯度凝胶电泳指纹图谱分析微生物菌群 ..... | 258 |
| 第十八章 | 基于乳剂多聚酶链反应的分子单倍型分析方法.....           | 270 |

|         |     |
|---------|-----|
| 索引..... | 278 |
| 图版      |     |

# I 基因表达谱分析



# 第一章 高通量整体原位杂交检测环境干扰斑马鱼胚胎组织特异性基因表达改变

Louise E. Coverdale, Lindsay E. Burton, C. Cristofre Martin

## 概论

整体原位杂交是一个可以观察完整生物体内细胞基因表达 (mRNA) 的过程。通过比较不同环境下生物体的基因表达区域的差别, 有助于我们理解环境暴露对细胞和组织的特异性影响。这个技术是对现有的基因表达谱技术的补充, 例如 DNA 芯片技术只能反映一个生物或组织的基因表达水平的变化。整体原位杂交可以在整个生物体内检测表达某个特殊基因的细胞分布情况。而当从整个生物体提取 RNA 样本并检测时, 在整个基因表达的水平上就不能反映表达某个基因的细胞分布的微小变化。自动化技术的开发使得整体原位杂交方法与高通量的基因组研究技术一样被人们广泛接受。结合自动化的计算机辅助图像分析技术, 这一方法可以对如亚致死剂量环境毒素暴露后导致的组织和基因的微小变化进行有效的定量。

**关键词:** 检测; 自动化; 基因表达; 高通量; 原位杂交; 斑马鱼

## 1. 引言

城市化和人类活动如农业、林业和矿业导致大量的前所未见的化学物质进入饮用水源、地下水和天然水体 (1-3)。这使得政府、工业部门和化工产业承受着与日俱增的压力而对这些化学物质潜在的环境效应进行评价。传统的毒理学分析可提供急性毒性 (如死亡) 相关的参数; 但其得到的  $LC_{50}$  并不能鉴别低剂量长期暴露下导致的有害效应 (4)。将胚胎暴露于一些化学物质下, 即使是很低的浓度, 也会导致其发育异常, 直接影响后续生命的各阶段以及器官成熟和繁殖能力。此外, 越来越多的证据表明外部形态的异常并不是繁殖能力下降的必要特征。因此, 传统的分析方法不一定能鉴别由环境化学物质引起的所有潜在问题。

暴露于环境毒素的胚胎的小规模和大规模基因表达谱研究可使我们深入理解常规的细胞毒性机制, 并有利于我们建立对化合物家族毒性的预测模型。我们和其他研究小组应用小规模原位杂交分析方法进行的毒理学研究, 已成功地鉴定了多种化合物对脊椎动物胚胎发育的影响 (5-7)。

原位杂交使我们对细胞和组织的特异性基因表达的观察更加直观。这个过程利用与 mRNA 互补的反义基因探针标记细胞而产生彩色沉淀物。作为传统意义上的一种较为耗时费力的过程, 方法学的优化和近年来自动化技术的发展使得这一技术可以用来评价多类化合物对脊椎动物和非脊椎动物胚胎发育可能造成的影响。

这种对大样本中大量基因表达谱进行分析的能力可以使我们发现那些可能不会对胚

胎发育造成显著的病理性变化，而只能通过统计分析的方法鉴定的化合物。计算机辅助显微镜和图像分析软件可对如基因表达域形态学测定等数据进行自动化采集。通过数字图像分析策略例如像素阈值方法，测量可以在准确、定量、且无倾向性的情况下进行。而大量样本的分析又满足了数据统计显著性的要求，使得在定性方法中无法发现的微小变化得以鉴别。

本章描述的操作过程主要适用于斑马鱼胚胎的检测，但是通过适当的调整后也可用于其他物种检测。

## 2. 材料

所有溶液必须用无 RNase 的试剂和 DEPC 处理的蒸馏水配成。和胚胎接触的仪器、工具和试剂需采取 RNase 失活处理（见注释 1）。

### 2.1 仪器

1. 制作原位杂交篮的加热板（heat block）。
2. 原位杂交篮：去掉 1.5 mL 离心管尖头部分或者其他圆柱形物体，将一片精细尼龙网和离心管剩余部分利用加热板低温熔化粘连。去除尼龙网格多余部分。注意不要过热，否则会熔化尼龙网。
3. 六孔板（Becton Dickinson, cat. no. 1146）。
4. 用于在格孔间移动原位杂交篮的平头镊子。
5. 用于移动胚胎的玻璃移液管。

### 2.2 地高辛（Digoxigenin, DIG）探针的制备

1.  $1\ \mu\text{g}$  包含目的基因的纯化的线性质粒（见注释 2）。
2.  $10\times\text{DIG}$  标记混合物：10 mmol/L ATP，10 mmol/L CTP，10 mmol/L GTP，6.5 mmol/L UTP，3.3 mmol/L DIG-11UTP（Roche）。
3. 转录缓冲液和牛血清白蛋白（BSA）/二硫苏糖醇（DTT；同酶一起）。
4. 苯酚-氯仿-异戊醇（PCI）：苯酚-氯仿-异戊醇按 25 : 24 : 1 比例混合， $4^{\circ}\text{C}$  黑暗储存。
5. 氯仿-异戊醇（CIA）：氯仿-异戊醇按 24 : 1 比例混合， $-20^{\circ}\text{C}$  储存。

### 2.3 胚胎准备

1. 4%PFA-PBS 溶液：80 mL 含 4%多聚甲醛的  $1\times\text{PBS}$ 。缓慢加入 NaOH 至多聚甲醛完全溶解。用 HCl 调节 pH 至 7.2。加蒸馏水（ $\text{dH}_2\text{O}$ ）至 100 mL。短期储存于  $4^{\circ}\text{C}$ （1~2 周），长期储存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。
2.  $5\times\text{PBS}$ ：40 g NaCl，1 g KCl，14.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，加入 DEPC 处理过的水至 800 mL，用 HCl 调节 pH 至 7.4。加入 DEPC 处理过的水至终体积 1 L。用时稀释至  $1\times\text{PBS}$ 。

## 2.4 整体原位杂交

1. PBS Tween (PBST): 0.1% Tween-20, 1×PBS。
2. 蛋白酶 K (50  $\mu\text{g/mL}$ ): 用水溶解 50 mg 蛋白酶 K 粉末, 分装并储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。
3. 甘氨酸溶液: 用 1×PBS 配制 2.7 mmol/L 甘氨酸。
4. 5×预吸收的 anti-DIG 抗体溶液: anti-DIG 抗体 (Roche) 1 : 1000 比例稀释, 2%小牛血清, 2 mg/mL BSA 和在 1×PBST 中固定的 20~50 个胚胎, 溶液室温放置 1 h 或者  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。储存于  $4^{\circ}\text{C}$ , 使用时用 PBST 稀释至 1× (见注释 3)。
5. 20×SSC: 3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸钠, pH7。高压灭菌。
6. 杂交液: 50%甲醛, 5×SSC, 0.1% Tween-20, 50  $\mu\text{g/mL}$  肝素, 100  $\mu\text{g/mL}$  酵母 tRNA, 9 mmol/L 柠檬酸, 储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。
7. 杂交后混合液 (post-hyb mix): 50%甲醛, 5×SSC, 0.1% Tween-20, 50  $\mu\text{g/mL}$  肝素, 9 mmol/L 柠檬酸, 储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。
8. 100 ng 探针 (1~2  $\mu\text{L}$  悬浮探针) (见 3.1)。
9. 封闭液: 2%小牛血清, 2 mg/mL 的 BSA, 用 PBST 加至终体积。
10. 染色缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5, 50 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, 0.4 mmol/L 左旋咪唑 (levamisole) (见注释 4)。
11. NBT 储存液: 70 mg/mL 氮蓝四唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 溶解于二甲基甲酰胺 (dimethylformamide),  $4^{\circ}\text{C}$  避光保存。
12. BCIP 储存液: 50 mg/mL 对甲苯胺蓝 (5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, BCIP) 溶于 70%二甲基甲酰胺中,  $4^{\circ}\text{C}$  避光保存 (见注释 5)。
13. 胚胎保存液: 含 0.025% 叠氮钠的 1×PBS。

## 3. 方法

### 3.1 制备 DIG 标记的 RNA 探针

1. 按照说明书选择适当的内切酶消化 10  $\mu\text{g}$  质粒 DNA (包含目标序列) 制备 DNA 模板。内切酶应在基因序列的 3'端酶切以合成反义探针, 在 5'端酶切合成正义对照探针 (见注释 6)。
2. 模板可以通过商业化的纯化柱系统或者用等体积的 PCI 和 CIA 混合抽提。
3. 抽提的模板进一步用 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积的 100%冰乙醇沉淀。
4. 轻柔振荡溶液后最大转速离心 30 min。
5. DNA 沉淀用 75%冷乙醇洗涤, 空气干燥, 再用 10  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解。
6. 用分光光度计或者琼脂糖凝胶电泳配合标准物来定量模板的浓度。
7. 探针的合成需要通过以下反应, 总体积不能超过 20  $\mu\text{L}$ 。探针合成反应包含 1  $\mu\text{g}$  的线性 DNA 模板, 1×DIG 标记混合液, 1×转录缓冲液 (同转录酶一起), DTT 或 BSA (同转录酶一起), 40 U RNasin (Promega), 20~50 U 的 RNA 聚合酶。根据所使用的 RNA 聚合酶选择合适的温度和时间进行孵育 (一般 1 h)。

8. 再加入 20~50 U RNA, 聚合酶孵育 1 h。
9. 加入 40 U 的 DNase I, 37℃ 孵育 10 min (见注释 7)。
10. 加入终浓度为 0.02 mol/L 的 EDTA, 0.5 mol/L LiCl, 70% 乙醇, -80℃ 1~2 h 或过夜, 沉淀探针。
11. 4℃ 最大转速离心 30 min 分离探针。
12. 99% 乙醇洗涤探针沉淀, 空气干燥, 再溶于 50  $\mu$ L 或更少的 DEPC 水中, -80℃ 储存。吸取 2  $\mu$ L 在 EB 染色的琼脂糖凝胶上电泳检测探针质量。

### 3.2 斑马鱼胚胎制备

除非特别说明, 所有的胚胎操作都在放置于六孔板的单孔中的自制小篮里进行 (图 1)。一个六孔板的单孔可以放置六个小篮, 用平头镊子将小篮在含有不同孵育液的孔间转移。

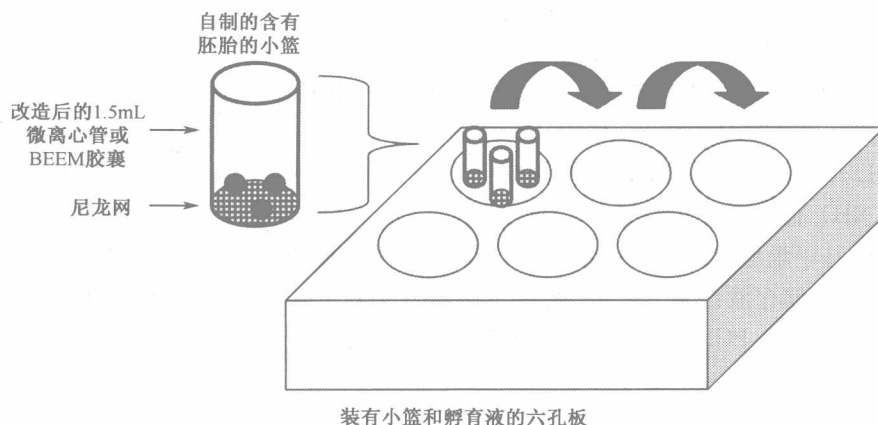


图 1 简图所示为利用去除一端的 BEEM 胶囊或者 1.5 mL 离心管和尼龙网粘合制成的小篮。尼龙网可以用粘胶或者加热粘到离心管上。胚胎置于篮中, 孵育在六孔板中进行, 小篮用镊子在各孔间转移。

1. 4% PFA 固定去除外膜的胚胎, 4℃ 过夜。
2. 脱水前用 1×PBS 洗涤胚胎, -20℃ 储存于甲醇中。
3. 储存于甲醇中的胚胎在做原位杂交之前至少放过夜。胚胎在 -20℃ 储存于甲醇中可放数年。

### 3.3 整体原位杂交

1. 选取胚胎, 相继在以下溶液中孵育重新水化: 75% MeOH-25% PBS, 50% MeOH-50% PBS, 25% MeOH-75% PBS 各 5 min; PBST 孵育 4 次, 每次 5 min。重新水化的胚胎可以用于原位杂交和制备预吸收的抗体溶液。制备预吸收的抗体的方法参照 2.4.4。
2. 24 h 或更老的实验胚胎在含蛋白酶 K (0.1  $\mu$ g/mL) 的 PBST 中处理预先决定的时间 (见注释 9)。