

·特邀专家方法·

## 植物寡核苷酸荧光原位杂交技术方法

张凡凡<sup>1</sup>, 邢新滢<sup>1</sup>, 石文清<sup>2</sup>, 沈懿<sup>2</sup>, 程祝宽<sup>2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875; <sup>2</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物基因组学国家重点实验室及植物基因研究中心, 北京 100101; <sup>3</sup>扬州大学农学院, 江苏省作物基因组学与分子育种重点实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏省粮食作物现代生产技术协同创新中心, 扬州 225009

**摘要** 寡核苷酸荧光原位杂交技术是一种整合了生物信息学分析、DNA高通量合成以及荧光原位杂交实验的新兴技术。该技术适用于任何具有参考基因组的植物物种, 并可根据研究需求设计靶向某个染色体区域、整条染色体或一组染色体的寡核苷酸探针, 目前已成功应用于数种植物的核型分析、染色体变异、种群演化、同源染色体配对、单倍型分析和异源多倍体识别等研究。该文详述了植物寡核苷酸探针的设计、扩增和标记、染色体制备以及荧光原位杂交的具体操作流程, 以期促进寡核苷酸荧光原位杂交技术在细胞遗传学研究中的应用。

**关键词** 荧光原位杂交, 寡核苷酸探针, 染色体, 植物

张凡凡, 邢新滢, 石文清, 沈懿, 程祝宽 (2023). 植物寡核苷酸荧光原位杂交技术方法. 植物学报 58, 274–284.

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术开发于20世纪80年代, 是植物细胞遗传学和基因组学研究的重要工具, 能够实现对特定基因组区域或整条染色体相关DNA的可视化观察。用于设计FISH探针的DNA序列往往是染色体上的重复序列元件或者细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)等基因组DNA克隆(Jiang and Gill, 2006)。过去30多年, 这些探针作为染色体识别的重要工具已经在植物研究中获得了广泛应用, 帮助解决单个染色体甚至整个基因组的结构、组成、突变、传递和演化等关键问题(Cheng et al., 2002; Jiang, 2019; 程新杰等, 2019)。然而, 这些常规探针也存在缺点, 在一定程度上限制了FISH技术的发展。首先, 开发出一套能够识别某个物种所有染色体的探针需要耗费研究人员巨大的精力; 并且, 基于重复序列的探针只能标记染色体的特定区域, 因此并不能用于识别和区分不同基因型的相同染色体或近缘物种的部分同源染色体; 此外, 小麦(*Triticum aestivum*)等基因组较大的物种通常包含很大比例的DNA重复序列,

这意味着这些物种的BAC克隆并不能被开发为染色体特异的FISH探针(Han et al., 2015)。

染色体涂染是FISH技术中的一种, 其通过染色体特异的探针来识别染色体特定区域或整条染色体。然而, 由于缺乏染色体特异的DNA探针, 对于大多数植物物种来说, 追踪单条染色体难以实现。基于BAC克隆的染色体涂染技术要求植物的基因组小且重复序列少, 目前只在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)中成功应用(Lysak et al., 2001; Idziak et al., 2011)。染色体涂染的另一种策略是通过PCR扩增的方法构建单拷贝序列库(Lou et al., 2014), 但对于基因组庞大而复杂的物种而言, 扩增覆盖整条染色体的大量PCR产物也非常困难和耗时。

寡核苷酸荧光原位杂交(oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization, Oligo-FISH)技术快速发展成为植物分子细胞遗传学研究的新一代染色体涂染技术。早期的寡核苷酸探针受到DNA合成成本高、通量低的限制, 无法广泛应用。近年来, 得益于DNA

收稿日期: 2022-11-20; 接受日期: 2023-01-10

基金项目: 北京市自然科学基金(No.6214043)、国家自然科学基金(No.32001522, No.32000368)和中央高校基本科研业务费专项资金(No.2021NTST20)

\* 通讯作者。E-mail: zkcheng@genetics.ac.cn

高通量合成技术的快速发展, Oligo-FISH技术首先被开发并应用于小鼠 (*Mus musculus*) 和果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的染色体结构变异研究中 (Boyle et al., 2011; Yamada et al., 2011; Beliveau et al., 2012)。在植物中, 2015年Oligo-FISH被成功应用于黄瓜 (*Cucumis sativus*) 及其同属植物的染色体结构与演化研究 (Han et al., 2015), 开启了Oligo-FISH在植物染色体研究中的热潮。Oligo-FISH适用于所有具有参考基因组的植物物种, 目前已成功应用于黄瓜、草莓 (*Fragaria vesca*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、杨树 (*Populus tomentosa*)、甘蔗 (*Saccharum spontaneum*) 和玉米 (*Zea mays*) 等物种 (Han et al., 2015; Qu et al., 2017; Braz et al., 2018; He et al., 2018; Hou et al., 2018; Meng et al., 2018; Xin et al., 2018; Albert et al., 2019)。

与常规FISH探针相比, 寡核苷酸探针具有诸多优势。首先, 可根据需求设计并合成覆盖所有染色体组、整条染色体或染色体区段的探针, 因此Oligo-FISH可实现对不同染色体及染色体片段的精准识别。其次, 根据不同亚种或不同种之间的保守序列设计的寡核苷酸探针, 可用于识别来自不同物种或亚种的部分同源染色体 (Han et al., 2015; He et al., 2018; Hou et al., 2018; Liu et al., 2020)。同时, 通常300 ng的寡核苷酸库可以被扩增和标记为足够 $1 \times 10^6$ 个FISH实验使用的探针, 因此每个合成的寡核苷酸库基本上可以用作标记FISH探针的永久资源 (Han et al., 2015)。此外, 通过生物信息学分析和人工设计, 可去除非特异重复序列, 避免产生FISH杂交背景, 极大地降低了实验的技术难度 (Liu and Zhang, 2021)。

由于具有常规探针无法比拟的优势, Oligo-FISH技术极大地拓展了FISH在植物研究中的应用。通过设计覆盖整条染色体的寡核苷酸探针, 可以精确识别并追踪整条染色体, 从而开展减数分裂期同源染色体的配对分析 (Zhang et al., 2017, 2020; He et al., 2018)。针对染色体某个或者几个较小的区段设计探针并开发的Oligo-FISH barcode技术可实现对每条染色体的识别和区分, 从而开展精确的核型分析和比较研究 (Braz et al., 2018)。通过检测Oligo-FISH杂交信号的强弱和有无, 可以鉴定某个物种与其它物种的亲缘关系, 开展遗传适应和种群演化研究; 同时也可识别易位等染色体变异并确定染色体断点的精确位置 (Han

et al., 2015; Hou et al., 2018; Albert et al., 2019; Braz et al., 2020; Liu et al., 2020; Do Vale Martins et al., 2021; Shi et al., 2022)。根据不同单倍型染色体的序列差异, 可设计单倍型特异的寡核苷酸探针, 进而在减数分裂中期染色体上直接观察到杂交后代减数分裂发生交换的位置和数目, 从而实现对种间杂种乃至种内杂种单倍型的识别与分析 (Do Vale Martins et al., 2019)。此外, Oligo-FISH技术还可应用于检测基因组拼接质量、分析异源多倍体的染色体和识别亚基因组等 (Xin et al., 2018; Shi et al., 2022; Yu et al., 2022)。

本文将详述寡核苷酸探针的设计、扩增和标记步骤, 并以模式植物水稻为例介绍染色体的制备和FISH实验方法。

## 1 材料和试剂

### 1.1 寡核苷酸库

寡核苷酸库 (MYtags immortal oligonucleotide library, 每库约300 ng) 由Arbor Biosciences™ 公司 (前身为MYcroarray®, 美国) 合成。每个合成的寡核苷酸序列都包含45 nt的染色体序列、5'正向引物序列 (T7 RNA聚合酶启动子序列) 和3'反向引物序列。用nuclease-free水或 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH7.5) 重悬寡核苷酸库, 将其溶解为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的原液, 存储于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱。吸取 $2 \mu\text{L}$ 寡核苷酸库的原液于 $26 \mu\text{L}$  nuclease-free水中, 制备成工作液, 存储于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱。Arbor Biosciences™ 公司也会提供用于MYcroarray脱泡PCR的引物 (MYtags PCR primer mix, 包括5'正向引物和3'反向引物), 需将其保存于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱。

### 1.2 MYcroarray脱泡PCR

所用材料和试剂包括高保真DNA聚合酶预混液 (KAPA HiFi HotStart Ready Mix, Cat No.KK2801)、PCR产物纯化试剂盒 (Qiagen Qiaquick PCR purification Kit, Cat No.28106) 和醋酸钠溶液 ( $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH5.2)。

### 1.3 体外转录

所用材料和试剂包括转录试剂盒 (Invitrogen MEGAshortscript™ T7 Kit, Cat No.AM1354)、RNA纯化试剂盒 (Qiagen RNeasy Mini Kit, Cat No.74903) 和无水

乙醇。

#### 1.4 反转录

订购带荧光标记的反转录引物, 序列如下: 5'-地高辛或生物素-CGTGGTCGCGTCTCA-3' (由生工公司合成, 序列与MYcroarray脱泡PCR的3'反向引物一致), 溶解浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其余试剂盒材料包括  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP、RNA酶抑制剂(Invitrogen SUPERase In™ RNase Inhibitor,  $20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , Cat No.-AM2694)、反转录酶(Invitrogen SuperScript™ IV Reverse Transcriptase,  $200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , Cat No.1809-0050)、核酸外切酶(Exonuclease I enzyme,  $20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , New England Biolabs, Cat No.M0293S)、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA (pH8.0)、RNA纯化试剂盒(Quick-RNA Mini-Prep Kit, Zymo Research, Cat No.R1055)以及无水乙醇。

#### 1.5 去除RNA

试剂和材料包括RNase H ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , New England Biolabs, Cat No.M0297L)、RNase A ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, Cat No.EN0531)、RNA纯化试剂盒(Quick-RNA MiniPrep Kit, Zymo Research, Cat No.R1055)和无水乙醇。

#### 1.6 染色体制备

- (1) 卡诺固定液: 将无水乙醇与冰醋酸按照3:1的体积比进行配制。
- (2) 45%醋酸溶液: 取45 mL冰醋酸, 与55 mL去离子水混合, 混匀后室温放置。
- (3) 1%醋酸洋红染液: 将1.0 g洋红粉末溶于100 mL 45%醋酸中, 小火煮沸8小时, 然后放在冰上快速冷却, 室温保存。
- (4)  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  8-羟基喹啉溶液: 取0.29 g 8-羟基喹啉粉末溶于少量无水乙醇中, 待完全溶解后用去离子水定容至1 L。
- (5) 酶混合液: 将2 g纤维素酶(Yakult Pharmaceutical)和1 g果胶酶(Plant Media)溶于100 mL  $1 \times$  PBS溶液中, 分装后于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

#### 1.7 FISH实验

- (1) PBS溶液。  $10 \times$  PBS: 将80.0 g NaCl、2.0 g KCl、

14.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶于900 mL去离子水中, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl将pH值调至7.4, 再用去离子水定容至1 L, 室温保存;  $1 \times$  PBS溶液: 取100 mL  $10 \times$  PBS溶液, 用去离子水定容至1 L,  $4^\circ\text{C}$ 保存。

(2) 4%多聚甲醛固定液: 称量4.0 g多聚甲醛粉末溶于95 mL  $1 \times$  PBS溶液中, 在烧杯中搅拌混匀, 盖上烧杯, 加热溶解(温度不超过 $65^\circ\text{C}$ ), 滴加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH, 直至溶液澄清, 置于冰上降温。用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl将pH值调至7.4。用  $1 \times$  PBS溶液将体积定容至100 mL, 于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

(3) SSC溶液。  $20 \times$  SSC: 将175.3 g NaCl和88.2 g 柠檬酸钠溶于900 mL去离子水中, 用少量浓盐酸调pH值至7.0, 然后定容至1 L, 室温保存;  $2 \times$  SSC: 取100 mL  $20 \times$  SSC溶液, 用去离子水定容至1 L。

(4) 70%甲酰胺溶液: 将7 mL 100%去离子化甲酰胺、1 mL  $20 \times$  SSC和2 mL去离子水混合, 用锡箔纸包裹, 于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

(5) 50%硫酸葡聚糖: 将2.5 g硫酸葡聚糖溶于5 mL去离子水中, 分装于1.5 mL EP管中, 取1管置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱备用, 其余放于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

(6) 0.1% PBST溶液: 取100  $\mu\text{L}$  Tween-20溶于100 mL  $1 \times$  PBS溶液中, 混匀, 于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

(7) 100%去离子化甲酰胺。

(8) 70%乙醇和无水乙醇。

(9) 抗体: 使用偶联荧光素的抗地高辛(Anti-dig-rhodamine, Roche, Cat No.11207750910)或生物素(Anti-biotin-FITC, SouthernBiotech, Cat No.6404-02)抗体。

(10) DAPI染液: 将10 mg DAPI溶解于10 mL去离子水中, 制备成储存原液( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分装后存储于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱。DAPI工作液的配制方法如下: 吸取10  $\mu\text{L}$  DAPI储存原液于1 mL抗淬灭剂(ProLong, Invitrogen, Cat No.P36984)中, 终浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

## 2 仪器和生物信息学工具

### 2.1 实验仪器

实验仪器包括PCR仪、台式离心机、相差显微镜、荧光显微镜、恒温烘箱、水平震荡仪、酒精灯和移液器等。

2.2 生物信息学工具及数据要求

- (1) 操作系统: Chorus2软件可以在Unix (MacOS/Linux)和Windows平台上运行, 建议在Linux上操作。
- (2) 程序包: Cython、numpy、pyfasta、primer3-py、pandas和pybigwig (Chorus2的GUI版本需要matplotlib和PyQt5两个额外的程序包)。
- (3) 其它生物信息学工具: BWA用于全基因组比对; Jellyfish用于k-mer计算。
- (4) 需下载的数据: 水稻参考基因组和全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS)数据。推荐使用> 5X深度的WGS数据用于过滤重复序列。

3 实验设计思路

Oligo-FISH主要包括3个步骤: (1) 寡核苷酸序列的设计和合成; (2) 探针的扩增和标记; (3) FISH实验。寡核苷酸序列可以使用Chorus2软件进行设计 (<https://github.com/zhangtaolab/Chorus2>) (Zhang et al., 2021)。设计思路如下: 基因组序列已知的某物种某条染色体的某个区域(或整条染色体)上的序列, 通过计算被分成45 nt的寡核苷酸片段, 其中dTm大于

10℃并且只有1个拷贝(即不存在重复序列)的特异序列将用于探针设计。这些寡核苷酸序列均匀覆盖目标染色体区域, 从而产生均一的染色体涂染信号。在体细胞有丝分裂中期高度浓缩的染色体上, 寡核苷酸的分布密度为每kb 0.1–0.5个就足以产生较好的染色体信号(Jiang, 2019)。由于减数分裂粗线期的染色体延伸较长, 因此需要更高密度的寡核苷酸。例如, 水稻9号染色体探针的寡核苷酸的分布密度为每kb 2个(Hou et al., 2018)。将这些选定的寡核苷酸序列合成为库, 经过两步扩增过程(脱泡PCR和体外转录)、一步探针标记过程(反转录)和探针纯化(RNA去除), 获得用于Oligo-FISH的ssDNA探针; 随后经过染色体制备和变性、探针杂交和抗体反应等FISH实验流程, 最终获得目标染色体区域的荧光涂染信号。具体实验流程见图1。

4 实验方法

4.1 寡核苷酸探针设计

4.1.1 Chorus2软件安装

Chorus2使用python3语言编写, 利用Anaconda3可

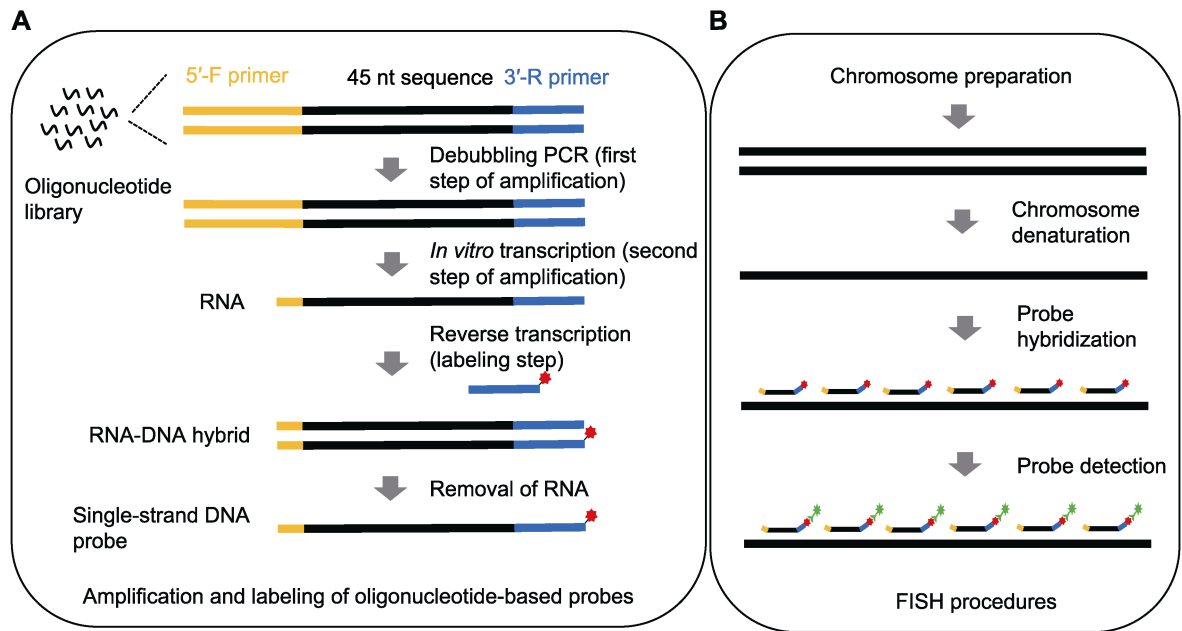


图1 寡核苷酸荧光原位杂交实验流程图

(A) 寡核苷酸探针的扩增和标记; (B) 荧光原位杂交(FISH)实验

Figure 1 Outlines of oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization

(A) Amplification and labeling of oligonucleotide-based probes; (B) Procedures of fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

直接安装Chorus2。最新的64位Linux版本Anaconda3可从网站 (<https://www.anaconda.com/products/individual>) 下载。Chorus2软件的安装过程参考Chorus2网站 (<https://chorus2.readthedocs.io/en/latest/>) 上的操作流程和安装视频。

#### 4.1.2 使用Chorus2软件设计寡核苷酸探针

(1) 寡核苷酸序列初筛。以参考基因组和目标序列作为输入文件, 其中目标序列可以是染色体的某个区域或整条染色体或整个基因组。通过Chorus2软件参数设定分析结果的存储位置、用于脱泡PCR的反向引物序列、探针长度、探针与目标序列的最小同源性和dTm值等。经过初筛, Chorus2输出2个文件, 一个包含从基因组中过滤到的所有寡核苷酸序列, 另一个包含不重叠的寡核苷酸序列。

(2) 使用ChorusNGSfilter过滤寡核苷酸集合中的重复序列。将WGS数据、参考基因组和初筛到的寡核苷酸序列作为输入文件, 使用基于k-mer方法的ChorusNGSfilter进一步过滤重复序列。使用Jellyfish计算k-mer值, 用来代表每个寡核苷酸的相对重复次数。

(3) 使用ChorusNGSselect选择可信的寡核苷酸探针。根据每个寡核苷酸的k-mer值, 使用ChorusNGSselect选择探针。如果某个寡核苷酸序列的k-mer值偏离k-mer值分布的总区间, 则该寡核苷酸将被过滤掉。为了方便探针设计, Chorus2采用名为ChorusGUI的图形用户界面。使用ChorusPBGUI脚本, 根据给定的探针密度或目标链, 可以轻松选出最终的寡核苷酸探针集合。将这些选定的寡核苷酸序列合成为库, 即可用于后续的探针扩增和标记实验。

### 4.2 MYcroarray脱泡PCR及PCR产物纯化(第1步扩增)

#### 4.2.1 MYcroarray脱泡PCR

(1) 准备模板混合液(冰上操作)。吸取24.7  $\mu\text{L}$  去离子水、0.25  $\mu\text{L}$  MYtags PCR primer mix和25  $\mu\text{L}$  高保真DNA聚合酶预混液(KAPA HiFi HotStart Ready Mix)于0.2 mL PCR管中, 混匀后短暂离心。

(2) 另准备1个新的0.2 mL PCR管, 吸入5  $\mu\text{L}$  模板混合液, 作为阴性对照。

(3) 取2.5  $\mu\text{L}$  寡核苷酸库工作液, 加入剩余的模板混合液中, 混匀后短暂离心。

(4) 将第(3)步中的PCR混合液和第(2)步中的阴性对照放入PCR仪。PCR反应程序如下: 95°C 3分钟, 4个循环; 98°C 20秒, 54°C 15秒, 72°C 30秒, 14个循环; 98°C 20秒, 56°C 15秒, 72°C 30秒。反应结束后于24°C暂存。

(5) 再取1个新的0.2 mL PCR管, 用于准备脱泡混合液(冰上操作)。取8.8  $\mu\text{L}$  去离子水、1.2  $\mu\text{L}$  MYtags PCR primer mix和10  $\mu\text{L}$  高保真DNA聚合酶预混液(KAPA HiFi HotStart Ready Mix), 混匀后短暂离心。

(6) 将配好的脱泡混合液加入第(4)步中的PCR混合液中, 放入PCR仪。PCR反应程序如下: 95°C 3分钟, 1个循环; 98°C 20秒, 56°C 15秒, 72°C 30秒。反应结束后, 在PCR纯化前, 存放于24°C环境。

#### 4.2.2 PCR产物回收

(1) 使用Qiagen Qiaquick PCR纯化试剂盒回收PCR产物。将4.2.1节第(6)步中的PCR产物转移到1.5 mL EP管中, 加入适量nuclease-free水, 定容至100  $\mu\text{L}$ , 加入5  $\mu\text{L}$  3 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠溶液。

(2) 加入500  $\mu\text{L}$  Qiagen PB溶液, 震荡5秒。

(3) 将所用溶液转移到QIAquick柱上, 并安装在2 mL收集管上, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。弃流穿液, 将QIAquick柱放回同一收集管上。

(4) 向QIAquick柱中加入700  $\mu\text{L}$  Qiagen PE溶液, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。弃流穿液, 将QIAquick柱放回同一收集管上。

(5) 16 000  $\times g$ 再次离心2分钟。

(6) 将QIAquick柱放于1.5 mL EP管上, 在膜中央加入30  $\mu\text{L}$  Qiagen EB溶液, 静置4分钟, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。

(7) 使用分光光度计测量回收DNA的浓度(见注意事项1)。于-20°C冰箱保存。

### 4.3 体外转录和RNA纯化(第2步扩增)

#### 4.3.1 体外转录

(1) 使用MEGA shortscript™ T7转录试剂盒, 准备转录混合液(冰上操作)。取1个RNase-free的0.2 mL PCR管, 向其中加入X  $\mu\text{L}$  4.2.2节第(7)步回收所得的DNA(总量至少480 ng), 4  $\mu\text{L}$  10 $\times$  T7反应溶液, 16  $\mu\text{L}$  rNTP(包括ATP、CTP、GTP和UTP), 4  $\mu\text{L}$  T7酶, 用nuclease-free水补足至40  $\mu\text{L}$ , 混匀后短暂离心。

(2) 将PCR管放于PCR仪中, 37°C孵育4小时, 热盖温度为42°C。所得产物即为体外转录而成的RNA, 可立即进行下一步回收, 亦可于-80°C冰箱中保存。

#### 4.3.2 RNA纯化

- (1) 使用Qiagen RNeasy Mini试剂盒回收RNA。将4.3.1节第(2)步所得产物放于冰上, 转移到1.5 mL EP管中, 加入260  $\mu\text{L}$  RNase-free水, 使用移液器吸打混匀。总体积为300  $\mu\text{L}$ , 分装为3管, 每管100  $\mu\text{L}$ 。
- (2) 向每管加入350  $\mu\text{L}$  RLT溶液, 充分混匀。再加入250  $\mu\text{L}$ 无水乙醇, 充分混匀, 勿离心。
- (3) 取650  $\mu\text{L}$ 上述混合液转移到RNeasy mini spin柱中, 并置于2 mL收集管上, 13 500  $\times g$ 离心1分钟。弃流穿液, 将RNeasy mini spin柱放回到同一收集管上。重复这一步骤, 直到所有混合样用完。
- (4) 吸取500  $\mu\text{L}$  RPE溶液于RNeasy mini spin柱中, 13 500  $\times g$ 离心1分钟, 弃流穿液, 将RNeasy mini spin柱放回到同一收集管上。
- (5) 重复第(4)步。
- (6) 将RNeasy mini spin柱放回到同一收集管上, 再次13 500  $\times g$ 离心3分钟。
- (7) 将RNeasy mini spin柱放于1.5 mL EP管上, 在其中一个柱子膜中央加入50  $\mu\text{L}$  RNase-free水, 静置4分钟, 13 500  $\times g$ 离心1分钟。再用洗脱下来的50  $\mu\text{L}$  RNA溶液依次洗脱另外2个柱子(即将3个柱子中的RNA都洗脱到此50  $\mu\text{L}$ 水中)。
- (8) 使用分光光度计测量回收RNA的浓度(见注意事项2), 于-80°C冰箱中保存(见注意事项3)。

### 4.4 反转录及产物回收(探针标记)

#### 4.4.1 反转录

- (1) 准备反转录混合液(冰上操作)。取1个RNase-free的0.2 mL PCR管, 向其中加入X  $\mu\text{L}$  4.3.2节第(8)步回收的RNA (42  $\mu\text{g}$ )、2.4  $\mu\text{L}$  1 mmol·L<sup>-1</sup>地高辛或生物素标记的反转录引物、15  $\mu\text{L}$  10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP和1  $\mu\text{L}$  RNA酶抑制剂SUPERase-In, 用nuclease-free水补足体积至60  $\mu\text{L}$ , 混匀后短暂离心。
- (2) 将PCR管放入PCR仪中, 65°C孵育5分钟, 热盖温度为75°C。结束后立即取出, 置于冰上冷却5分钟。
- (3) 再取1个新的RNase-free的0.2 mL PCR管(冰上操作), 加入4  $\mu\text{L}$  nuclease-free水、20  $\mu\text{L}$  5 $\times$  RT溶

液、10  $\mu\text{L}$  0.1 mol·L<sup>-1</sup> DTT和1  $\mu\text{L}$  RNA酶抑制剂SUPERase-In, 混合后将其转移到上一步中的反转录混合液中, 混匀后短暂离心。

- (4) 将PCR管放入PCR仪中, 55°C孵育5分钟, 热盖温度为55°C。
- (5) 向上一步反应液中加入3  $\mu\text{L}$ 反转录酶Super-Script IV, 混匀后短暂离心。
- (6) 将PCR管放入PCR仪中, 55°C孵育1小时, 热盖温度为55°C。
- (7) 为了去除多余的引物, 向其中加入11  $\mu\text{L}$  Exonuclease I反应溶液和2  $\mu\text{L}$  Exonuclease I, 混匀后短暂离心。
- (8) 将PCR管放入PCR仪中, 37°C孵育15分钟, 热盖温度为105°C。
- (9) 加入12  $\mu\text{L}$  0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH8.0), 混匀后短暂离心。
- (10) 将PCR管放入PCR仪中, 80°C孵育20分钟, 热盖温度为105°C, 随后将样品置于冰上。

#### 4.4.2 反转录产物(RNA-DNA杂合体)的回收

- (1) 使用Zymo Quick-RNA MiniPrep试剂盒, 向反转录产物中加入500  $\mu\text{L}$  Zymo RNA裂解液, 震荡5秒。
- (2) 再加入625  $\mu\text{L}$ 无水乙醇, 震荡5秒。
- (3) 将Zymo-Spin柱安装于2 mL收集管上, 向柱中加入500  $\mu\text{L}$ 上一步的样品。16 000  $\times g$ 离心30秒。弃流穿液, 将Zymo-Spin柱放回到同一收集管上。重复这一步骤, 直到所有样品用完。
- (4) 向Zymo-Spin柱中加入400  $\mu\text{L}$  Zymo RNA Prep溶液, 16 000  $\times g$ 离心30秒。弃流穿液, 将Zymo-Spin柱放回到同一收集管上。
- (5) 向Zymo-Spin柱中加入700  $\mu\text{L}$  Zymo RNA wash溶液, 16 000  $\times g$ 离心30秒。弃流穿液, 将Zymo-Spin柱放回到同一收集管上。
- (6) 再向Zymo-Spin柱中加入400  $\mu\text{L}$  Zymo RNA wash溶液, 16 000  $\times g$ 离心30秒。弃流穿液, 将Zymo-Spin柱放回到同一收集管上。
- (7) 再16 000  $\times g$ 离心3分钟。
- (8) 将Zymo-Spin柱放于1个新的1.5 mL EP管上, 向膜中央加入42  $\mu\text{L}$  nuclease-free水, 室温静置4分钟, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。
- (9) 重复步骤(8): 再向Zymo-Spin柱的膜中央加入

42  $\mu\text{L}$  nuclease-free水, 室温静置4分钟, 16 000  $\times g$  离心1分钟。

(10) 回收的总反转录产物约为82  $\mu\text{L}$ , 于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

## 4.5 RNA去除和ssDNA探针纯化

### 4.5.1 RNA去除

(1) 准备去除RNA的酶混合液(冰上操作)。取1个0.2 mL的PCR管, 向其中加入6  $\mu\text{L}$  nuclease-free水、10  $\mu\text{L}$  10 $\times$  RNase H溶液和4  $\mu\text{L}$  RNase H (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )。

(2) 将上述酶混合液加入到回收的82  $\mu\text{L}$  反转录产物中, 混匀后短暂离心。

(3) 放入PCR仪中,  $37^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时, 热盖温度为 $105^{\circ}\text{C}$ 。反应结束后无需放于冰上。

(4) 再向其中加入4  $\mu\text{L}$  10 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$  RNase A, 混匀后短暂离心。

(5) 放入PCR仪中, 程序如下:  $37^{\circ}\text{C}$ 孵育60分钟,  $70^{\circ}\text{C}$ 孵育20分钟,  $50^{\circ}\text{C}$ 孵育60分钟,  $95^{\circ}\text{C}$ 孵育5分钟(从 $95^{\circ}\text{C}$ 梯度降温到 $50^{\circ}\text{C}$ ,  $0.1^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $50^{\circ}\text{C}$ 再次孵育60分钟, 随后 $4^{\circ}\text{C}$ 孵育直至纯化。

### 4.5.2 ssDNA探针纯化

(1) 使用Zymo Quick-RNA MiniPrep试剂盒纯化ssDNA探针, 在4.5.1节第(5)步混合溶液中加入400  $\mu\text{L}$  Zymo RNA裂解液, 震荡5秒。

(2) 再加入500  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 震荡5秒。

(3) 将Zymo-Spin柱安放于2 mL收集管上, 向柱中加入650  $\mu\text{L}$  上述样品。16 000  $\times g$ 离心30秒。弃流穿液, 将Zymo-Spin柱放回到同一收集管上。重复这一步骤, 直到所有样品用完。

(4) 同4.3.2节中第(4)–(7)步。

(5) ssDNA探针洗脱。将Zymo-Spin柱放于1个新的1.5 mL EP管上, 向膜中央加入50  $\mu\text{L}$  预热至 $65^{\circ}\text{C}$ 的nuclease-free水, 静置4分钟, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。

(6) 重复步骤(5): 再向Zymo-Spin柱的膜中央加入50  $\mu\text{L}$  预热至 $65^{\circ}\text{C}$ 的nuclease-free水, 静置4分钟, 16 000  $\times g$ 离心1分钟。

(7) 使用分光光度计测量回收ssDNA探针的浓度(见注意事项4), 随后放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。FISH实验前将其取出并放冰上融化。

## 4.6 染色体制备

### 4.6.1 水稻减数分裂染色体的制备

(1) 将处于减数分裂阶段的水稻幼穗收集于10 mL试管中, 用新鲜配制的卡诺固定液浸没, 立即置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存储(可存数月)。

(2) 在染色体制备前12小时将存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱的水稻幼穗取出, 于室温固定(见注意事项5)。

(3) 取1朵颖花, 将其放至载玻片上, 用尖头镊子和解剖针将颖花中的6枚花药剥离出来, 向花药上滴加1滴醋酸洋红染液。

(4) 将6枚花药在醋酸洋红溶液中分散开, 用解剖针逐个挤压每个花药1–2次, 用22 mm  $\times$  22 mm盖玻片覆盖花药及醋酸洋红溶液。

(5) 在40倍相差显微镜(OLYMPUS, BX41-PHD-P11)下观察染色体形态, 从而判断所观察颖花中的花粉母细胞所处的减数分裂时期(见注意事项6)。

(6) 脱色。将45%醋酸溶液滴于盖玻片左侧, 将滤纸放于盖玻片右侧吸取, 待左侧45%醋酸溶液被完全吸取后, 再补滴1–2次, 直至醋酸洋红染液洗脱干净。

(7) 将载玻片翻转过来, 盖玻片一面向下, 放于滤纸上, 左右手分别置于盖玻片两侧, 用力向下挤压。

(8) 用长柄镊子夹取载玻片, 将其浸没在液氮中, 冷冻几秒直至无声, 然后拿出载玻片放于桌面, 用刀片快速去掉盖玻片。

(9) 将载玻片放空气中干燥, 即可用于后续的FISH实验, 也可将涂片置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存数周。

### 4.6.2 水稻根尖细胞染色体制备

(1) 将水稻种子去壳后放在铺有几层湿滤纸的培养皿中,  $37^{\circ}\text{C}$ 培养2天, 直到种子萌发并长出1–2 cm的根(或直接取大田生长的水稻根)。

(2) 根的预处理。用解剖刀将长1–2 cm的根取下, 放于2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  8-羟基喹啉溶液中,  $20^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时。

(3) 固定。将预处理后的根放于新鲜配制的卡诺固定液中, 室温固定24小时, 随后放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 可存储数月。

(4) 用去离子水洗根2次, 每次5分钟。

(5) 酶解。用解剖刀切下根尖(根尖端乳白色区域, 约2 mm), 浸没于酶混合液中,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30–90分钟(见注意事项7)。

(6) 用去离子水轻洗根尖2次, 每次1分钟(酶解后根

尖易碎, 动作要轻)。

(7) 将根尖重新放入卡诺固定液中, 于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻。同时将载玻片也放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻。

(8) 取1个根尖放于刚从 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出的载玻片上, 在其上滴加1滴预冷的卡诺固定液, 用解剖针捣碎, 在酒精灯火焰上迅速烤干, 即可用于FISH实验。

## 4.7 FISH实验

### 4.7.1 涂片的预处理

(1) 将4.6.2节第(7)步所得染色体涂片浸没于4%多聚甲醛固定液中, 室温固定10分钟。

(2) 将涂片取出, 分别在70%乙醇和无水乙醇中浸泡3分钟。

(3) 竖直放置涂片, 室温干燥。

### 4.7.2 染色体变性

(1) 在涂片上具有染色体的区域滴加100  $\mu\text{L}$  70%去离子甲酰胺, 加盖1片24 mm  $\times$  32 mm的盖玻片。

(2) 在 $95^{\circ}\text{C}$ 烘箱内热变性4分钟(见注意事项8)。

(3) 取出涂片, 迅速甩去上面的盖玻片, 插入 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷的70%乙醇中, 低速振荡浸泡5分钟。

(4) 将涂片在 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇中低速振荡浸泡5分钟。

(5) 将涂片竖直放置, 室温干燥。

### 4.7.3 探针变性和杂交

(1) 配制探针杂交液(按每张涂片加20  $\mu\text{L}$  杂交液进行配制)。取1个新的1.5 mL EP管, 向其中加入10  $\mu\text{L}$  100%去离子甲酰胺、2  $\mu\text{L}$  20 $\times$  SSC、4  $\mu\text{L}$  50%硫酸葡聚糖(黏稠, 需缓慢吸取)、200 ng地高辛标记的ssDNA探针和200 ng生物素标记的ssDNA探针(见注意事项9), 用去离子水补足体积到20  $\mu\text{L}$ , 混匀后短暂离心。

(2) 于沸水中热变性5分钟, 取出迅速置于冰水混合物中冷却。

(3) 探针与染色体杂交。在每张变性好的染色体涂片上滴加20  $\mu\text{L}$  探针杂交液, 加盖1片24 mm  $\times$  32 mm的盖玻片。

(4) 将载玻片放于湿盒上, 于 $95^{\circ}\text{C}$ 烘箱内热变性2分钟(见注意事项10)。

(5) 取出湿盒和载玻片, 将载玻片放入湿盒中,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育8小时以上。

### 4.7.4 抗体反应及探针检测

(1) 将载玻片在2 $\times$  SSC溶液中浸泡数分钟, 直至盖玻片脱落。

(2) 将载玻片竖直浸没于2 $\times$  SSC溶液中, 低速振荡洗涤3次, 每次5分钟。

(3) 配制抗体反应液(避光操作)。取1个新的1.5 mL EP管, 向其中加入0.1% PBST溶液(每张涂片加50  $\mu\text{L}$ ), 再向其中加入偶联荧光素的抗地高辛或生物素的抗体(每张涂片加1  $\mu\text{L}$ , 见注意事项11), 混匀后短暂离心。

(4) 将洗涤后的载玻片水平放于桌面上, 在载玻片未干时加入50  $\mu\text{L}$  抗体反应液, 加盖1张24 mm  $\times$  32 mm的Parafilm膜, 放入湿盒中, 于 $37^{\circ}\text{C}$ 温箱中避光孵育30分钟。

(5) 揭掉Parafilm膜, 用1 $\times$  PBS低速振荡洗涤载玻片3次, 每次5分钟。

(6) 将载玻片竖直放置, 室温干燥后, 每张载玻片加10  $\mu\text{L}$  含抗褪色剂的DAPI染液, 盖上1片24 mm  $\times$  32 mm的盖玻片, 即可用于显微观察。成像结果参考图2。

## 5 注意事项

(1) 体外转录至少需要使用480 ng DNA, 较为理想的实验结果是MYcroarray脱泡PCR后能够回收2–4  $\mu\text{g}$  DNA。

(2) 反转录实验至少需要42  $\mu\text{g}$  RNA, 较为理想的实验结果是回收的RNA产物总量大于80  $\mu\text{g}$ 。

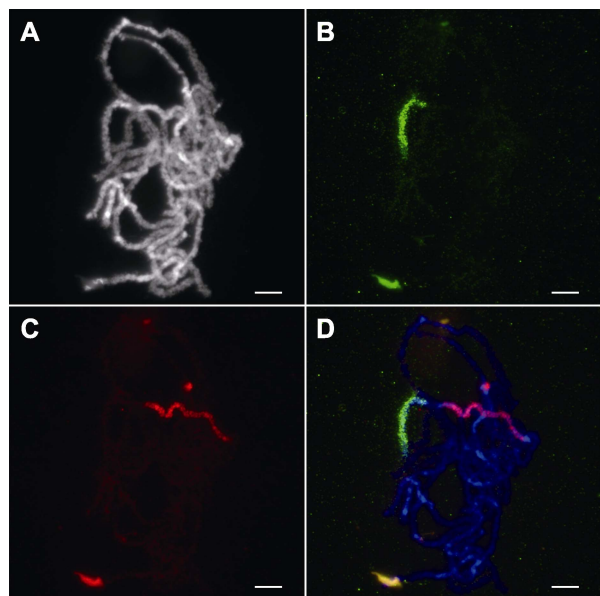
(3) 应尽量减少RNA的反复冻融, 若接着进行反转录实验, 可将RNA置于冰上。此外, 体外转录和RNA纯化需要注意使用RNase-free的耗材和试剂, 谨防RNA降解。

(4) 较为理想的实验结果是最终回收的ssDNA探针浓度大于150  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

(5) 室温固定时间太长会导致细胞质浓稠和探针信号弱, 固定时间太短又会导致染色体形态不佳或易破碎。一般用于FISH实验的水稻幼穗固定时间不超过3天, 室温固定6–24小时效果较好。

(6) 野生型一朵颖花中的大部分花粉母细胞处于同一时期, 少量花粉母细胞处于临近时期。例如, 一朵颖花中大部分花粉母细胞处于减数分裂的中期I, 可能含有少量细胞处于终变期和二分体时期。





**图2** 水稻花粉母细胞减数分裂粗线期染色体的寡核苷酸荧光原位杂交鉴定

(A) 粗线期染色体; (B) 特异性靶向水稻11号染色体短臂的寡核苷酸探针(11 S)信号; (C) 特异性靶向水稻11号染色体长臂的寡核苷酸探针(11 L)信号; (D) 三通道合并图(蓝色为染色体, 绿色为11 S, 红色为11 L)。Bars=5  $\mu\text{m}$

**Figure 2** Characterization of rice meiotic pachytene chromosomes by oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization

(A) Pachytene chromosomes; (B) The signal of oligonucleotide probe specific to the short arm of chromosome 11 in rice (11 S); (C) The signal of oligonucleotide probe specific to the long arm of chromosome 11 in rice (11 L); (D) Three-channel combined panel (Blue: Chromosomes; Green: 11 S; Red: 11 L). Bars=5  $\mu\text{m}$

(7) 不同植物的根尖所需的酶解时间不同, 水稻根尖一般需要酶解40分钟。酶解时间太久, 根尖破碎不利于后续操作; 酶解时间不够, 细胞分散效果不好。

(8) 变性时间影响染色体的形态以及探针与染色体的结合情况, 时间太长会导致染色体的形态不佳, 但时间太短可能导致染色体变性不充分、探针结合不好。因此, 染色体变性时间需要摸索, 一般水稻减数分裂时期染色体需要变性2–5分钟。

(9) 通常加入某个ssDNA探针的量为200 ng, 为了增加信号强度, 可以将探针量提高到400 ng。探针杂交液总体积为20  $\mu\text{L}$ , 探针加入量最多为4  $\mu\text{L}$ , 因此最终回收的ssDNA探针的浓度越高越好。此步骤是为了进一步促进ssDNA探针与染色体结合, 可以选做。

(10) Anti-dig-rhodamine (Roche) 母液的浓度为200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Anti-biotin-FITC (SouthernBiotech)母液的浓度为1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 参考文献

程新杰, 于恒秀, 程祝宽 (2019). 水稻减数分裂染色体分析方法. 植物学报 54, 503–508.

Albert PS, Zhang T, Semrau K, Rouillard JM, Kao YH, Wang CJR, Danilova TV, Jiang JM, Birchler JA (2019). Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 1679–1685.

Beliveau BJ, Joyce EF, Apostolopoulos N, Yilmaz F, Fonseka CY, McCole RB, Chang YM, Li JB, Senaratne TN, Williams BR, Rouillard JM, Wu CT (2012). Versatile design and synthesis platform for visualizing genomes with Oligopaint FISH probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 21301–21306.

Boyle S, Rodesch MJ, Halvensleben HA, Jeddloh JA, Bickmore WA (2011). Fluorescence *in situ* hybridization with high-complexity repeat-free oligonucleotide probes generated by massively parallel synthesis. *Chromosome Res* 19, 901–909.

Braz GT, do Vale Martins L, Zhang T, Albert PS, Birchler JA, Jiang JM (2020). A universal chromosome identification system for maize and wild *Zea* species. *Chromosome Res* 28, 183–194.

Braz GT, He L, Zhao HN, Zhang T, Semrau K, Rouillard JM, Torres GA, Jiang JM (2018). Comparative Oligo-FISH mapping: an efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. *Genetics* 208, 513–523.

Cheng ZK, Buell CR, Wing RA, Jiang JM (2002). Resolution of fluorescence *in-situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Res* 10, 379–387.

Do Vale Martins L, de Oliveira Bustamante F, da Silva Oliveira AR, da Costa AF, de Lima Feitoza L, Liang QH, Zhao HN, Benko-Iseppon AM, Muñoz-Amatriaín M, Pedrosa-Harand A, Jiang JM, Brasileiro-Vidal AC (2021). BAC- and Oligo-FISH mapping reveals chromosome evolution among *Vigna angularis*, *V. unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris*. *Chromosoma* 130, 133–147.

Do Vale Martins L, Yu F, Zhao HN, Dennison T, Lauter N, Wang HY, Deng ZH, Thompson A, Semrau K, Rouil-

- Iard JM, Birchler JA, Jiang JM (2019). Meiotic crossovers characterized by haplotype-specific chromosome painting in maize. *Nat Commun* **10**, 4604.
- Han YH, Zhang T, Thammapichai P, Weng YQ, Jiang JM (2015). Chromosome-specific painting in *Cucumis* species using bulked oligonucleotides. *Genetics* **200**, 771–779.
- He L, Braz GT, Torres GA, Jiang JM (2018). Chromosome painting in meiosis reveals pairing of specific chromosomes in polyploid *Solanum* species. *Chromosoma* **127**, 505–513.
- Hou LL, Xu M, Zhang T, Xu ZH, Wang WY, Zhang JX, Yu MM, Ji W, Zhu CW, Gong ZY, Gu MH, Jiang JM, Yu HX (2018). Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. *BMC Plant Biol* **18**, 110.
- Idziak D, Betekhtin A, Wolny E, Lesniewska K, Wright J, Febrer M, Bevan MW, Jenkins G, Hasterok R (2011). Painting the chromosomes of *Brachypodium*: current status and future prospects. *Chromosoma* **120**, 469–479.
- Jiang JM (2019). Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Res* **27**, 153–165.
- Jiang JM, Gill BS (2006). Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* **49**, 1057–1068.
- Liu GQ, Zhang T (2021). Single copy oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization probe design platforms: development, application and evaluation. *Int J Mol Sci* **22**, 7124.
- Liu XY, Sun S, Wu Y, Zhou Y, Gu SW, Yu HX, Yi CD, Gu MH, Jiang JM, Liu B, Zhang T, Gong ZY (2020). Dual-color Oligo-FISH can reveal chromosomal variations and evolution in *Oryza* species. *Plant J* **101**, 112–121.
- Lou QF, Zhang YX, He YH, Li J, Jia L, Cheng CY, Guan W, Yang SQ, Chen JF (2014). Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *Plant J* **78**, 169–179.
- Lysak MA, Fransz PF, Ali HBM, Schubert I (2001). Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **28**, 689–697.
- Meng Z, Zhang ZL, Yan TY, Lin QF, Wang Y, Huang WY, Huang YJ, Li ZJ, Yu QY, Wang JP, Wang K (2018). Comprehensively characterizing the cytological features of *Saccharum spontaneum* by the development of a complete set of chromosome-specific Oligo probes. *Front Plant Sci* **9**, 1624.
- Qu MM, Li KP, Han YL, Chen L, Li ZY, Han YH (2017). Integrated karyotyping of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with Oligopaint FISH probes. *Cytogenet Genome Res* **153**, 158–164.
- Shi PY, Sun HJ, Liu GQ, Zhang X, Zhou JW, Song RR, Xiao J, Yuan CX, Sun L, Wang ZK, Lou QF, Jiang JM, Wang XE, Wang HY (2022). Chromosome painting reveals inter-chromosomal rearrangements and evolution of subgenome D of wheat. *Plant J* **112**, 55–67.
- Xin HY, Zhang T, Han YH, Wu YF, Shi JS, Xi ML, Jiang JM (2018). Chromosome painting and comparative physical mapping of the sex chromosomes in *Populus tomentosa* and *Populus deltoides*. *Chromosoma* **127**, 313–321.
- Yamada NA, Rector LS, Tsang P, Carr E, Scheffer A, Sederberg MC, Aston ME, Ach RA, Tsalenko A, Sampas N, Peter B, Bruhn L, Brothman AR (2011). Visualization of fine-scale genomic structure by oligonucleotide-based high-resolution FISH. *Cytogenet Genome Res* **132**, 248–254.
- Yu F, Zhao XW, Chai J, Ding XE, Li XT, Huang YJ, Wang XH, Wu JY, Zhang MQ, Yang QH, Deng ZH, Jiang JM (2022). Chromosome-specific painting unveils chromosomal fusions and distinct allopolyploid species in the *Saccharum* complex. *New Phytol* **233**, 1953–1965.
- Zhang FF, Shen Y, Miao CB, Cao YW, Shi WQ, Du GJ, Tang D, Li YF, Luo Q, Cheng ZK (2020). OsRAD51D promotes homologous pairing and recombination by preventing nonhomologous interactions in rice meiosis. *New Phytol* **227**, 824–839.
- Zhang FF, Tang D, Shen Y, Xue ZH, Shi WQ, Ren LJ, Du GJ, Li YF, Cheng ZK (2017). The F-box protein ZYGO1 mediates bouquet formation to promote homologous pairing, synapsis, and recombination in rice meiosis. *Plant Cell* **29**, 2597–2609.
- Zhang T, Liu GQ, Zhao HN, Braz GT, Jiang JM (2021). Chorus2: design of genome-scale oligonucleotide-based probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Biotechnol J* **19**, 1967–1978.

## Protocols for Oligonucleotide Fluorescence *in situ* Hybridization in Plants

Fanfan Zhang<sup>1</sup>, Xinying Xing<sup>1</sup>, Wenqing Shi<sup>2</sup>, Yi Shen<sup>2</sup>, Zhukuan Cheng<sup>2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Plant Genomics and Center for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>3</sup>Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract** Oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization (Oligo-FISH) is a new technology that integrates bioinformatics analysis, high throughput DNA synthesis and fluorescence *in situ* hybridization experiments. It is applicable to plant species with a reference genome. Oligo probes are able design to a chromosomal region, an entire chromosome, and a set of chromosomes according to researchers' requirements. Oligo-FISH has been successfully applied to studies on karyotyping, chromosome variation, population evolution, homologous chromosome pairing, haplotype analysis, and heteropolyploid identification in several plant species. Here, we introduce the concrete operational processes of oligonucleotide-based probe design, amplification and labeling, chromosomes preparation, and fluorescence *in situ* hybridization in plants, so as to facilitate Oligo-FISH application in the cytogenetics research in the future.

**Key words** fluorescence *in situ* hybridization, oligonucleotide probe, chromosome, plant

**Zhang FF, Xing XY, Shi WQ, Shen Y, Cheng ZK (2023).** Protocols for oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization in plants. *Chin Bull Bot* **58**, 274–284.

---

\* Author for correspondence. E-mail: zkcheng@genetics.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)