



植物小RNA荧光原位杂交实验方法

胡滨滨^{1,2}, 薛治慧¹, 张翠^{1,2*}

¹中国科学院植物研究所, 中国科学院植物分子生理学重点实验室, 北京 100093; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 小RNA是对植物生长发育十分重要的一类小分子核苷酸, 在多种生命过程以及胁迫响应中发挥重要调控作用。对小RNA的定位研究有助于揭示它们的功能, 而小RNA荧光原位杂交(sRNA-FISH)是一种通过荧光检测技术对生物体内小RNA进行定性或半定量分析的技术, 目前该技术已经在动物体内被广泛应用, 而在植物体内的应用还比较少。该文详细介绍了基于超高分辨率显微镜的sRNA-FISH的具体操作流程以及注意事项, 该技术可用于探究植物组织内小RNA的表达与定位。

关键词 荧光原位杂交, 小RNA, 植物

胡滨滨, 薛治慧, 张翠 (2021). 植物小RNA荧光原位杂交实验方法. *植物学报* 56, 330–338.

小RNA是动植物中一类非常重要的18–30 nt小分子核苷酸(Chen, 2009; Kim et al., 2009), 成熟的小RNA通过对靶基因进行转录或转录后水平的调节参与多种植物的生长发育与胁迫响应过程。目前植物中主要有3种小RNA, 分别为miRNA (microRNA)、siRNA (Small interfering RNA)和phasiRNA (phased secondary small interfering RNA) (Yu et al., 2019)。在植物细胞中, miRNA的生物合成过程已有报道, miRNA编码基因在RNA聚合酶II的作用下被转录至细胞核中, 形成初级miRNA (Primary miRNA, Pri-miRNA) (Lee et al., 2004; Jones-Rhoades et al., 2006)。Pri-miRNA在DCL1 (DICER-LIKE 1)、HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1)以及SE (SERRATE)等蛋白因子的作用下被切割成具有互补茎环结构的前体miRNA (Precursor miRNA, Pre-miRNA), Pre-miRNA又被加工成miRNA/miRNA*双链体。在HEN1 (HUA ENHANCER 1)的作用下, miRNA/miRNA*双链聚合体的3'端被甲基化修饰, 以免被降解, 稳定的miRNA/miRNA*双链聚合体在HASTY蛋白的作用下被运输至细胞质中(Kurihara and Watanabe, 2004; Li et al., 2005; Park et al., 2005; Jones-Rhoades et al., 2006)。在细胞质中, miRNA/miRNA*双链聚合物

解旋, 反义链被降解, 成熟miRNA单链与含有RNA解旋酶和AGO (ARGONAUTE)蛋白的RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合, 控制其相关靶基因的表达(Vaucheret et al., 2004; Baumberger and Baulcombe, 2005)。

小RNA作为一种重要的转录后水平调控因子, 已被证明具有很强的组织特异性及细胞特异性(Nogueira et al., 2007, 2009; Ori et al., 2007; Chitwood et al., 2008, 2009; Liu et al., 2009; Wollmann et al., 2010), 并且小RNA还被发现能够在植物中移动并参与植物发育的调控(Pagliarani and Gambino, 2019; Yu et al., 2019)。为了探究小RNA在植物体内的组织定位以及运输, 研究人员开发了一系列实验方法。最初是对植物体内Pre-miRNA的组织以及细胞定位进行检测。研究者利用地高辛(Digoxin, DIG)标记的反义RNA探针进行原位杂交(Chen, 2004; Kidner and Timmermans, 2006)。该技术也被用于检测植物组织内的成熟miRNA及其靶基因mRNA的表达模式, 从而探究小RNA在植物组织中的运输过程(Chitwood et al., 2009; Carlsbecker et al., 2010), 但传统的体外转录合成探针对低表达量的小RNA灵敏度不高。为了探究低丰度成熟的小RNA在植物体内的表达模式

收稿日期: 2021-04-02; 接受日期: 2021-05-07

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类) (No.XDA24010106-2)和国家自然科学基金(No.31900391)

* 通讯作者。E-mail: cuizhang@ibcas.ac.cn

与组织定位, 研究者开发了基于类寡核苷酸衍生物 (locked nucleic acid, LNA) 修饰探针的体内原位杂交技术 (Javelle and Timmermans, 2012)。针对 Pri-miRNA, 研究者通过 MIRNA 自身启动子驱动报告基因 (如 *GUS* 和 *GFP*) 来检测 Pri-miRNA 的转录表达模式 (Jung and Park, 2007; Raman et al., 2008)。一种基于荧光蛋白 (如绿色荧光蛋白 GFP) 的小 RNA 传感器系统 (通常在荧光蛋白 DNA 序列的 3' 非编码区加上小 RNA 的结合位点, 这样荧光蛋白不表达的地方也就是小 RNA 表达的地方) 也通常被用于检测小 RNA 在植物中的表达 (Nodine and Bartel, 2010)。小 RNA 传感器系统也被用于小 RNA 运输研究。例如, 研究者利用该技术与原位杂交相结合, 发现拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) miR394 能够进行细胞间的短距离运输, Pri-miR394 在茎尖分生组织的 L1 层细胞表达, 成熟的 miR394 能够运输至 L2 与 L3 层细胞, 抑制其靶基因 *LCR* (*LEAF CURLING RESPONSIVENESS*) 的表达, 从而维持干细胞的稳态 (Knauer et al., 2013)。还有研究者利用该系统发现, 植物中小 RNA 在细胞间的短距离运输与蛋白质的运输机制不同, 其运输不受胞间连丝状态性质变化的影响 (Skopelitis et al., 2018)。此外, 除了能在细胞间进行短距离运输, 小 RNA 也能够植物组织间进行长距离运输。研究者利用嫁接实验以及对植物的韧皮部汁液进行小 RNA 测序, 证实大量的小 RNA 能够从植物地上部运输至地下部并抑制其地下部靶基因的表达, 进而参与生物发育过程以及胁迫响应 (Buhtz et al., 2008; Lin et al., 2008; Pant et al., 2008, 2009; Bhogale et al., 2014; Huen et al., 2017)。最近, 研究者利用嫁接实验、小 RNA 测序、降解组测序和 5'-RACE 实验证明植物中小 RNA 能够从茎端到根部进行单向运输, 并且运输至根部后能够在转录水平调控基因在根部的表达 (Li et al., 2021)。利用上述实验技术研究小 RNA 的运输以及表达模式均存在一定的缺点。例如, miRGFP 等依赖荧光蛋白的传感器系统极易在实验过程中出现信号丢失, 无法对小 RNA 的表达进行精确定量且空间分辨率相对较低; 也有研究证明植物 miRNA 会诱发形成大量的次级小 RNA, 这些次级小 RNA 能够在细胞间进行移动, 从而极大地影响 miRGFP 系统实验结果的准确性 (Parizotto et al., 2004; Howell et al., 2007;

Moissiard et al., 2007)。而传统的基于化学发光法的原位杂交技术也存在对于低表达丰度的小 RNA 检测效果不佳的缺点, 而基于 LNA 探针的原位杂交虽然解决了这一问题, 但也存在分辨率不高, 无法一次检测多个靶标等缺点。RNA 测序这种生物信息学方法则无法精确检测植物 miRNA 准确的组织定位与细胞定位, 且测序存在一定的偏好性与错误率等。

基于 RNA FISH 改进的 LNA 探针原位杂交技术与免疫荧光相结合的小 RNA 荧光原位杂交 (small RNA fluorescent *in situ* hybridization, sRNA-FISH) 实验技术能够很好地解决上述问题。RNA-FISH 属于荧光原位杂交技术的一种, 用于检测和定位细胞中特定的 RNA 分子。该方法使用与靶标 RNA 特异性结合的 RNA 分子作为探针, 探针上带有半抗原或者荧光素, 利用碱基互补配对原则, 可实现间接或者直接的荧光显色。RNA FISH 最初被用于检测动物以及酵母 (*Saccharomyces* spp.) 中 RNA 的表达模式与细胞定位 (Levsky and Singer, 2003)。而在植物中, FISH 技术最先被用于染色体以及染色体中特定基因座位的成像 (Lamb et al., 2007; Tirichine et al., 2009; Jiang, 2019), 后来又被研究人员用于指示 mRNA 在植物体内的组织成像以及亚细胞定位 (Bruno et al., 2011, 2015; Himanen et al., 2012; Rozier et al., 2014; Bleckmann and Dresselhaus, 2016; Yang et al., 2017, 2020; Woloszynska et al., 2019)。针对小 RNA 的 FISH 技术也已广泛应用于动物系统中 (Lu and Tsourkas, 2009), 但在植物中的应用还比较少。本文介绍一种地高辛标记的 LNA 探针与靶标 RNA 相结合, 再通过免疫反应, 用偶联荧光基团的抗体检测地高辛半抗原, 最后通过超高分辨率激光共聚焦显微镜进行荧光成像, 对生物体内小 RNA 进行定位、定性或半定量分析的实验技术 (Huang et al., 2019)。本课题组前期通过大量研究证明, 小 RNA 能够参与调控植物侧生分生组织的起始发育 (Zhang et al., 2018, 2020; Xue et al., 2020), 因此我们以模式植物拟南芥为实验材料, 详细介绍该项实验技术的具体操作流程及注意事项。

1 实验材料

- 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 茎尖组织。

2 试剂及用具

- 玻璃染缸(Baigen, Cat No.BG292)。
- 膜(Sigma-Aldrich, Cat No.GBL712525)。
- tRNA (Sigma-Aldrich, Cat No.10109541001)。
- 蛋白酶(Sigma-Aldrich, Cat No.P5147)。
- 三乙醇胺(Macklin, Cat No.TB19271)。
- 乙酸酐(国药集团化学试剂有限公司, Cat No. 10000318)。
- 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA) (Sigma-E3889-25G)。
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Cat No.T8787)。
- 封闭液(Sigma-Aldrich, Cat No.11096176001)。
- SlowFade™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Cat No.S36967)。
- 地高辛抗体, 羊抗(Sigma-Aldrich, Cat No.11214667001)。
- Donkey anti-Sheep IgG(H+L)Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 647 (Thermo Fisher Scientific, Cat No.A-21448)。
- 50× Denhardt's solution (Sigma-Aldrich, Cat No. D2532)。
- 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) (VETEC, Cat No. V900477-100G)。
- 哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES) (Sigma, Cat No. P1851-100G)。
- 甘氨酸(Sigma-Aldrich, Cat No.G8898)。
- 多聚甲醛(Sigma, Cat No.158127-500G)。
- 多聚赖氨酸处理载玻片(Sigma-Aldrich, Cat No. P0425-72EA)。
- 牛血清白蛋白(BSA) (Sigma-Aldrich, Cat No. A7906)。
- 去离子甲酰胺(Sigma-Aldrich, Cat No.F9037)。
- 硫酸葡聚糖(Sigma-Aldrich, Cat No.D8906-5G)。
- DEPC原液(上海吉至生化科技有限公司, Cat No. E174)。

3 试剂配方

- 注意: 实验操作过程中为了防止RNA酶的影响, 本实验所有用水均采用DEPC水。
- 0.1% (v/v) DEPC水: 每1 000 mL加入1 mL DEPC

原液, 过夜摇匀, 转速为每分钟80转, 121°C灭菌30分钟, 重复2次。

- 0.2% (w/v)甘氨酸: 每100 mL 10 mmol·L⁻¹ PBS中加入0.2 g甘氨酸。
- 100 mg·mL⁻¹ tRNA: 每1 mL DEPC水中加入100 mg tRNA粉末; 存储于-20°C冰箱。
- 50% (w/v)硫酸葡聚糖: 将硫酸葡聚糖加入水中, 并加热至80°C直至粉末完全溶解, 冷却后在-20°C冰箱中保存。
- 封闭缓冲液: 在10 mmol·L⁻¹ TBS缓冲液中加入1% (w/v)封闭液。首先将TBS加热至70°C, 然后加入封闭剂, 连续搅拌使其溶解。冷却至室温后使用。使用当天配制, 每10张载玻片准备50 mL封闭缓冲液。
- 杂交缓冲液: 每10 mL杂交缓冲液中包含1.25 mL原位杂交盐, 5 mL去离子甲酰胺, 2.5 mL 50% (w/v)硫酸葡聚糖, 250 μL 50× Denhardt's溶液, 125 μL 100 mg·mL⁻¹ tRNA和875 μL DEPC水, 混匀后在-20°C冰箱中保存。
- 原位杂交盐: 3 mol·L⁻¹ NaCl, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 100 mmol·L⁻¹ 磷酸钠 (pH6.8), 50 mmol·L⁻¹ EDTA, 在-20°C冰箱中保存。
- PHEM缓冲液: 5 mmol·L⁻¹ HEPES, 60 mmol·L⁻¹ PIPES, 10 mmol·L⁻¹ EGTA, 2 mmol·L⁻¹ MgCl₂, pH值调至7.0, 高温高压灭菌, 储存在4°C冰箱。
- 50 mg·mL⁻¹蛋白酶: 37°C孵育4小时以消化蛋白酶, 在-20°C冰箱中保存。
- 20× SSC: 3 mol·L⁻¹ NaCl, 0.3 mol·L⁻¹柠檬酸钠 (pH7.0)。
- TBS缓冲液: 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH7.5), 150 mmol·L⁻¹ NaCl。
- TEA: 每50 mL TEA中包含: 49.125 mL DEPC水, 650 μL三乙醇胺, 200 μL HCl, 200 μL乙酸酐(使用前添加)。
- TE缓冲液: 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na, pH8.0。
- TE蛋白酶: 每50 mL已预热至37°C的TE溶液中加入130 μL 50 mg·mL⁻¹蛋白酶。
- 洗涤缓冲液: 在1× TBS缓冲液中添加1% (w/v) BSA和0.3% (v/v) Triton X-100。

4 仪器设备

- PA石蜡切片机(LEICA, RM2255)。
- 烘片机(LEICA, HI1220)。
- 单面保安刀片(飞鹰牌, 98758915)。
- 摇床(SCIOLOGEX, SLK-O3000-S)。
- 真空泵(WELCH, MPC301Z)。
- 金属浴(Thermo Scientific, 88870005)。
- 培养箱(上海一恒科学仪器有限公司, PH-070A)。
- 超高分辨率激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM980 Airy-scan2)。

5 实验程序

5.1 实验流程

主要实验步骤包括: 根据小RNA序列设计与合成LNA探针并进行DIG标记; 植物材料的固定、包埋和切片; 探针杂交; 一抗孵育和洗脱; 二抗孵育和洗脱; 光谱拆分和激光共聚焦显微成像(图1)。

具体实验流程如下。

5.2 探针设计与抗体选择

针对要检测的成熟小RNA, 我们使用其成熟序列的

互补序列作为探针, 并对探针进行LNA修饰(由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成)。在探针的3'端加入DIG标记, 一抗选取山羊抗地高辛抗体, 二抗则选取偶联着激发波长647 nm荧光基团的二抗(驴抗山羊二抗, donkey anti-sheep IgG(H+L)AF647)。如果需要检测2个小RNA, 另一个小RNA的探针可以采用荧光素标记(如5-羧基荧光素和6-羧基荧光素)。由于荧光素信号在探针孵育时极易猝灭, 所以依然需要采用能结合荧光素的一抗以及与偶联着荧光基团的二抗进行免疫荧光反应。

5.3 样本固定

(1) 根据样本的类型和大小解剖样本并收集。注意: 选择适当的样本量使其能够完全接触溶液。

(2) 将每个组织样品分别放入20 mL玻璃瓶中。向瓶中加入1× PHEM缓冲液并浸没样品。

(3) 倒掉缓冲液, 加入4%多聚甲醛(在1× PHEM中制备)。注意: 缓冲液体积应至少为样品体积的15倍。多聚甲醛有毒, 需在通风橱中操作。

(4) 将盛放样本的玻璃瓶置于冰上, 开盖以0.08 MPa的压强抽真空30分钟。

(5) 重复步骤(4), 共进行抽真空3-4次, 直至样品沉

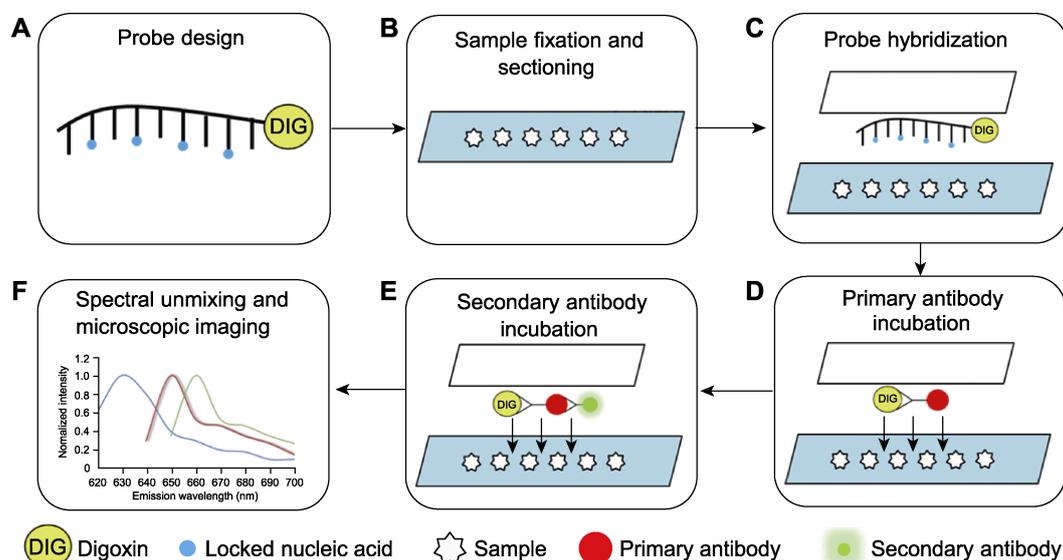


图1 小RNA荧光原位杂交实验流程图

(A) 探针设计; (B) 石蜡切片; (C) 探针杂交; (D) 一抗孵育; (E) 二抗孵育; (F) 光谱拆分以及激光共聚焦显微成像

Figure 1 Outlines of small RNA fluorescent *in situ* hybridization

(A) Probe design; (B) Paraffin sectioning; (C) Probe hybridization; (D) Primary antibody incubation; (E) Secondary antibody incubation; (F) Spectral unmixing and imaging by confocal microscope

底,然后将样品置于4°C冰箱中过夜。

5.4 石蜡包埋

固定完成后,可以根据提供的方法(Fischer et al., 2008)进行石蜡包埋。包埋后的样品可以在4°C冰箱保存6个月。

5.5 石蜡切片

(1) 利用刀片修剪掉包埋好蜡块上的多余蜡片,使样品每侧留出3—4 mm的石蜡,最后利用石蜡将修剪好的蜡块固定至1.5 mL离心管盖上。

(2) 利用石蜡切片机对样品进行连续切片,切片厚度为8 μm 。将切好的样品镜检后按顺序摆放至用DEPC水湿润好的载玻片上。

(3) 将载玻片放置在42°C烘片机上,烘片24小时。

(4) 将载玻片放入4°C冰箱中避光保存。

5.6 荧光原位杂交

注意:如无特殊说明,以下步骤均在室温下进行。

第1天: 样品制备和预杂交

准备2个装有二甲苯、不同浓度乙醇(100%、95%、80%、70%、50%、30%、10% (v/v))和0.2% (w/v)甘氨酸以及2个1× PBS溶液的染色缸。

(1) 将载玻片按照下列顺序浸入盛有不同溶液的染色缸中:二甲苯(10分钟)→二甲苯(10分钟)→无水乙醇(1分钟)→无水乙醇(1分钟)→95%乙醇(30秒)→80%乙醇(30秒)→70%乙醇(30秒)→50%乙醇(30秒)→30%乙醇(30秒)→10%乙醇(30秒)→1× PBS (2分钟)→1× PBS (2分钟)。该步骤使切片复水。

(2) 将载玻片在盛有TE蛋白酶溶液的染色缸中37°C孵育20分钟。注意:可以根据不同物种调整孵育时间和蛋白酶浓度。对于大多数样品,20分钟的孵育时间就足够了。

(3) 将载玻片转移至盛有0.2% (w/v)甘氨酸溶液的染色缸中,孵育20—30分钟。该步骤旨在消除背景自发荧光,可根据实验需要调整该步骤的时间长短。

(4) 将载玻片转入盛有1× PBS的染色缸中,冲洗载玻片,共冲洗2次,每次持续2分钟。在该步骤进行的过程中配制下一步所需的TEA。注意:植物样品往往具有很强的非特异性背景,TEA处理将减少探针的非特异性结合。TEA每次需用现配。

(5) 将用1× PBS清洗后的载玻片转移至盛有TEA溶液的染色缸中,在摇床上孵育10分钟,转速为每分钟25转。

(6) 再将载玻片转入盛有1× PBS的染色缸中,冲洗载玻片,共冲洗2次,每次持续2分钟。

(7) 将载玻片按照下列顺序浸入盛有不同溶液的染色缸中:DEPC水(1分钟)→10%乙醇(30秒)→30%乙醇(30秒)→50%乙醇(30秒)→70%乙醇(30秒)→80%乙醇(30秒)→95%乙醇(30秒)→无水乙醇(1分钟)→无水乙醇(1分钟)。脱水完毕后将载玻片浸入盛有无水乙醇的密闭容器中,于4°C冰箱存放2小时。

(8) 使用Zeiss980超高分辨率显微镜收集样品的自发荧光光谱,并选择适当光谱的荧光基团抗体作为二抗。

第2天: 探针杂交

开始之前,将金属浴加热块设置为92°C。

(9) 在室温下将载玻片放置在纸巾上风干约5分钟。

(10) 准备杂交混合液。对于每个盛有样品的载玻片,杂交混合液包含1 μL 探针,9 μL 甲酰胺和10 μL DEPC水。将混好的杂交液放置在金属浴上92°C加热3分钟。加热完毕后立即置于冰上冷却。注意:每个LNA探针的适宜浓度需要根据经验确定。我们通常以0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为起点,并根据实验需要进行调整。

(11) 向杂交混合液中加入80 μL 杂交缓冲液,轻轻吹打混匀,避免产生气泡。杂交溶液的总容积为每张载玻片100 μL 。

(12) 用移液枪将杂交溶液缓慢加到盖玻片上。并将杂交膜轻轻地放置于载玻片上,确保样品被杂交溶液均匀覆盖且无气泡产生。

(13) 将载玻片放在避光的湿盒中以保持湿度。如果具有不同探针杂交的样品,则需保证它们之间不相互接触,以避免探针混合。

(14) 将装有样品的湿盒放置在培养箱中杂交16—20小时。温度范围在42—60°C之间,大多数LNA探针最佳杂交温度为53°C。

第3天: 一抗孵育

(15) 准备封闭液和0.2× SSC溶液(一抗孵育当天配制)。将封闭缓冲液冷却至室温,并将0.2× SSC溶液加热至探针杂交时相同的温度。

(16) 将载玻片从湿盒中取出,小心地揭去杂交膜。

(17) 在与探针杂交相同的温度下,将载玻片浸入盛有0.2× SSC溶液的染色缸中洗涤2次,每次持续45

分钟。

(18) 将载玻片转移至盛有 $1\times$ PBS溶液的容器中洗涤载玻片, 持续5分钟。

(19) 将载玻片转移到干净的盛有封闭缓冲液的玻璃染缸中, 将容器放置在摇床上孵育45分钟, 转速为每分钟45转。

(20) 将载玻片转移至盛有洗涤缓冲液的平底容器中, 在摇床上以每分钟45转洗涤45分钟。

(21) 取出载玻片, 通过移液枪向载玻片缓慢加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释好的一抗。并将杂交膜小心地放置于载玻片上, 确保样品被一抗溶液均匀覆盖且无气泡产生。注意: 一抗溶液可在 $1:200$ – $1:1\ 000$ 范围内稀释。

(22) 将载玻片放在湿盒中以保持湿度, 并将湿盒放置在 4°C 冰箱中孵育过夜。

第4天: 二抗孵育

(23) 从湿盒中取出载玻片, 小心地揭开杂交膜。

(24) 将载玻片转入盛有洗涤缓冲液的平底容器中洗涤4次, 每次15分钟, 缓慢搅拌。每次清洗均需更换容器与洗涤缓冲液。

(25) 将载玻片转入盛有 $1\times$ TBS的染色缸中洗涤2分钟。

(26) 用移液枪向载玻片缓慢加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释好的二抗。并将杂交膜小心地置于载玻片上, 确保样品被二抗溶液均匀覆盖且无气泡产生。注意: 二抗溶液可在 $1:1\ 000$ – $1:5\ 000$ 范围内稀释。

(27) 将载玻片放在湿盒中以保持湿度, 并将湿盒置于 4°C 冰箱中孵育过夜。

第5天: 清洗与上机成像

(28) 从湿盒中取出载玻片, 小心地揭去杂交膜。

(29) 将载玻片转入盛有洗涤缓冲液的平底容器中, 在摇床上每分钟20转洗涤20分钟, 共3次, 每次清洗均需更换容器与溶液。

(30) 向载玻片上加入 $10\ \mu\text{L}$ SlowFade, 并缓慢盖上盖玻片。

(31) 用指甲油封住盖玻片与载玻片之间的缝隙。

(32) 利用超高分辨率激光共聚焦显微镜获得带有荧光标记的纯二抗的光谱, 作为对照用于后期样品的光谱线性拆分。建议使用2种浓度作为对照, 对于较高浓度的对照, 将 $1\ \mu\text{L}$ 二抗与1滴封固剂混合; 对于较低浓度的阳性对照, 首先使用 $1\times$ 洗涤缓冲液以 $1:1\ 000$ 的比例稀释二抗, 然后与1滴封固剂混合。如

果小RNA信号较弱, 建议使用较低浓度的二抗作为对照。成像结果可参考图2。

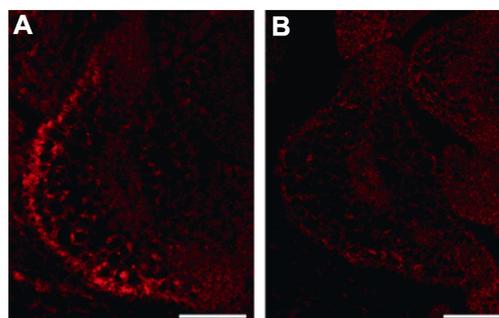


图2 小RNA FISH效果示例

(A) miR165/166反义寡核苷酸探针; (B) 阴性对照: miR165/166顺义寡核苷酸探针。Bars=50 μm

Figure 2 Schematic diagram of sRNA FISH

(A) Antisense probe of miR165/166; (B) Negative control: Sense probe of miR165/166. Bars=50 μm

5.7 双靶小RNA-FISH的替代步骤

如果需要检测2种小RNA, 可将上述相应步骤替换成以下步骤。

步骤(10): 分别准备2个探针的杂交混合液。每个探针的杂交混合液均包含 $1\ \mu\text{L}$ 探针, $9\ \mu\text{L}$ 甲酰胺和 $10\ \mu\text{L}$ 水。将混好的杂交液放置在金属浴上 92°C 加热3分钟。用石蜡密封管盖, 防止加热时盖子突然弹开。

步骤(11): 向2种杂交混合液中分别加入 $80\ \mu\text{L}$ 杂交缓冲液, 然后将2种杂交混合液混匀, 用移液枪缓慢地将 $200\ \mu\text{L}$ 混合液添加在载玻片上。

步骤(21): 使用移液枪向载玻片缓慢加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释好的一抗混合液。并将杂交膜小心地放置于载玻片上, 确保样品被一抗溶液均匀覆盖且无气泡产生。一抗混合液由2种一抗在 $1:200$ – $1:1\ 000$ 范围内等比例稀释而成。

步骤(26): 用移液枪向载玻片缓慢加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释好的二抗混合液。并将杂交膜小心地放置在载玻片上, 确保样品被二抗溶液均匀覆盖且无气泡产生。二抗混合液由2种二抗在 $1:1\ 000$ – $1:5\ 000$ 范围内等比例稀释而成。

6 注意事项

(1) 荧光基团的选择可根据实验所用植物组织的自发

荧光决定, 尽量选取与组织自发荧光激发波长相距较远的荧光基团偶联的二抗。

(2) 收集样品的自发荧光光谱时, 尽量选择与最后显微成像时相同时期和位置的植物材料进行自发荧光光谱收集, 以保证最后进行光谱拆分的准确性。

(3) 如果对照中含有非特异性信号, 可能是由于样品本身具有大量的自发荧光或者探针存在非特异性结合的情况。可尝试通过延长甘氨酸处理时间(5.6节步骤(3))以及更换探针的方式解决。

(4) 信号太弱可能是由于目标小RNA本身表达量低, 也可能是实验过程中探针与抗体浓度太低。建议尝试提高探针与抗体浓度以及延长抗体孵育时间, 或者尝试延长蛋白酶处理时间(5.6节步骤(2))。

(5) 组织外观变形可能是由于样品没有正确固定导致的, 可考虑在固定缓冲液中加入0.5%戊二醛。

(6) 背景过多。可能有多种因素导致背景过多(如洗涤不充分), 可考虑提高杂交温度, 或者增加探针杂交以及抗体孵育后的洗涤次数。

参考文献

- Baumberger N, Baulcombe DC** (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 11928–11933.
- Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK** (2014). *MicroRNA156*: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol* **164**, 1011–1027.
- Bleckmann A, Dresselhaus T** (2016). Fluorescent whole-mount RNA *in situ* hybridization (F-WISH) in plant germ cells and the fertilized ovule. *Methods* **98**, 66–73.
- Bruno L, Muto A, Spadafora ND, Iaria D, Chiappetta A, Van Lijsebettens M, Bitonti MB** (2011). Multi-probe *in situ* hybridization to whole mount *Arabidopsis* seedlings. *Int J Dev Biol* **55**, 197–203.
- Bruno L, Ronchini M, Gagliardi O, Corinti T, Chiappetta A, Gerola P, Bitonti MB** (2015). Analysis of *ATGUS1* and *ATGUS2* in *Arabidopsis* root apex by a highly sensitive TSA-MISH method. *Int J Dev Biol* **59**, 221–228.
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J** (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J* **53**, 739–749.
- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN** (2010). Cell signaling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**, 316–321.
- Chen XM** (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* **303**, 2022–2025.
- Chen XM** (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 21–44.
- Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MC** (2008). Pattern formation in leaves via small RNA mobility. *Dev Biol* **319**, 587–588.
- Chitwood DH, Nogueira FTS, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MCP** (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Gene Dev* **23**, 549–554.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R** (2008). Paraffin embedding tissue samples for sectioning. *CSH Protoc* **2008**, pdb.prot4989.
- Himanen K, Woloszynska M, Boccardi TM, De Groeve S, Nelissen H, Bruno L, Vuylsteke M, Van Lijsebettens M** (2012). Histone H2b monoubiquitination is required to reach maximal transcript levels of circadian clock genes in *Arabidopsis*. *Plant J* **72**, 249–260.
- Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, Kasschau KD, Carrington JC** (2007). Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926–942.
- Huang K, Baldrich P, Meyers BC, Caplan JL** (2019). srRNA-FISH: versatile fluorescent *in situ* detection of small RNAs in plants. *Plant J* **98**, 359–369.
- Huen AK, Rodriguez-Medina C, Ho AYY, Atkins CA, Smith PMC** (2017). Long-distance movement of phosphate starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Biol* **19**, 643–649.
- Javelle M, Timmermans MCP** (2012). *In situ* localization of small RNAs in plants by using LNA probes. *Nat Protoc* **7**, 533–541.
- Jiang JM** (2019). Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Res* **27**, 153–165.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 19–53.

- Jung JH, Park CM** (2007). *MIR166/165* genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 1327–1338.
- Kidner C, Timmermans M** (2006). *In situ* hybridization as a tool to study the role of microRNAs in plant development. *Methods Mol Biol* **342**, 159–179.
- Kim VN, Han JJ, Siomi MC** (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 126–139.
- Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T** (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev Cell* **24**, 125–132.
- Kurihara Y, Watanabe Y** (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 12753–12758.
- Lamb JC, Danilova T, Bauer MJ, Meyer JM, Holland JJ, Jensen MD, Birchler JA** (2007). Single-gene detection and karyotyping using small-target fluorescence *in situ* hybridization on maize somatic chromosomes. *Genetics* **175**, 1047–1058.
- Lee Y, Kim M, Han JJ, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN** (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051–4060.
- Levsky JM, Singer RH** (2003). Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* **116**, 2833–2838.
- Li JJ, Yang ZY, Yu B, Liu J, Chen XM** (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **15**, 1501–1507.
- Li S, Wang XT, Xu WY, Liu T, Cai CM, Chen LY, Clark CB, Ma JX** (2021). Unidirectional movement of small RNAs from shoots to roots in interspecific heterografts. *Nat Plants* **7**, 50–59.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ** (2008). Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling. *Plant Physiol* **147**, 732–746.
- Liu QL, Yao XZ, Pi LM, Wang H, Cui XF, Huang H** (2009). The *ARGONAUTE10* gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**, 27–40.
- Lu J, Tsourkas A** (2009). Imaging individual microRNAs in single mammalian cells *in situ*. *Nucleic Acids Res* **37**, e100.
- Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O** (2007). Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* **13**, 1268–1278.
- Nodine MD, Bartel DP** (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Gene Dev* **24**, 2678–2692.
- Nogueira FTS, Chitwood DH, Madi S, Ohtsu K, Schnable PS, Scanlon MJ, Timmermans MCP** (2009). Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet* **5**, e1000320.
- Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP** (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Gene Dev* **21**, 750–755.
- Ori N, Cohen AR, Etzioni A, Brand A, Yanai O, Shleizer S, Menda N, Amsellem Z, Efroni I, Pekker I, Alvarez JP, Blum E, Zamir D, Eshed Y** (2007). Regulation of *LAN-CEOLATE* by *miR319* is required for compound-leaf development in tomato. *Nat Genet* **39**, 787–791.
- Pagliarani C, Gambino G** (2019). Small RNA mobility: spread of RNA silencing effectors and its effect on developmental processes and stress adaptation in plants. *Int J Mol Sci* **20**, 4306.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR** (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* **53**, 731–738.
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible WR** (2009). Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol* **150**, 1541–1555.
- Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O** (2004). *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Gene Dev* **18**, 2237–2242.
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 3691–3696.
- Raman S, Greb T, Peaucelle A, Blein T, Laufs P, Theres K** (2008). Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**, 65–76.
- Rozier F, Mirabet V, Vernoux T, Das P** (2014). Analysis of

- 3D gene expression patterns in plants using whole-mount RNA *in situ* hybridization. *Nat Protoc* **9**, 2464–2475.
- Skopelitis DS, Hill K, Klesen S, Marco CF, von Born P, Chitwood DH, Timmermans MCP** (2018). Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals. *Nat Commun* **9**, 3107.
- Tirichine L, Andrey P, Biot E, Maurin Y, Gaudin V** (2009). 3D fluorescent *in situ* hybridization using *Arabidopsis* leaf cryosections and isolated nuclei. *Plant Methods* **5**, 11.
- Vaucheret H, Vazquez F, Cr  t   P, Bartel DP** (2004). The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Gene Dev* **18**, 1187–1197.
- Wollmann H, Mica E, Todesco M, Long JA, Weigel D** (2010). On reconciling the interactions between *APETA-LA2*, miR172 and *AGAMOUS* with the ABC model of flower development. *Development* **137**, 3633–3642.
- Woloszynska M, Le Gall S, Neyt P, Boccardi TM, Grasser M, L  ngst G, Aesaert S, Coussens G, Dhondt S, Van De Slijke E, Bruno L, Fung-Uceda J, Mas P, Van Montagu M, Inz   D, Himanen K, De Jaeger G, Grasser KD, Van Lijsebettens M** (2019). Histone 2B monoubiquitination complex integrates transcript elongation with RNA processing at circadian clock and flowering regulators. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 8060–8069.
- Xue ZH, Liu LY, Zhang C** (2020). Regulation of shoot apical meristem and axillary meristem development in plants. *Int J Mol Sci* **21**, 2917.
- Yang WB, Schuster C, Prunet N, Dong QK, Landrein B, Wightman R, Meyerowitz EM** (2020). Visualization of protein coding, long noncoding, and nuclear RNAs by fluorescence *in situ* hybridization in sections of shoot apical meristems and developing flowers. *Plant Physiol* **182**, 147–158.
- Yang WB, Wightman R, Meyerowitz EM** (2017). Cell cycle control by nuclear sequestration of *CDC20* and *CDH1* mRNA in plant stem cells. *Mol Cell* **68**, 1108–1119.
- Yu Y, Zhang YC, Chen XM, Chen YQ** (2019). Plant non-coding RNAs: hidden players in development and stress responses. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**, 407–431.
- Zhang C, Fan LS, Le BH, Ye PY, Mo BX, Chen XM** (2020). Regulation of *ARGONAUTE10* expression enables temporal and spatial precision in axillary meristem initiation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **55**, 603–616.
- Zhang C, Wang J, Wenkel S, Chandler JW, Werr W, Jiao YL** (2018). Spatiotemporal control of axillary meristem formation by interacting transcriptional regulators. *Development* **145**, dev158352.

Protocols for Small RNA FISH in Plants

Binbin Hu^{1,2}, Zhihui Xue¹, Cui Zhang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Small RNAs are a type of small nucleotide molecules that are essential for plant growth and development, playing a key role in variety of life processes and in response to stresses. Research on the location of small RNAs could discover their functions in plants. Small RNA FISH is a qualitative or semi-quantitative analysis of small RNA in organisms by fluorescence detection technology. At present, this technology has been widely used in animals, but it is still less applied in plants. This article introduces the specific operation procedures and attentions based on ultra-high resolution microscopy that combines locked nucleic acid (LNA) probe *in situ* hybridization with immunofluorescence. This protocol can be used to detect the expression and localization of small RNA in plant tissues.

Key words fluorescent *in situ* hybridization, small RNA, plants

Hu BB, Xue ZH, Zhang C (2021). Protocols for small RNA FISH in plants. *Chin Bull Bot* **56**, 330–338.

* Author for correspondence. E-mail: cuizhang@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)