



昆虫小器官 RNA 荧光原位杂交技术*

陈 敏** 唐文倩 沈 杰 王 丹***

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100193)

摘 要 【目的】在昆虫基因表达和功能研究中, RNA 原位杂交技术越来越受到青睐。该技术不仅能定性定量反应基因表达的时空特异性, 而且能在细胞水平上检测基因表达的调控模式。为了将该技术更好地在昆虫小器官研究中运用, 我们以果蝇幼虫翅芽为例优化了该技术。【方法】解剖果蝇 3 龄幼虫翅芽进行原位杂交实验。【结果】我们发现影响原位杂交结果的因素十分复杂, 包括取材时期, 探针的合成, 预杂交/杂交的时间和温度, 清洗时间, 适当的对照等。通过 RNA 荧光原位杂交实验, 我们揭示了调控细胞记忆的 *trithorax* 基因在 3 龄翅芽广泛表达, 并且受到转录因子 *Optomotor-blind* 的负调控。【结论】这一技术方法为研究昆虫小器官的基因表达和调控提供了便捷手段。

关键词 翅芽, RNA 原位杂交, 基因表达与调控, *trithorax*, *optomotor-blind*

In situ fluorescent RNA hybridization in insect small organs

CHEN Min** TANG Wen-Qian SHEN Jie WANG Dan***

(Department of Entomology, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract 【Objectives】RNA *in situ* hybridization is a popular technique for analyzing the expression and function of insect genes. This technique provides both qualitative and quantitative data on not only the spatio-temporal expression patterns of genes, but also on their cellular regulation. To optimize this technique, we performed RNA *in situ* fluorescent hybridization assays using the *Drosophila* larval wing disc as a representative insect small organ. 【Methods】Wing discs of 3rd instar *Drosophila* larvae were dissected and used in RNA *in situ* hybridization. 【Results】Many factors can influence the results of *in situ* hybridization, including the developmental stage of insect organs, probes, time and temperature of pre-hybridization and hybridization, washing time, and proper controls. We found that the cell memory gene *trithorax* is ubiquitously expressed in the wing disc and negatively regulated by the transcription factor *Optomotor-blind*. 【Conclusion】*In situ* RNA hybridization is a convenient tool for revealing the expression patterns and regulation of genes in small organs of insects.

Key words wing disc, RNA *in situ* hybridization, gene expression and regulation, *trithorax*, *optomotor-blind*

RNA 原位杂交 (RNA *in situ* hybridization) 是根据核酸分子碱基互补配对原则, 将同位素或非同位素标记的单链反义 RNA 探针同组织或细胞内的靶标 RNA 杂交, 将 RNA 探针定位到待测基因表达区域, 经免疫显色反应对待测基因进行定性、定位和相对定量分析的分子技术。RNA 原位杂交可以将特定核酸定位在固定组织、细胞

或循环肿瘤细胞, 使基因的表达模式变得可视化、形象化。传统的半定量 PCR (Semi-quantitative real-time PCR) 和荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR) 只能单一地检测基因的表达水平, 而原位杂交可以同时时间和空间上检测基因的表达水平。另外, RNA 原位杂交技术与免疫组织化学 (Immunohistochemistry) 相结合,

*资助项目 Supported projects: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2016QC079, 2013XJ011)

**第一作者 First author, E-mail: chenmin1203@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dwang@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-03-19, 接受日期 Accepted: 2016-08-11

使之成为一种广泛的、有效的、直观的核酸分子荧光标记技术。

随着昆虫学研究的蓬勃发展,原位杂交技术被广泛运用到多种昆虫的基因表达和功能研究中。如在鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 中, Yoshido 等(2005a)用荧光原位杂交的方法鉴定了家蚕的所有染色体;Sato 等(2008)发现家蚕 *Bmfng* 基因和 *wingless* 同源基因 *BmWnt-1* 都在翅芽中表达,提示二者在翅形态建成中具有重要作用;Sakurai 等(2004)还用双色荧光原位杂交同时标记了家蚕 *BmOR-1* 和 *PBP* 基因。在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中原位杂交技术成功标记了微小 RNA,发现 *miR-1174* 和 *miR-1175* 在雌蚊中肠中高表达,暗示可能调控与血液消化相关的中肠功能(Liu *et al.*, 2014)。此外,该技术还用于鉴定古毒蛾 *Orgyia antiqua* W-Z 型性染色体的构成(Yoshido *et al.*, 2005b)。原位杂交技术为我们认识昆虫、利用昆虫更好地为人类服务奠定了坚实的基础。

但是,由于昆虫种类繁多,个体大小和发育过程差异很大,RNA 原位杂交技术细节有很大不同,杂交结果常常不理想。果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 作为模式生物之一,其翅芽是一个研究多种生物学机理的热点模型(刘素宁和沈杰,2011;刘素宁等,2013)。果蝇幼虫翅芽是只有两层细胞组成的囊状结构,结构相对简单,易于各种实验分析,如原位杂交(Klebes *et al.*, 2005)、转基因技术(Brand and Perrimon, 1993)、BrdU 染色标记细胞增殖(Zhang *et al.*, 2013;张徐波和沈杰,2013)、抗体染色标记基因表达量(Sui *et al.*, 2012;Shen *et al.*, 2014;Wang *et al.*, 2016)、活体成像(Aldaz *et al.*, 2010)、3D 细胞形貌重建(Rykowski, 1991)等。其中许多方法在其他昆虫的研究中得以借鉴,例如转基因技术在家蚕、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和埃及伊蚊都得到成功运用(Imamura *et al.*, 2003;Schinko *et al.*, 2010;Kobayashi *et al.*, 2011;Kokoza and Raikhel, 2011),对昆虫功能基因的研究起到巨大的帮助。

本文以 *trithorax* (*trx*)——细胞记忆模块的调控组分之一(Maurange and Paro, 2002;Klebes *et al.*, 2005)为例,详细介绍了在果蝇翅芽上进行 RNA 原位杂交实验的过程和关键注意事项,揭示了 *trx* 基因在果蝇翅芽上的表达模式,并发现它受到转录因子 Optomotor-blind 的负调控,提示 *trx* 对翅芽的发育起重要作用。该技术将为研究果蝇和其他昆虫小器官的基因表达与调控模式提供有益借鉴,有助于推动昆虫功能基因研究的发展。

1 实验材料

1.1 实验昆虫

果蝇 3 龄幼虫,基因型分别为:野生型(wt),在翅芽前后隔间边界敲减 *trx* 的转基因果蝇(*dpp-Gal4>UAS-trxRNAi*),*omb* 完全缺失突变体(*omb^{D4}*)。

1.2 实验试剂

4%甲醛溶液:用 PBS 稀释甲醛溶液至 4%,现配现用。

蛋白酶 K 溶液:用 0.1% PBT 稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$, -20°C 储存,实验前置于冰上待用。

甘氨酸:2 mg/mL , 4°C 储存。

20×SSC 缓冲液:3 mol/L NaCl 和 0.3 mol/L 柠檬酸钠溶于 800 mL 水中,加入数滴 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.0,加水定容至 1 L,高压灭菌。

预杂交液:5×SSC, 50% formamide, 0.3% Triton-X100, -20°C 储存。

杂交液:5×SSC, 50% formamide, 0.3% Triton-X100, 100 $\mu\text{g/mL}$ ssDNA, 50 $\mu\text{g/mL}$ heparin, 约 200 ng/mL (浓度取决于探针的序列和质量) RNA 探针, -20°C 储存。

地高辛(Digoxin) RNA 标记试剂盒(SP6/T7):DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Roche 11175025910。

荧光 Cy5 标记的小鼠抗地高辛单克隆抗体:1:100 稀释(Jackson 200-172-156)。

2 实验方法

2.1 探针的制作

提取野生型果蝇 3 龄幼虫的总 RNA, 反转录得到 cDNA, -20°C 保存备用。

设计如下引物, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增 300 bp *trx* 基因片段。

*trx*F 5' CTCGGTCACTCAATCGTCA 3'

*trx*R 5' CCCATTAGCGTGGTATCCT 3'

选用 PCR 产物上没有的限制性内切酶位点 *Nco*I, 将 *trx* 基因片段连接到 pGM-T 载体 (天根), 转化大肠杆菌, 根据菌液测序结果确定基因片段插入方向。本实验的基因片段插入方向为 T7-SP6。

模板 DNA 制备。提取质粒, 根据基因片段插入方向, 用 *Nco*I 限制性内切酶切开 T7 端, 使质粒彻底线性化, 然后切胶回收线性 DNA 片段, 用 DEPC 水溶解, -20°C 保存备用。

SP6 RNA 聚合酶催化单链 RNA 探针合成。在 1.5 mL 离心管中配置以下反应液: SP6 RNA polymerase 1 μL , template DNA 50~500 ng, DTT (50 mmol/L) 2 μL , NTP Mixture (DIG) 2 μL , 10 $\times$ SP6 buffer 2 μL , 加 DEPC 水补到 20 μL 。

将装有反应液的离心管置于水浴锅中 37°C 过夜, 然后加入 20 μL 预杂交液终止反应, 取 2 μL 溶液测 RNA 浓度, 其余放在 -20°C 保存备用。

2.2 预杂交

在显微镜下用翻手套的方式解剖果蝇 3 龄幼虫, 去掉肠子、脂肪体等杂物, 保留翅芽和头部于 0.5 mL 离心管中, 在 4% 的甲醛溶液中固定 20 min。

先用 PBT 清洗 3 遍, 再放在摇床上洗 30 min。

吸出 PBT, 加入 100 μL 蛋白酶 K 于 25°C 下孵育 2 min, 然后迅速吸出蛋白酶 K, 加入 100 μL 甘氨酸, 2 min 后吸出。

用 PBT 洗 3 遍, 然后加入 4% 的甲醛溶液再次固定 20 min。

用 PBT 清洗 3 遍, 再放在摇床上洗 30 min。

用预杂交液逐步取代 PBT, 先按 1:1 加入

预杂交液和 PBT, 5 min 后吸出原有溶液, 加入预杂交液 200~400 μL , 放在 55°C 下摇床上慢慢摇动 1 h 以上。

2.3 杂交

将探针在 80°C 金属浴中孵育 5 min, 然后立即置于冰上。吸出预杂交液, 加入 200~400 μL 杂交液 (含探针), 55°C 摇床上过夜 (可以根据实验效果增加杂交时间)。

吸出杂交液并保存, 杂交液可以多次重复使用。加入 200~400 μL 预杂交液, 55°C 条件下, 摇床上摇动约 3 h。

吸出预杂交液, 用 PBT 洗 3 遍, 在摇床上摇 30 min。

加入 anti-Digoxin, 室温下摇床上染色 1 h, 避光。然后用 PBT 洗 3 遍, 在摇床上摇 1 h, 避光。

2.4 封片观察

载玻片上进行两次解剖, 保留翅芽, 滴一滴 50% 甘油, 盖盖玻片, 封片。

AMG EVOS fl 荧光显微镜下观察拍照。

3 结果与分析

为了研究细胞记忆基因对翅芽发育的作用, 我们根据上述优化步骤进行了 RNA 荧光原位杂交实验, 检测 *trx* 基因的表达特征。结果显示 *trx* 在整个野生型翅芽上都有表达, 其中在翅囊区的表达相对较高, 而在背板区表达微弱 (图 1:A), 推测 *trx* 可能对翅囊区的发育起重要作用。为了验证杂交结果的特异性, 我们同时做了 anti-sense 探针的阴性对照, 结果显示反义链没有明显杂交信号 (图 1:B)。

为了进一步验证该方法检测 *trx* 表达的灵敏性, 我们用 GAL4-UAS 系统在果蝇翅芽前后隔间边界 *dpp* 条带区域 (*dpp-Gal4* 表达区域) 抑制了 *trx* 基因 (*dpp-Gal4>UAS-trxRNAi*), 发现该技术能够直观地显示 *trx* 表达受到明显抑制 (图 1:C 虚线内区域), 而在抑制区域外 *trx* 的表达正常。综上结果, 我们优化的方法能够有效地展示 *trx* 在果蝇翅芽上的表达模式。

为了研究翅芽生长发育过程中重要的转录因子 Optomotor-blind (Omb) 是否通过转录记忆模块实现功能, 我们通过 RNA 原位杂交荧光标记技术, 检测了 Omb 是否调控 *trx* 的表达。在相同染色过程和图片拍摄条件下, 与图 1 (A) 相比, 当 *omb* 基因功能缺失时 (*omb^{D4}* 突变型), *trx* 在翅囊区的 RNA 原位杂交强度明显增强, 说明该基因的表达量明显上升 (图 1: D)。这一结果表明, *trx* 受到 *omb* 负调控, 暗示 *omb* 调控的翅芽发育有可能部分是通过细胞记忆基因 *trx* 介导的。这一线索为后续发育调控机理提供了研

究方向。综上所述, 我们优化的 RNA 荧光原位杂交方法有效地揭示了 *trx* 在整个果蝇翅芽上的表达模式, 并发现了 *omb* 负调控 *trx* 的表达这一基因表达调控途径。

4 讨论

本文通过一种优化的昆虫小器官 RNA 荧光原位杂交标记技术, 得到了 *trx* 在翅芽上的表达模式, 进行了准确性和灵敏性验证, 并发现了 *omb* 对 *trx* 的负调控作用。本实验成功的关键在于以下几点。第一, 单链 RNA 探针的合成。为

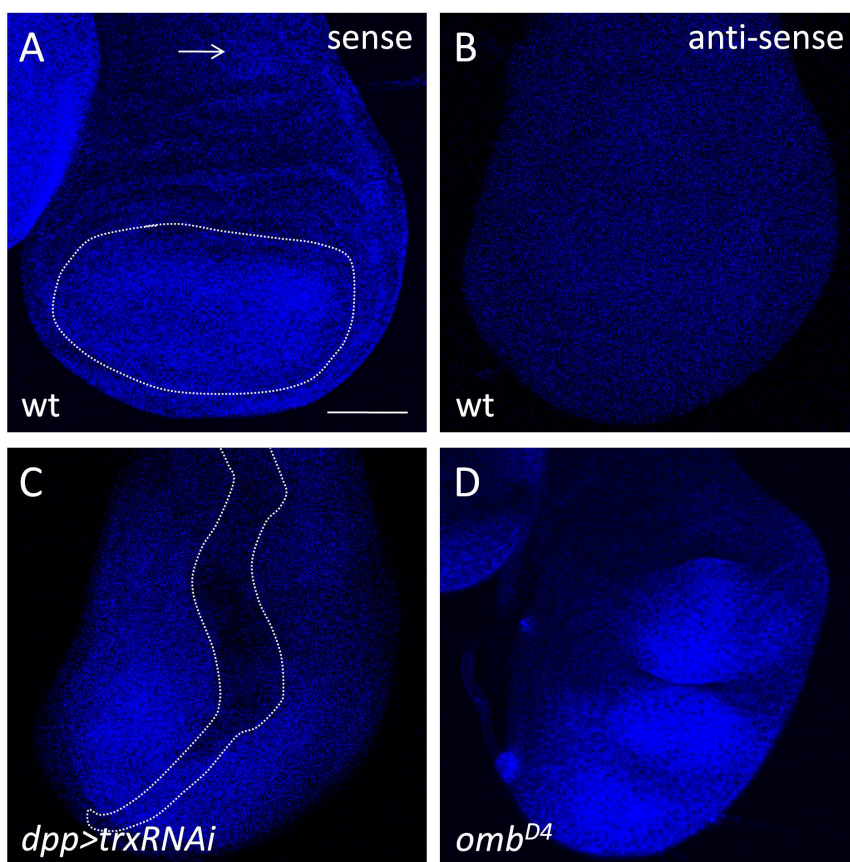


图 1 RNA 荧光原位杂交技术检测果蝇翅芽上 *trx* 基因的表达模式

Fig. 1 Fluorescent RNA *in situ* hybridization to detect *trx* expression pattern in the *Drosophila* wing disc

A. 用正义链做探针杂交, *trx* 主要在野生型 (wt) 翅芽翅囊区表达 (虚线内区域), 在背板区有微弱表达 (箭头); B. 用反义链做对照探针杂交, 没有检测到信号; C. 在前后隔间边界 *dpp* 条带 (*dpp-Gal4* 表达区域, 即虚线内区域) 表达 *UAS-trxRNAi* 来抑制 *trx* 的表达, *trx* RNA 原位杂交的荧光信号明显降低; D. 在 *omb^{D4}* 缺失突变体中, *trx* 原位杂交的荧光信号在翅囊中间区域明显升高。比例尺=50 μm 。

A. *trx* is mainly expressed in the wing pouch (dotted lines) and has weak expression in the notum region (arrow) in the wild-type wing disc using the sense probe; B. No signals are detected using the anti-sense probe; C. *trx* is suppressed in the *dpp* stripe of the *Drosophila* wing disc by expressing *UAS-trxRNAi* in the *dpp-Gal4* domain; D. Fluorescent signal of *trx* RNA *in situ* hybridization is apparently up-regulated in the medial wing pouch of *omb^{D4}* null mutants. Scale bar=50 μm .

为了避免检测 mRNA 时基因组序列的干扰, 探针应至少跨一个内含子区; 长度通常 100~300 bp, 过长不易穿透组织, 杂交效率减低, 过短特异性低。第二, 预杂交步骤很重要, 能有效减低背景色, 提高杂交效率。第三, 杂交过程中探针浓度不宜过高, 一般为 20~200 ng/mL, 并可重复使用。如信号较弱, 可延长杂交时间至 2 日或更长时间, 并轻轻摇动, 使杂交过程充分进行; 同时, 延长预杂交液清洗的时间, 以消除背景色。不同种类的昆虫原位杂交实验, 杂交和清洗时间各有差异, 控制好是成功的关键(Sakurai *et al.*, 2004; Klebes *et al.*, 2005; Yoshido *et al.*, 2005a, 2005b; Sato *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014)。另外, 由于 RNA 原位杂交实验周期比较长, 操作繁琐, 可能会造成实验结果不清晰或者假阳性, 需要多次重复实验, 并设计多组对照实验进行验证。我们除了设计反向探针做对照, 还与文献结果进行了比较。Mohan 等(2011)曾经制备过 Trx 抗体, 进行过果蝇翅芽前区的 Trx 抗体免疫染色, 通过与文献结果比较, 确认 Trx 在翅芽整个前区都有表达。虽然文献中没有展示翅芽后区 Trx 抗体染色情况, 但是我们的实验结果在翅芽前区与文献中的结果完全一致。Sedkov 等(1999)做了 *trx* 家族成员 *trithorax related* (*trr*) 基因的原位杂交实验, 结果显示 *trr* 在整个果蝇翅芽表达, 这与我们揭示的 *trx* 表达模式也一致。

目前对 *trx* 在翅发育中的功能研究还很有限。前人发现 *trx* 可以调控果蝇翅芽后区发育的选择者基因 *engrailed* (*en*) 的表达(Breen *et al.*, 1995), 同时抗体染色(Mohan *et al.*, 2011) 和原位杂交实验(图 1) 显示 *trx* 在翅芽中广泛表达, 并且受 Omb 负调控(图 1), 这些都提示 *trx* 对翅芽的发育起着重要作用。Omb 是人类 T-box 转录因子家族的同源基因, 是 Decapentaplegic (Dpp) 信号通路的靶标之一(Sivasankaran *et al.*, 2000), 在果蝇翅芽的发育过程中起着非常重要的作用, 调控翅芽的生长和形貌发生(Shen *et al.*, 2008; Umemori *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013)。作为转录因子, Omb 调控许多

控制翅芽发育基因的表达。不同于其他转录因子的是, 除了促进 *spalt* (*sal*) 和 *vestigial* (*vg*) 转录, Omb 还能抑制 Dpp 受体 *thickveins* (*tkv*) 和 *master of thickveins* (*mtv*) 基因表达(del Alamo Rodriguez *et al.*, 2004)。因此, Omb 具有双重功能, 既是转录激活因子, 又可以作为转录抑制因子。Omb 负调控 *trx* 的表达是直接还是间接的, 调控机制是什么, *trx* 在翅发育中有什么作用, 这些问题仍然值得我们系统深入地研究。

参考文献 (References)

- Aldaz S, Escudero LM, Freeman M, 2010. Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32): 14217–14222.
- Brand AH, Perrimon N, 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2): 401–415.
- Breen TR, Chinwalla V, Harte PJ, 1995. Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells. *Mechanisms of Development*, 52(1): 89–98.
- del Alamo Rodriguez D, Terriente Felix J, Diaz-Benjumea FJ, 2004. The role of the T-box gene optomotor-blind in patterning the *Drosophila* wing. *Developmental Biology*, 268(2): 481–492.
- Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T, Tamura T, 2003. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 165(3): 1329–1340.
- Klebes A, Sustar A, Kechris K, Li H, Schubiger G, Kornberg TB, 2005. Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development*, 132(16): 3753–3765.
- Kobayashi I, Kojima K, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T, Tatematsu K, Yonemura N, Tanaka H, Yamakawa M, Ogura E, Kamachi Y, Tamura T, 2011. An efficient binary system for gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*, using GAL4 variants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(4): 195–210.
- Kokoza VA, Raikhel AS, 2011. Targeted gene expression in the transgenic *Aedes aegypti* using the binary Gal4-UAS system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8): 637–644.
- Liu SN, Shen J, 2011. Progress in research on functional genes in the *Drosophila* genome. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1559–1572. [刘素宁, 沈杰, 2011. 果蝇基因组与功能基因研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1559–1572.]
- Liu SN, Wang D, Shen J, 2013. The research progress of

- morphogen-regulated cell morphogenesis during *Drosophila* wing disc development. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1489–1498. [刘素宁, 王丹, 沈杰, 2013. 器官成形素调控果蝇翅芽细胞形貌的研究进展. 应用昆虫学报, 50(6): 1489–1498.]
- Liu S, Lucas KJ, Roy S, Ha J, Raikhel AS, 2014. Mosquito-specific microRNA-1174 targets serine hydroxymethyltransferase to control key functions in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40): 14460–14465.
- Maurange C, Paro R, 2002. A cellular memory module conveys epigenetic inheritance of hedgehog expression during *Drosophila* wing imaginal disc development. *Genes & Development*, 16(20): 2672–2683.
- Mohan M, Herz HM, Smith ER, Zhang Y, Jackson J, Washburn MP, Florens L, Eissenberg JC, Shilatifard A, 2011. The COMPASS family of H3K4 methylases in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 31(21): 4310–4318.
- Rykowski MC, 1991. Optical sectioning and three-dimensional reconstruction of diploid and polytene nuclei. *Methods in Cell Biology*, 35: 253–286.
- Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47): 16653–16658.
- Sato K, Matsunaga TM, Futahashi R, Kojima T, Mita K, Banno Y, Fujiwara H, 2008. Positional cloning of a *Bombyx* wingless locus flugellos (fl) reveals a crucial role for fringe that is specific for wing morphogenesis. *Genetics*, 179(2): 875–885.
- Schinko JB, Weber M, Viktorinova I, Kiupakis A, Averof M, Klingler M, Wimmer EA, Bucher G, 2010. Functionality of the GAL4/UAS system in *Tribolium* requires the use of endogenous core promoters. *BMC Developmental Biology*, 10: 53.
- Sedkov Y, Benes JJ, Berger JR, Riker KM, Tillib S, Jones RS, Mazo A, 1999. Molecular genetic analysis of the *Drosophila* trithorax-related gene which encodes a novel SET domain protein. *Mechanisms of Development*, 82(1/2): 171–179.
- Shen J, Dorner C, Bahlo A, Pflugfelder GO, 2008. optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, 125(3/4): 233–246.
- Shen J, Lu J, Sui L, Wang D, Yin M, Hoffmann I, Legler A, Pflugfelder GO, 2014. The orthologous Tbx transcription factors Omb and TBX2 induce epithelial cell migration and extrusion in vivo without involvement of matrix metalloproteinases. *Oncotarget*, 5(23): 11998–2015.
- Sivasankaran R, Vigano MA, Muller B, Affolter M, Basler K, 2000. Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *The EMBO Journal*, 19(22): 6162–6172.
- Sui L, Pflugfelder GO, Shen J, 2012. The Dorsocross T-box transcription factors promote tissue morphogenesis in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*, 139(15): 2773–2782.
- Umemori M, Takemura M, Maeda K, Ohba K, Adachi-Yamada T, 2007. *Drosophila* T-box transcription factor Optomotor-blind prevents pathological folding and local overgrowth in wing epithelium through confining Hh signal. *Developmental Biology*, 308(1): 68–81.
- Wang D, Li L, Lu J, Liu S, Shen J, 2016. Complementary expression of optomotor-blind and the Iroquois complex promotes fold formation to separate wing notum and hinge territories. *Developmental Biology*, 416(1): 225–234.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K, 2005a. The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics*, 170(2): 675–685.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K, 2005b. Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)(n) telomeric probe in some species of *Lepidoptera*. *Chromosoma*, 114(3): 193–202.
- Zhang X, Luo D, Pflugfelder GO, Shen J, 2013. Dpp signaling inhibits proliferation in the *Drosophila* wing by Omb-dependent regional control of bantam. *Development*, 140(14): 2917–2922.
- Zhang XB, Shen J, 2013. Revealing the proliferation rate in insect organs by BrdU antibody staining. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1474–1478. [张徐波, 沈杰, 2013. BrdU 抗体染色技术检测昆虫器官的细胞增殖. 应用昆虫学报, 50(5): 1474–1478.]