果蝇组织免疫组织化学

Immunohistochemistry of *Drosophila* Tissues

吴铮¹, 刘冀珑^{1,2,*}

¹生命科学与技术学院, 上海科技大学, 上海, 中国; ²生理学、解剖学和遗传学系, 医学部, 牛津大学, 牛津, 英国

*通讯作者邮箱: liujl3@shanghaitech.edu.cn; jilong.liu@dpag.ox.ac.uk

引用格式: 吴铮, 刘冀珑. (2019). 果蝇组织免疫组织化学. *Bio-101* e1010256. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010256.

How to cite: Wu, Z. and Liu, J. L. (2019). Immunohistochemistry of *Drosophila* tissues. *Bio-101* e1010256. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010256. (in Chinese)

摘要: 免疫组织化学用于研究组织中蛋白质的定位。通过带有显色剂或荧光标记的抗体对抗原的特异性结合, 可以实现组织中蛋白质的可视化, 从而对组织和细胞中的蛋白质进行定性, 定位, 定量等分析。免疫组化通常分为一步法和两步法。在一步法中, 特异性抗体上直接带有显色剂或荧光基团。在更广泛使用的二步法中, 被固定和通透化的组织首先与一抗混合。在一抗特异性结合目标蛋白后, 加入带有显色剂或荧光基团的二抗特异性结合一抗, 使目标蛋白可以在显微镜下被观察到。本方案以果蝇卵巢为例, 结合绿色荧光蛋白对两种蛋白同时进行免疫荧光染色, 用聚光扫描共聚焦显微镜同时进行四通道扫描, 从而达到对三种蛋白以及 DNA 在细胞中的分布进行同步分析。

关键词: 果蝇, 免疫组化, 免疫荧光

材料与试剂

1. 培养皿
2. 载玻片
3. 盖玻片
4. 雌性果蝇成虫
5. Grace's Insect Medium
6. 4%多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)
7. PBS (10×) (Beyotime, ST476)

8. Triton™ X-100
9. 马血清
10. 一抗 (特异性结合目标蛋白)
 - 1) 兔抗 c-Myc
 - 2) 山羊抗 CTP 合成酶 (CTP synthase, CTPS)
11. 二抗 (带有荧光基团, 特异性结合一抗)
 - 1) Texas Red 狗抗山羊 IgG
 - 2) Cy5 狗抗兔 IgG
12. DNA 荧光染料: Hoechst 33342
13. 凡士林
14. 指甲油
15. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)
16. PST (1×) (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子
2. 解剖显微镜 (OLYMPUS SZ61)
3. 移液器
4. 激光扫描共聚焦荧光显微镜 (Leica SP5II 或者 SP8)
5. 果蝇二氧化碳麻醉工作站

实验步骤

一、组织解剖和固定

1. 在饲养果蝇的容器中通入二氧化碳使果蝇麻醉, 将果蝇倒出, 置于表面通有二氧化碳的垫板上, 挑选雌性果蝇。
2. 在培养皿中倒入 Grace's Insect Medium, 将果蝇置于液体中。用镊子轻轻固定住果蝇腹部的前部, 用另一把镊子夹住果蝇腹部的倒数第二个体节, 并将这部分从果蝇身体上扯下, 卵巢会被一起扯出 (图 1)。尽快将卵巢转移至新的培养皿中, 卵巢上附着的组织将会在后续步骤中被清除。

注:

- 1) 解剖和固定在室温下进行, 试剂应在从冰箱拿出后放至室温后再使用。
- 2) 可使用移液器进行转移, 在转移之前剪去移液管顶部的一部分使其能吸入卵巢大小的组织。如果组织容易粘在管壁上, 可以先在新的培养皿中滴入一滴 *Grace's Insect Medium*, 将镊子夹在组织不易破损或者对于实验不重要的部分, 轻轻夹起组织, 置于新培养皿的液滴中, 放下组织。

图 1. 解剖果蝇卵巢示意图. A. 用镊子轻轻固定住果蝇腹部的前部, 用另一把镊子夹住果蝇腹部的倒数第二个体节. B. 左手镊子固定果蝇身体, 右手镊子将果蝇尾部两个体节轻轻拉出, 卵巢会被一起扯出。这时不必对解剖组织进行清理, 迅速开始解剖下一只果蝇。左撇子的拿镊子解剖方式与此呈镜像对称。

3. 使用移液器尽可能多的移去组织周围的 *Grace's Insect Medium*。
4. 使用移液器在组织上滴加 200 μ l 4% PFA, 使组织浸没在液滴中。在室温下静置固定 10 分钟。
5. 使用移液器尽可能多的移去卵巢周围的 PFA。
6. 加入 2 ml PBS, 轻轻摇晃培养皿, 洗去残留的 PFA, 移去 PBS。一次即可。
7. 加入 PST, 在解剖显微镜下去除卵巢周围附着的其他组织。
8. 将卵巢使用移液器转移至 600 μ l 离心管中, 加入 400 μ l PST, 储存于 4 $^{\circ}$ C 或立即用于接下来的实验。

注: 根据组织和固定情况的不同, 组织的有效保存时间会有较大差异。为了取得最佳的染色效果, 尽量使用新鲜制备的样品。

二、免疫组化染色

1. 使用 PST 稀释抗体原液，按比例配制 20 μ l 体积的一抗溶液，使得一抗最终稀释比例在 1:200 至 1:1,000 之间，或者是抗体终浓度为 1 μ g/ml。

注：在本示例中一抗（兔抗 c-Myc，山羊抗 CTPS）的稀释比例为 1:200，一抗的浓度应根据具体情况进行调整。

2. 将两对固定好的卵巢使用移液器转移至新的 600 μ l 离心管中。

注：卵巢属于相对较大的组织，一般在 20 μ l 的抗体溶液中加入 2 对卵巢。在抗体浓度相同的情况下，样品越少染色效果越好。

3. 使用移液器尽可能多的移去卵巢周围的液体。

4. 加入 20 μ l 一抗溶液。

5. 室温孵育过夜。

注：一抗最佳孵育时间与温度和样品的情况有关，一般一抗孵育不超过一天。

6. 使用 PST 稀释并配制二抗溶液，使得二抗最终稀释比例在 1:200 至 1:1,000 之间。加入 DNA 染料 (DAPI 或 Hoechst，稀释比例 1:1,000)，总体积为 20 μ l。

注：本示例中二抗 (Texas Red 狗抗山羊 IgG; Cy5 狗抗兔 IgG) 的稀释比例为 1:250，Hoechst 33342 的终浓度为 1 μ g/ml。二抗和 DNA 染料的浓度应根据具体情况进行调整。

7. 使用移液器尽可能多的移去卵巢周围的一抗溶液。

8. 使用移液器加入 200 μ l PST，轻轻吹打，洗去残留的一抗，移去 PST。

注：如果样品成像时背景信号较强，可多次重复这一步。

9. 加入 20 μ l 二抗溶液。

10. 室温孵育过夜。

注：

- 1) 二抗最佳孵育时间与温度和样品的情况有关，如果样品成像时信号较弱，可以选择延长二抗孵育时间至两天或更长。

- 2) 如需储存，可以在二抗孵育过夜后将样品继续放在二抗溶液在 4 $^{\circ}$ C 保存。保存时间过长会导致较强的背景信号。

三、制片与成像

1. 在纸巾上放置一片盖玻片。
2. 在盖玻片的四角涂上凡士林
3. 使用移液器将卵巢和 15 μ l 左右的二抗溶液一起转移至盖玻片上。
注：在二抗溶液浓度合理的情况下，不需要洗去二抗。
4. 将载玻片轻压在盖玻片上，使盖玻片通过凡士林粘在载玻片上，翻转载玻片，使盖玻片在上，置于纸巾上。
5. 使用移液管轻压盖玻片的四角，使四角的高度尽量相同，赶出载玻片和盖玻片之间的气泡。
6. 如有液体溢出，轻轻用纸巾吸去。
7. 使用指甲油密封盖玻片的四边。
8. 待指甲油晾干后，可使用荧光显微镜或共聚焦荧光显微镜进行成像。
注：在制片完成后应尽快进行成像。如果无法及时进行成像，应如免疫组化染色 (8) 中所述保存在二抗溶液中，在成像之前再取出制片。

注意事项

一、信号弱或无信号

1. 二抗与一抗不匹配
选用与一抗来源物种相对应的二抗
2. 一抗或二抗浓度过低
适当增加抗体浓度
3. 抗体孵育时间过短
适当增加抗体孵育时间和温度
4. 抗体储存出现问题，导致抗体失效
配制新的抗体溶液
5. 在一管抗体中孵育的样品量过多
减少每管的样品数量
6. 样品储存时间过长，或在室温中放置的时间过长
尽量使用新鲜的样品

二、背景信号过强或非特异性识别

1. 一抗或二抗的浓度过高
适当降低抗体浓度
2. 孵育时间过长
适当减少孵育时间，或降低温度
3. 更换抗体时未洗净一抗
在更换抗体时增加洗涤次数
4. PST 中的血清出现沉淀或变质，导致封闭效果不佳
配制新的 PST
5. 制片后长时间未进行成像
制片后尽快进行成像
6. 二抗所带荧光基团的吸收/激发波长相近，在成像时出现串扰
在进行多个抗体的染色时，注意选择荧光基团吸收/激发波长相距较远的二抗
7. 指甲油未完全密封盖玻片，样品出现干片
在指甲油干燥后确认已经密封，如未密封可以再涂一层指甲油

三、成像时样品周围杂质过多

1. 样品固定不充分；保存时间过长；或在室温中放置时间过长，导致组织溃散
尽量使用新鲜的组织。如果组织保存时间较长导致液体中有组织脱落的碎片，可以在孵育抗体之前用新鲜的 PST 清洗一遍
2. 抗体溶液或 PST 等试剂中血清出现沉淀
使用新鲜配制的试剂，或者在使用前离心，取上清液用于实验

结果与分析

核苷酸 CTP 的从头合成的限速反应由 CTPS 催化。我们之前的工作表明，CTPS 在果蝇卵巢里的细胞以及其他组织中可以形成蛇形的细胞内结构，我们把这种结构称为细胞蛇 (英文单数是 cytoophidium; 复数是 Cytoophidia) (Liu, 2010)。

在寻找 CTPS 组装成细胞蛇的因子研究中，我们发现原癌基因 Myc 表达量对细胞蛇的形成有影响。因此，我们利用果蝇遗传手段，以果蝇卵巢中的单层上皮细胞滤泡细

胞作为研究模型。细胞核中的 GFP 表明该细胞中 Myc 会因为 RNA 干扰而表达水平降低。对此，我们在解剖果蝇获得卵巢，并进行固定之后，同时用两种一抗（兔抗 c-Myc，山羊抗 CTPS）与样品孵育，室温过夜。

第二天把一抗用 PST 溶液清洗一遍。然后向装有样品的小管中同时加两种二抗 (Texas Red 狗抗山羊 IgG; Cy5 狗抗兔 IgG)，并且加入 DNA 荧光染料 Hoechst 33342，孵育，室温过夜。次日可以制片用激光扫描共聚焦显微镜拍照。

由于我们所用的四个不同染料 (Hoechst 33342, GFP, Texas Red 和 Cy5) 的激发光和收集光光谱均有不同，这样我们可以在激光扫描显微镜下开通四个通道，同时检测 DNA 和三种蛋白质 (GFP, CTPS 和 Myc) (图 2)。这样我们就可以清晰并且直接的观察到，在 Myc 被敲低的细胞里 (GFP 阳性)，Myc 的免疫染色几乎没有 (图 2D)。与之对比的是对照细胞 (GFP 阴性) 里 Myc 免疫染色信号在细胞核里很明显 (图 2D)。对应的是，Myc 蛋白水平高的细胞 (GFP 阴性) 里 CTPS 可以形成纤维状细胞蛇 (图 2C)，而 Myc 蛋白水平低的细胞 (GFP 阳性) 里则看不到 CTPS 组成的细胞蛇 (图 2C)。这种多组分相互关系可以用不同色彩在叠加图中展示 (图 2E)。因此，这个免疫组织化学的结果支持 Myc 对 CTPS 组装成细胞蛇有调控作用 (Auguey 等, 2016)。

图 2. 原癌基因 Myc 影响 CTP 合成酶 (CTPS) 形成细胞蛇。 果蝇卵巢里单层卵泡细胞中的部分细胞 (其细胞核在图 B 中显示为 GFP 阳性) 中的 Myc (图 D) 被 RNA

干扰敲地低，从而使得 CTPS (图 C) 不能组装成细胞蛇。图 A 显示细胞核 DNA。
图 E 是 A-D 四个通道的叠加图。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1× PBS)

使用去离子水稀释 PBS (10×) (Beyotime ST476) 至 1×

2. PST (1×)

1× PBS

0.3% Triton™ X-100

0.5% 马血清

致谢

刘冀珑实验室的工作得到上海科技大学，英国牛津大学以及英国医学理事会的支持。

本文实验方案改编自本实验室的发表文章 Tastan 和 Liu (2015) 和 Aughey 等 (2016)。

参考文献

1. Liu, J. L. (2010). [Intracellular compartmentation of CTP synthase in *Drosophila*](#). *J Genet Genomics* 37: 281-296.
2. Tastan, O. Y. and Liu, J. L. (2015). [Visualizing cytophidia expression in *Drosophila* follicle cells via immunohistochemistry](#). *Methods Mol Biol* 1328: 179-189.
3. Aughey, G. N., Grice, S. J. and Liu, J. L. (2016). [The interplay between Myc and CTP synthase in *Drosophila*](#). *PLOS Genet* 12(2): e1005867.