果蝇 Schneider 2 细胞免疫荧光染色

Immunohistochemistry of *Drosophila* Schneider 2 Cell

张乐冰^{1, #}, 刘敏^{1, 2, #}, 朱健^{1, 2, *}

¹ 生命科学联合中心, 前沿交叉学科研究院, 北京大学, 北京; ² 生命科学学院, 北京大学, 北京

*通讯作者邮箱: zhua@pku.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 张乐冰, 刘敏, 朱健. (2019). 果蝇 Schneider 2 细胞免疫荧光染色. *Bio-101* e1010258. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010258.

How to cite: Zhang, L. B., Liu, M. and Zhu, A. J. (2019). Immunohistochemistry of *Drosophila* Schneider 2 cell. *Bio-101* e1010258. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010258. (in Chinese)

摘要: 免疫荧光染色是一种重要的研究目的蛋白在组织和细胞中定位的手段。其原理是通过在固定的组织和细胞中加入特异识别目的蛋白并带有特定荧光标记的抗体, 使抗体和目的蛋白结合, 通过对抗体的荧光信号成像分析, 得到目的蛋白在组织和细胞中的位置。免疫荧光染色不仅可以标记果蝇体内的目的蛋白的组织定位, 也可以在体外培养的细胞中标记目的蛋白在单个细胞中的亚细胞定位。果蝇的 Schneider 2 (S2) 细胞系是最常用的一种果蝇细胞系, 本方案以 S2 细胞系为例, 介绍在果蝇体外培养细胞系统中的免疫荧光染色方法。

关键词: 果蝇, S2 细胞, 免疫荧光染色

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 24 孔细胞培养板 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 140675)
3. 15 ml 塑料离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 339650)
4. 1.5 ml 离心管 (Corning, AXYGEN, catalog number: MCT-150-C)
5. 载玻片 (Thermo Fisher Scientific, Superfrost AA00008032E00MNT10)
6. 盖玻片 (Thermo Fisher Scientific, CB00100RA120MNT0)
7. 封口膜 (VWR Life Science, Parafilm, catalog number: PM-996)

8. 果蝇 S2 细胞
9. 质粒: *pUAST-V5-misshapen*, *pActin-Gal4*
10. 磷酸缓冲液干粉 (1× PBS) (Coolaber, catalog number: PM-5090-50)
11. 75%酒精 (ANNJET, 75%酒精消毒液)
12. 去离子水
13. 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 441244) 4 °C 保存
14. Triton X-100 (VWR Life Science, AMRESCO, catalog number: 0694)
15. 小牛血清蛋白 (VWR Life Science, AMRESCO, catalog number: 0332) 4 °C 保存
16. 多聚赖氨酸母液 (Poly-L-lysine solution) (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: P4832) 4 °C 保存
17. 刀豆蛋白 A (Concanavalin A) (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: C5275) - 20 °C 保存
18. 封片剂 (Maravai LifeSciences, Vector Laboratories, VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI H-1200) 4 °C 保存
19. (可选) 80%甘油
20. 指甲油 (SEPHORA, OPI, catalog number: 5708)
21. 一抗 mouse anti-V5 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, catalog number: 460705) 浓度 1:2,000
22. 二抗 Goat anti-mouse 488 (Thermo Fisher Scientific, Alexa Fluor® Plus 488, catalog number: A32723)
23. 磷酸缓冲液(1× PBS) (见溶液配方)
24. 多聚赖氨酸溶液 (见溶液配方)
25. 刀豆蛋白 A 溶液 (见溶液配方)
26. 4%多聚甲醛-PBS 溶液 (见溶液配方)
27. 0.1% Triton X-100-PBS 溶液 (见溶液配方)
28. 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液 (见溶液配方)
29. 一抗溶液 (见溶液配方)
30. 二抗溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子 (赛拓, 1380)
2. 移液枪 (Gilson, P1000, P200, P10)
3. 荧光显微镜 (Leica, model: DM IL LED)
4. 共聚焦显微镜 (Leica, model: TCS SP8)
5. 细胞培养箱 (SANYO, model: MCO-18AIC): 有恒温功能和保湿功能即可, 温度设定为 25 °C, 湿度设定为 70%。果蝇 S2 细胞不需要通入 CO₂
6. 摇床 (Kylin Bell, orbital shaker TS-1)
7. 层析柜 (松源华兴, SL-II 型数控层析冷柜)
8. 恒温水浴锅 (Thermo Fisher Scientific, ISOTEMP 202)
9. 电子天平 (Mettler Toledo, model: PL602-S)

实验步骤

1. 观察细胞状态

从培养箱中取出需要进行免疫荧光染色的细胞, 并在显微镜下观察, 细胞密度为 $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 比较合适。

2. 细胞贴壁

由于 S2 细胞为半悬浮细胞, 贴壁能力较差, 我们在显微观察和染色处理的过程中需要采取使其贴附在盖玻片上。通常采用的方法是使用多聚赖氨酸或刀豆蛋白 A 预处理盖玻片。多聚赖氨酸可以使 S2 细胞贴附盖玻片的同时保持其球状的细胞形态。刀豆蛋白 A 在使 S2 细胞贴壁的同时也会使其扁平延展 (Rogers 等, 2002)。

2.1 准备圆形盖玻片若干, 用 75%酒精清洗后晾干。

2.2 用镊子把盖玻片放在 24 孔细胞培养板内, 用移液枪在盖玻片上加 100 μl 多聚赖氨酸或刀豆蛋白 A 溶液, 并把溶液均匀涂在盖玻片上。静置 1 分钟。

2.3 吸去多聚赖氨酸或刀豆蛋白 A 溶液 (可回收使用), 待盖玻片干透后, 加入 500 μl 吹吸混匀的细胞培养液。把 24 孔细胞培养板放回细胞培养箱, 等待细胞贴附在盖玻片上。使用多聚赖氨酸处理玻片时这一过程需要 2 小时, 刀豆蛋白 A 溶液处理玻片时这一过程需要 1 小时。

3. 细胞的免疫组化染色

- 3.1 取出 24 孔细胞培养板，吸去培养基上清。加入 0.5 ml PBS 溶液清洗，然后吸去 PBS 溶液。
- 3.2 在孔中加入 200 μ l 4%多聚甲醛-PBS 溶液，室温静置 15 分钟，然后吸去上清。
- 3.3 加入 0.5 ml PBS 溶液清洗 3 次，吸去上清后加入 200 μ l 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液，室温静置 45 分钟。
- 3.4 吸去上清，加入 0.5 ml 0.1%Triton™ X-100-PBS 溶液，静置 5 分钟。
- 3.5 配好含有一抗的 0.2%小牛血清-PBS 溶液。准备一个空的枪头盒，取下枪头网格，在盒内放置一张合适大小的湿润的滤纸或注入高约 1 cm 的双蒸水，再放置上枪头网格。在枪头网格上放置合适大小的封口膜，用移液枪吸取 30 μ l 含抗体的溶液，点在封口膜上。取出带有细胞的盖玻片，将有细胞的一面向下盖在封口膜的溶液上。合上枪头盒盖，把枪头盒放入 4 °C 层析柜中过夜。湿润的枪头盒能保证抗体孵育的过程中抗体溶液不会蒸发。
- 3.6 取出盖玻片，有细胞的一面朝上放入 24 孔细胞培养板中，用 0.5 ml PBS 溶液清洗 3 次，PBS 溶液每次在盖玻片上停留 5 分钟。
- 3.7 每张盖玻片上加入 100 μ l 含有二抗的 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液，在摇床上室温孵育 1 小时，如果使用的二抗为带有荧光标记的二抗，室温孵育需要避光处理。
- 3.8 吸去上清，用 0.5 ml PBS 溶液清洗 3 次，PBS 溶液每次在盖玻片上停留 5 分钟。
4. 制片与成像
 - 4.1 准备一张载玻片，用移液枪在载玻片中间加入 5 μ l 封片剂。
 - 4.2 用镊子把带有细胞的盖玻片取出，贴有细胞的一面朝下把玻片轻轻地盖在载玻片的封片剂上，尽量避免产生气泡。
 - 4.3 在盖玻片边缘涂上一圈指甲油，以固定盖玻片。
 - 4.4 待指甲油晾干后，使用激光共聚焦显微镜成像。

结果与分析

我们在 S2 细胞中转染了 *pUAST-V5-misshapen* 以及 *pActin-Gal4* 质粒各 0.4 μ g，并在转染 2 天后收集细胞做免疫荧光染色，使用刀豆蛋白 A 处理玻片。使用一抗 mouse anti-

V5 (Invitrogen) 浓度 1:2,000。使用二抗 Goat anti-mouse 488 (Thermo Fisher Scientific Alexa Fluor® Plus 488) 浓度 1:400。结果显示 Misshapen 蛋白主要分布在 S2 细胞的细胞质中 (图 1)。

图 1. *V5-misshapen* 过表达细胞染色

注意事项

1. 细胞的状态会影响其形态和贴壁的能力，一般情况下请尽量保证实验前细胞状态良好，密度合适。
2. 细胞受到挤压和摩擦时形态会被破坏，转移带有细胞的盖玻片时需要时刻注意，不要把带有细胞的一面朝下。
3. 使用 Triton™ X-100-PBS 溶液对细胞进行透化处理，对于细胞内部结构的染色是必需的。但是处理的时间过长会导致细胞内部蛋白组分的损失。因此在常规染色中，透化处理不超过 5 分钟。而在细胞骨架蛋白的染色中，则需要比较长的时间的透化处理，洗掉多余的蛋白，这时可以在一抗溶液和二抗溶液中也加入 0.1% Triton™ X-100。
4. 根据抗体的不同，一抗溶液和二抗溶液的浓度以及孵育时间都有可能不同。对于一些信号不是很特异的抗体，建议使用果蝇组织进行预处理：在 PBS 缓冲液中解剖果蝇三龄幼虫。具体流程请参照“果蝇翅成虫盘免疫荧光染色” (高远等, 2019) 中组织解剖部分。将解剖完毕的果蝇组织置于 1.5 ml 离心管中，加入 200 μl 4% 多聚甲醛-PBS 溶液并于室温固定 20 min。去除固定液后用 1× PBS 溶液清洗 3 次，加入配制好的抗体溶液至于 4 °C 摇床孵育过夜。收集的上清即为预处理的抗体溶液，可以有效提高抗体的特异性，降低显色背景。

5. 如果一抗和二抗的信号不强，可以适当延长孵育的时间。但是要注意孵育时间过长可能会导致抗体溶液的挥发，从而影响染色效果。
6. 由于 Vectashield 封片剂本身含有 DNA 染料 DAPI，所以上述方案没有提到细胞核染色方法。如果没有 Vectashield mounting medium 可以用 80%甘油代替，这时需要在二抗孵育液中加入 DAPI 染料进行细胞核染色。在甘油中荧光信号很快会淬灭，必须在封片完成后 2 天以内进行成像。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液(1× PBS)

1 L 装磷酸缓冲液干粉加入去离子水中混匀，定容至 1 L

室温保存

2. 多聚赖氨酸溶液

准备一个干净的 15 ml 塑料离心管，加入 9 ml 去离子水

向管中加入 1 ml 多聚赖氨酸溶液母液，上下颠倒混匀

4 °C 保存

3. 刀豆蛋白 A 溶液

准备一个无菌的 1.5 ml 离心管，加入 1 ml 1× PBS 溶液，将 5 mg 刀豆蛋白 A 加入到含有 1 ml PBS 溶液的离心管中，用移液枪吹吸混匀，配制为刀豆蛋白 A 溶液

-20 °C 保存

4. 4%多聚甲醛-PBS 溶液

称取 4 g 多聚甲醛干粉加入 100 ml 1× PBS 溶液中，混匀

用 NaOH 调节 pH 为 7.0

分装在无菌的 1.5 ml 离心管中，每管 1 ml

由于多聚甲醛溶解性不是很强，如果长时间不溶解，可以在 37 °C 恒温水浴锅中处理 2 小时

-20 °C 保存

5. 0.1% Triton X-100-PBS 溶液

1 L 1× PBS 溶液中加入 1 ml 0.1% Triton X-100

室温保存

6. 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液

称取 0.20 g 小牛血清蛋白加入 100 ml 1× PBS 溶液中，混匀后分装在无茵的 1.5 ml 离心管中，每管 1 ml

-20 °C 保存

7. 一抗溶液

将一抗按适当比例加入到 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液中，现用现配

8. 二抗溶液

将二抗按比例加入到 0.2%小牛血清蛋白-PBS 溶液中，现用现配

致谢

本实验室的工作得到细胞增殖与分化重点教育部重点实验室、膜生物学国家重点实验室、生命科学联合中心、国家自然科学基金和科学技术部的资金支持。本实验方案改编自本实验室的发表文章 Du 等 (2016) 和 Liu 等 (2016)。

参考文献

1. 高远, 刘敏, 朱健. (2019). [果蝇翅成虫盘免疫荧光染色](#). *Bio-101* e1010260. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010260.
2. Du, J., Zhang, J., He, T., Li, Y., Su, Y., Tie, F., Liu, M., Harte, P. J. and Zhu, A. J. (2016). [Stuxnet facilitates the degradation of polycomb protein during development](#). *Dev Cell* 37(6): 507-519.
3. Liu, M., Li, Y., Liu, A., Li, R., Su, Y., Du, J., Li, C. and Zhu, A. J. (2016). [The exon junction complex regulates the splicing of cell polarity gene *dlg1* to control Wingless signaling in development](#). *Elife* 5: e17200.
4. Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. and Vale, R. D. (2002). [Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle](#). *J Cell Biol* 158(5): 873-884.