果蝇翅成虫盘免疫荧光染色

Immunofluorescence Staining in *Drosophila* Wing Imaginal Discs

高远^{1, #}, 刘敏^{1, 2, #}, 朱健^{1, 2, *}

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

How to cite: Gao, Y., Liu, M. and Zhu, A. J. (2019). Immunofluorescence staining in *Drosophila* wing imaginal discs. *Bio-101* e1010260. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010260. (in Chinese)

摘要: 免疫荧光染色可以通过抗原-抗体特异性结合, 对特定蛋白进行标记, 随后通过检测荧光, 对蛋白表达甚至蛋白定位进行直观、可视化的观察。免疫荧光染色可以分为一步法和两步法, 一步法使用直接带有荧光基团的特异性一抗, 适用范围较小, 两步法则较为常用, 即首先通过特异性抗体结合特定蛋白 (一抗), 随后用带有荧光基团的抗体特异性结合一抗, 进而使被一抗标记的蛋白可以在荧光显微镜下被观察到。果蝇翅成虫盘是果蝇幼虫中的组织, 由一层单层柱状上皮和一层单层扁平上皮组成, 在果蝇发育过程中, 翅成虫盘会发育成果蝇成虫翅膀。果蝇翅成虫盘的发育受到 Notch, Wnt, Hedgehog, Dpp, Hippo 等多种信号转导通路共同调控, 是研究信号转导通路的理想模型。本文将通过对果蝇翅成虫盘上 Wg 蛋白的免疫荧光染色实验, 详细描述果蝇翅成虫盘解剖及免疫荧光染色的实验步骤及注意事项。

关键词: 黑腹果蝇, 翅成虫盘, 免疫荧光染色

材料与试剂

1. 载玻片 (帆船牌载玻片, 7105)
2. 盖玻片 (CITOGLAS, 10212020C)
3. 1.5 ml 塑料离心管 (Corning, AXYGEN, catalog number: MCT-150-C)
4. 4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 441244)

5. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (Coolaber, catalog number: PM5090)
6. Triton X-100 (VWR Life Science, AMRESCO, catalog number: 0694)
7. 牛血清蛋白 BSA (VWR Life Science, AMRESCO, catalog number: 0332)
8. Wg 抗体 (DSHB, 4D4)
9. 山羊抗小鼠 IgG 568 nm 荧光二抗 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, catalog number: A-11004)
10. 甘油 (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: G5516)
11. 指甲油 (SEPHORA, OPI, 5708)
12. 封片剂 (Maravai LifeSciences, Vector Laboratories, VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI, H-1200)
13. Schneider 果蝇培养基 (Thermo Fisher Scientific, Gibco, catalog number: 21720-024)
14. PBST (见溶液配方)
15. PBST-BSA (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊 (Regine, Venus, 5)
2. 解剖显微镜 (Leica, S6E)
3. 脱色摇床 (杭州米欧, RH-24)
4. 4 °C 低温层析冷柜 (松源华兴, SL-II 型数控层析冷柜)
5. 移液器 (Gilson, P2-P1000)
6. 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica, model: TCS SP8)

实验步骤

1. 组织解剖和固定
 - 1.1 在清洁的 EP 管中加入约 100~200 µl 干净的 PBS。
 - 1.2 将一张干净的载玻片放在解剖镜下，调好焦距和放大倍数。在载玻片上滴一滴清洁的 PBS，取一只黑腹果蝇三龄幼虫，放在 PBS 中。
 - 1.3 解剖：用解剖镊从果蝇幼虫身体偏头部约 1/3~1/2 的位置夹断，将后半部分丢弃。用镊子将前半部分以头部为支点，将整个身体内外翻转，暴露出果蝇身体

内部的消化道、唾液腺、脂肪体、气管、成虫盘等组织，将脂肪体、消化道和唾液腺摘除 (图 1)。将剩下的部分 (翻转过来的幼虫体壁以及连接在上边的气管和成虫盘等) 放进加入了 PBS 的 EP 管中。

图 1. 果蝇免疫荧光染色解剖图示. A. 完整的果蝇幼虫图示，左上角为头部。B. 用镊子将果蝇幼虫在身体靠近头部约 1/3~1/2 的位置夹断。C. 将果蝇幼虫内外翻转：可用一支镊子的尖部顶住果蝇幼虫头部 (如图中红色箭头所示)，另一支镊子轻轻夹住果蝇幼虫，沿图中黄色虚线箭头所示方向拉扯体壁，将果蝇幼虫体壁翻转，内部组织暴露如图 D。D. 内外翻转后的果蝇幼虫，图中蓝色箭头所示即果蝇翅成虫盘。随后去掉多余的脂肪体 (图中黄色箭头所示)。E. 清理干净后的果蝇幼虫，可看到其翅成虫盘 (图中蓝色箭头所示) 挂在气管上，形态完整。此时即可收集至 EP 管中。

1.4 通过上述解剖方法解剖并收集足够数目的幼虫到 EP 管中后，用移液器将 EP 管中的 PBS 吸出。

1.5 固定：加入 100~200 μ l 4% PFA，置于脱色摇床上，室温固定 15 min。

1.6 使用移液器移除 4% PFA，随后加入 500~600 μ l PBST，置于脱色摇床上室温环境洗 3 次，每次 3~5 min，至 PFA 被完全洗净为止。

2. 孵育抗体

2.1 封闭：在洗净 PFA 后，将 EP 管中的 PBST 吸去，加入 200 μ l PBST-BSA，室温封闭 40~60 min。

- 2.2 配制一抗：取 200 μ l PBST-BSA，加入 1 μ l Wg 抗体 4D4。
- 2.3 孵育一抗：将样品 EP 管中的 PBST-BSA 用移液器吸出。加入配制好的一抗，在 4 °C 脱色摇床上孵育过夜。
- 2.4 洗一抗：将 EP 管中的一抗吸出，加入 500~600 μ l PBST，室温放在脱色摇床上洗 3 次，每次 3~5 min，将一抗洗净。
- 2.5 配制二抗：取 200 μ l PBST-BSA，加入 0.5 μ l Goat anti mouse IgG 568 nm 荧光二抗。
- 2.6 孵育二抗：将样品 EP 管中的 PBST 用移液器吸出。加入配制好的二抗，在脱色摇床上 4 °C 避光孵育过夜或室温避光孵育 1~2 h。
- 2.7 洗二抗：将 EP 管中的二抗吸出，加入 500~600 μ l PBST，室温放在脱色摇床上洗 3 次，每次 3~5 min，将二抗洗净。
3. 制片和成像
 - 3.1 在解剖镜下放一片载玻片，滴上 8~10 μ l 封片剂。
 - 3.2 取另一片载玻片，将 EP 管中的果蝇组织用吸管转移到载玻片上。
 - 3.3 将果蝇组织中的翅成虫盘小心地用解剖镊取下，并放入封片剂中，轻轻铺平。
 - 3.4 取盖玻片，小心地盖在封片剂上。
 - 3.5 用指甲油密封盖玻片的四边。
 - 3.6 待指甲油晾干后，可用荧光显微镜进行成像。

注：对于一些**特殊需求**的免疫荧光染色的**特殊操作**：

1. 对于需要进行 3D 重构的翅成虫盘染色

由于翅成虫盘正常厚度约为 45 μ m 左右，而一般情况下压片后压片厚度只有 15 μ m，因此翅成虫盘细胞会被机械力挤压导致其在 z 轴方向上较为密集。因此，对于需要拍摄 3D 重构的果蝇翅成虫盘，可以在制片时进行如下操作：

 - 1) 在制片用的载玻片上滴 20~30 μ l 封片剂；
 - 2) 用指甲油在滴好的 Mounting medium 外侧的载玻片上涂一圈，利用凝固后的指甲油将空间垫高，使翅成虫盘的 3D 结构可以较好保留；
 - 3) 随后正常进行制片，但要待指甲油凝固后再盖盖玻片，然后再用指甲油封片。

2. 对于暴露于细胞膜外的蛋白染色

对于一些在翅成虫盘细胞中分泌或作为配体在细胞表面起作用的蛋白，可以通过对其进行细胞外染色进行观察。在进行细胞外染色时，应保持细胞在孵育一抗结束前仍然存活，使细胞膜结构完整，令抗体无法通过自由扩散进入细胞内；同时要尽可能阻断细胞膜的流动性，防止抗体通过细胞的内吞作用进入到细胞内 (Liu 等, 2016)。具体操作如下：

- 1) 在解剖时，使用 Schneider 果蝇培养基 (Thermo Fisher Scientific, Gibco, 21720-024, 下文简称 S2 培养基) 代替 PBS，并且应全程在冰上进行：载玻片应放在冰块上预冷，S2 培养基使用前冰置，并且收集果蝇幼虫组织的含 S2 培养基的 EP 管应放在冰上。
- 2) 解剖后用冰置的 S2 培养基涮洗 1~2 次，即加入培养基后混匀即吸出。随后，加入冰置的 S2 培养基，以 1:3~1:10 的比例加入一抗，用枪头搅拌混匀后在冰上静置 40 min~60 min 孵育一抗。
- 3) 吸出一抗后，用 S2 培养基涮洗 1~2 次，然后加入冰置的 4% PFA，冰上放置 5 分钟后转移到室温，继而在室温固定 15 min。
- 4) 用 PBST 洗 2~3 次，每次约 3 min，洗去 PFA。
- 5) 加入 200 μ l PBST-BSA 及二抗，4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜，然后制片。

结果与分析

本实验结果反映了 Wg 蛋白在果蝇翅成虫盘中的表达模式 (图 2)。果蝇翅成虫盘分为前段 (Anterior) 和后端 (Posterior)，或背侧 (Ventral) 和腹侧 (Dorsal)。Wg 蛋白在翅成虫盘总主要表达在背-腹边界线 (D-V Boundary) 上，并向两侧分泌，形成浓度梯度。

图 2. 果蝇翅成虫盘中 Wingless (Wg) 蛋白表达模式

注意事项

1. 信号弱或无信号

1) 二抗与一抗不匹配

检查所使用的抗体，选用与一抗来源物种对应的二抗。

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

适当增加孵育时间。

4) 抗体失活

换用新的抗体。

5) 样品制片后放置时间过长以至荧光淬灭

尽可能在制片后尽快在荧光显微镜下观察，若一定需要放置一段时间，可以避免光放置在 4 °C，减缓荧光淬灭。

6) 荧光显微镜观察过程中荧光淬灭

减弱荧光强度，加快观察速度。

7) 荧光显微镜观察过程中荧光信号单纯性较弱

加大荧光强度或感光度或曝光时间。

2. 信号强或噪音过高

1) 抗体浓度过高

适当减少一抗或二抗的浓度。

2) 孵育时间过长

减少孵育时间。

3) 在 4 °C 孵育的步骤在较高温度，如室温，进行了孵育

确保 4 °C 的孵育环境，保证孵育温度。

4) 一抗没有洗干净就加入了二抗

在清洗一抗时多洗几遍。

5) 封闭不足，引起非特异性结合

增加封闭时间。

6) 样品储存时间过长，特异信号变弱引起噪音过强
尽快观察样品。

7) 曝光过强
减弱荧光强度或降低感光度或曝光时间。

8) 抗体非特异性结合较强
尝试更好的抗体，或尽可能所有抗体孵育在 4 °C 进行。

3. 其他

- 1) 翅成虫盘组织过脆，容易夹坏
这一现象是由于固定时间过长，应减少固定时间。
- 2) 翅成虫盘组织过软，不容易夹取
这一现象是固定效果不好，可能是固定时间较短，或是 4% PFA 溶液质量较差，可尝试增加固定时间或重新配制溶液。

溶液配方

1. PBST

1× PBS
0.1% Triton X-100

2. PBST-BSA

1× PBS
0.1% Triton X-100
0.2% BSA

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. 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.
2. 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.