果蝇成蝇大脑的解剖与免疫组化

Anatomy and Immunocytochemistry of the Whole-mount Brain of Adult *Drosophila*

杨扬^{1,2}, 周鸣敏¹, 李岩^{1,2,*}

¹ 脑与认知国家重点实验室, 生物大分子科教融合卓越中心, 中国科学院生物物理研究所, 北京; ² 生命科学学院, 中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: liyan@ibp.ac.cn

引用格式: 杨扬, 周鸣敏, 李岩. (2019). 果蝇成蝇大脑的解剖与免疫组化. *Bio-101* e1010265. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010265.

How to cite: Yang, Y., Zhou, M. M. and Li, Y. (2019). Anatomy and immunocytochemistry of the whole-mount brain of adult *Drosophila*. *Bio-101* e1010265. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010265. (in Chinese)

实验原理: 在神经科学研究中, 果蝇作为一种应用超过百年模式生物, 占据了不可取代的地位。由于其神经元较为简单且具有遗传可控性, 果蝇适合在基因水平、细胞水平以及神经环路水平上开展对神经发育、神经网络功能等研究和分析 (Kazama 等, 2015), 对于分析行为的遗传调控尤其具有宝贵价值 (Sun 等, 2017)。

免疫荧光组织化学是利用免疫学中抗原与抗体结合的原理以及组织化学技术对细胞或组织特定抗原或抗体进行定位和定量研究的技术, 具有高度特异性和精确性 (吕国蔚和李云庆, 2011)。由于组织或细胞中所进行的抗原抗体反应在一般条件下是不可见的, 所以需要使用荧光染料作为标记物, 首先将已知的抗原或抗体上标记好荧光素, 并将它作为探针检测细胞或组织中相应的抗原或抗体, 同时发生抗原抗体反应形成带有特定荧光素的复合物, 在特定波长激光的照射下产生不同颜色的荧光 (吕国蔚和李云庆, 2011), 从而看到荧光标记的细胞组织的形态及位置。同时可以基于标准的免疫荧光组织化学染色步骤并做出改良, 将不同抗体和实验组织或器官混合孵育, 在激光扫描共聚焦显微镜下可以观察到不同荧光素在荧光显微镜不同波长的激光照射下产生的不同颜色的荧光, 这既可以实现对神经细胞精细结构的可视化, 又可以显示神经元、纤维、终末内之间的相互关系 (Wu 和 Luo, 2006)。该方法简单、易于操作, 具有较高的灵敏性和精确性, 是神经科学研究中不可或缺的一种方法。

而绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) (Misteli 和 Spector, 1997) 的遗传标记与免疫荧光染色的共用是果蝇神经科学的研究中不可或缺的一种手段。由于

GFP 在波长为 488 nm 的激光照射下会吸收部分能量从而产生绿色的荧光，利用这一特性，可将 GFP 用作荧光报告基因。利用分子生物学手段，将 GFP 作为报告基因表达在 UAS 的下游，同时利用果蝇中的 UAS-Gal4 二元表达系统，使得 GFP 能够标记特定神经细胞。同时使用免疫荧光染色的手段，不仅可以确定某个蛋白是否在特定神经细胞中表达，还可以确定特定神经细胞的细胞类型，更能够鉴定特定神经元的递质能类型。本文共同使用 GFP 遗传标记技术与免疫组化技术，对特定神经细胞进行了细胞类型的鉴定。

实验目的：成蝇脑部的解剖；免疫荧光组织化学染色技术与 GFP 遗传标记的共用。

关键词：成蝇脑解剖，免疫荧光，共聚焦显微成像

材料与试剂

1. 圆形贴纸 (AVERY, 1000 Labels White, 5720™)
2. 载玻片 (江帆牌, catalog number: 7105)
3. 盖玻片 (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 72200-10)
4. 0.6 ml EP 管 (Axygen, catalog number: MCT-060-C)
5. 培养皿 (北京瑞艾正特生物科技有限公司，一次性使用塑料培养皿)
6. 果蝇基因型为 86E01-Gal4/UAS-GFP
7. Triton X-100 (Solarbio, catalog numbers: 9002-93-1 and T8200)
8. 封片液 (Vector, Vectashield Mounting Medium For Fluorescence, catalog number: ZD1002C)
9. 8%多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) (Electron Microscopy Science, catalog number: 157-8)
10. Normal Goat Serum (NGS) (Nordic-MUbio)
11. Mouse-anti-repo (Developmental Studies Hybridoma Bank, 8D12 anti-Repo-s)
12. Alexa Fluor™ 555 goat anti-mouse IgG (Life technologies, catalog number: A21422)
13. 酒精 (山东利尔康医疗科技股份有限公司，利尔康®75%酒精消毒液)
14. 指甲油 (品派, catalog number: 29269705379-E049)
15. 20× PBS 缓冲液 (生工®Sangon Biotech, catalog number: B548117-0500)
16. 0.3% PBST 溶液 (见溶液配方)

17. 固定液 (4% PFA) (见溶液配方)
18. 封闭液 (5% NGS) (见溶液配方)
19. 一抗溶液 (见溶液配方)
20. 二抗溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子 (Dumostar, catalog number: 0209-5-PO)
2. 体视显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司, SMA-B4 连续变倍体视显微镜)
3. 激光扫描共聚焦显微镜 (Nikon A1)
4. 摇床 (其林贝尔仪器制造有限公司, model: Transference Decoloring Shaker TS-8)

实验步骤

注: 建议在避光条件下进行全部操作。

1. 果蝇冰上麻醉, 在生理液中进行脑部的解剖 (图 1)。

图 1. 果蝇成蝇头部示意图 (Wu 和 Luo, 2006). A、C 箭头所指处为眼球与口器的连接处, B 箭头所指处为口器端部。蓝色虚线框内灰色阴影区域为果蝇成蝇大脑。

- 1.1 取 3~6 日龄的果蝇置于空管并放置于冰上 2~3 min, 使其处于低温昏迷状态。
- 1.2 滴一滴生理液于培养皿盖上, 取一只已昏迷的雌蝇于该溶液中, 在体视显微镜下剥离果蝇的头部: 一个镊子钳住果蝇胸部, 一个镊子夹在果蝇头胸部交界处并轻轻向外扯, 即可使头部与身体分离。

注:

- 1) 雌蝇个体普遍比雄蝇大, 易于解剖。

- 2) 一个成蝇大脑的解剖建议在 3 min 内完成，不宜超过 5 min，以保持大脑的正常形态及活性：若 3 min 内可完成，则生理液可提前置于冰上，解剖时不需在冰上进行；若速度过慢则建议直接在冰上进行大脑解剖。

- 1.3 用镊子分别夹住图 1A、1B 箭头所指向的位置，保持 A 处镊子夹紧不动，B 处镊子向外扯，将果蝇的口器剖离。
- 1.4 用镊子分别夹住图 1A、1C 箭头所指向的位置，两个镊子夹紧后向相反方向移动拉扯，可使果蝇大脑从脑壳中完整被剖离。
- 1.5 刚被剖离出的脑子上布满白色细丝或薄膜状物体，为果蝇的气管及其他组织，用镊子轻轻剥离即可。干净的大脑呈现均匀半透明状 (图 2)。

图 2. 果蝇成蝇大脑. D: 背侧, V: 腹侧, 标尺为 100 μm 。

2. 取 300 μl 固定液 (4% PFA) 于 600 μl 洁净干燥的 EP 管并置于冰上，将已解剖的完整的成蝇大脑置于固定液中，每管大约放 10~15 个大脑。
3. 将 EP 管置于摇床上，25 rpm 振荡，室温避光固定 40 min。

注：

- 1) EP 管放置方向应与摇床摇动方向相同，以保证大脑被充分固定和细胞膜打孔，便于抗体通透，接触到大脑深层的神经细胞等。
- 2) 此步骤中的上清溶液中含有多聚甲醛，对人体有害，应单独回收，集中处理。

4. 洗脱：两次快洗，一次慢洗。

注：此步骤务必重复 3 次以洗去脑组织上的残留溶液。

- 4.1 快洗：取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，弃上清，加入 200 μl 0.3% PBST 溶液于管中，上下颠倒混匀，此步骤建议重复两次。
- 4.2 慢洗：取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，弃上清，加入 300 μl 0.3% PBST 溶液于管中，将 EP 管放入摇床，30 rpm 振荡，室温避光慢洗

30 min。

5. 取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，弃上清，加入 400 μ l 封闭液 (5% NGS)，将 EP 管放入摇床，30 rpm 振荡，室温避光封闭 1~2 h。
6. 取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，弃上清，加入 300 μ l 一抗溶液于管中，将 EP 管放入摇床，15 rpm 振荡，4 $^{\circ}$ C 避光孵育一抗过夜。
7. 取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，一抗溶液回收，4 $^{\circ}$ C 可保存 1~2 个月，可重复使用 4~5 次。
8. 重复快洗-慢洗操作三次，充分洗去一抗溶液。
9. 在避光条件下，取下 EP 管静置 10 s 左右，使大脑沉淀于管底，弃上清，加入 300~400 μ l 二抗溶液，将 EP 管放入摇床，15 rpm 振荡，4 $^{\circ}$ C 避光孵育二抗过夜。
10. 重复快洗-慢洗操作三次，充分洗去二抗溶液。
11. 取洁净干燥载玻片，贴圆形贴纸于载玻片中央，在磨砂处做好标记。
12. 从 EP 管中吸取 2~5 个成蝇大脑于载玻片圆形贴纸区域中央，沿贴纸边缘吸去多余液体，在体视显微镜下用镊子轻轻拨动脑子调整正反，并使它们位于同一个方向，便于后续显微镜观察记录。

注：将显微镜灯光调至最暗，防止荧光猝灭。

13. 用 10 μ l 量程移液枪轻轻移走大脑周围多余液体，迅速在圆形贴纸内加入 5~7 μ l 封片液，使其没过脑组织，取盖玻片边缘倾斜 45 $^{\circ}$ 靠近于封片液边缘，再缓缓放下，即将完全放下时，松开夹着盖玻片的镊子并迅速抽出，使盖玻片自然落下，可防止气泡产生。

注：盖玻片提前用酒精浸泡，使用时用擦镜纸轻轻擦拭，放于干净纸上备用。

14. 蘸取适量透明指甲油，使指甲油刷上的液滴自然落下于载玻片边缘，移动指甲油刷使指甲油沿着载玻片边缘移动。

注：

- 1) *注意指甲油用量：过多会浸入封片液中或将大脑遮盖，影响后续观察，过少则无法完成封片。*
- 2) *切勿让指甲油刷触碰到盖玻片与载玻片，否则会造成盖玻片与载玻片之间的滑动，使大脑位置移动或产生气泡，影响后续结果观察。*

15. 放置 2 h 使指甲油充分晾干，重复步骤 14，完成封片，将玻片避光放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱

保存。

注：4 °C 可保存 1~2 周，建议在一周内完成显微成像，避免荧光信号猝灭影响实验结果。

16. 使用激光扫描共聚焦显微镜观察样品。

注：务必确保指甲油已完全干透。

结果与分析

在神经系统中，神经细胞可分为神经元以及神经胶质细胞。其中神经胶质细胞发挥着重要的作用，例如，近年来，越来越多的证据表明神经胶质细胞与生物的昼夜节律息息相关 (Chi-Castaneda 和 Ortega, 2018)。而在果蝇中，神经胶质细胞占据了神经系统中的 10%，与多种行为的调控密切相关，例如节律、睡眠、学习记忆、运动、交配等，同时神经胶质细胞对于神经疾病以及行为障碍的研究起着重要作用，例如成瘾、共济失调、铁离子诱导的神经退行性疾病 (Zwarts 等, 2015)。那么鉴定特定神经细胞的细胞类型就显得尤为重要。本实验使用基因型为 86E01-Gal4/UAS-GFP 的果蝇，使用 GFP 标记 86E01 神经细胞 (即图 3-GFP 中绿色的细胞)，再进行免疫组化实验对 86E01 神经细胞进行细胞类型的鉴定。使用神经胶质细胞的常用标记物 mouse-anti-repo 对该果蝇大脑进行染色标记，图 3-repo 中的红色细胞即为神经胶质细胞，可以看出神经胶质细胞数量很多同时分布极为广泛。针对成蝇脑部嗅球区域进行细节分析 (图 3-GFP、图 3-Repo) 可鉴定出 86E01 神经细胞为神经胶质细胞，但 86E01 并不能表达出果蝇大脑中的所有神经胶质细胞。说明 86E01 可实现成蝇脑部部分神经胶质细胞的表达，但如果要实现特定脑区神经胶质细胞的表达，还需进一步改造基因，从而研究特定脑区神经胶质细胞的功能。

图 3. 成蝇大脑的 GFP 遗传标记与免疫组化. 果蝇基因型为 86E01-Gal4/UAS-GFP, 使用 mouse-anti-repo (红色) 对果蝇整个大脑进行免疫染色, GFP 自带荧光 (绿色), 标尺为 50 μ m。图中虚线圈内为果蝇大脑嗅球区域 (AL, antennal lobe)。两小图为对成蝇脑部嗅球区域的细节放大图。

溶液配方

1. 0.3% PBST 溶液

0.6% Triton X-100 水溶液与 20 $\times$ PBS 缓冲液混合, 调 pH 至 7.4, 4 $^{\circ}$ C 保存

2. 固定液 (4% PFA)

2 $\times$ 0.3% PBST 与 8%多聚甲醛按照 1:1 的比例混合均匀, 4 $^{\circ}$ C 保存

3. 封闭液 (5% NGS)

950 μ l 0.3% PBST 溶液加入 50 μ l NGS, 现用现配, 4 $^{\circ}$ C 保存

注: NGS 溶液应避免反复冻融, 在超净台严格无菌状态下进行分装操作。

4. 一抗溶液

Mouse-anti-repo 抗体按照 1:200 的比例使用 5% NGS 溶液稀释, 4 $^{\circ}$ C 保存

5. 二抗溶液

Anti-mouse Alexa Fluor 555 按照 1:500 比例使用 5% NGS 溶液稀释, 4 $^{\circ}$ C 避光保存

注: 免疫荧光多标色时, 应选用动物种属差异较大的抗体, 同时选用发射波长差异较大的荧光素作为标记物。

致谢

感谢国家自然科学基金 (31571089、31730045) 对本工作的支持；感谢陈彦博、郭靖对本实验的技术支持；感谢陈彦博提供的 86E01-Gal4/UAS-GFP 品系果蝇；本方法改编自 2006 年发表在 *Nature Protocol* 的 A protocol for dissecting *Drosophila melanogaster* brains for live imaging or immunostaining (Wu 等, 2006)。

参考文献

1. 吕国蔚, 李云庆. (2011). 神经生物学实验原理与技术. 科学出版社.
2. Chi-Castaneda, D. and Ortega, A. (2018). [Glial cells in the genesis and regulation of circadian rhythms](#). *Front Physiol* 9: 88.
3. Kazama, H. (2015). [Systems neuroscience in *Drosophila*: Conceptual and technical advantages](#). *Neuroscience* 296: 3-14.
4. Misteli, T. and Spector, D. L. (1997). [Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology](#). *Nat Biotechnol* 15(10): 961-964.
5. Sun, J., Liu, C., Bai, X., Li, X., Li, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Guo, J. and Li, Y. (2017). [Drosophila FIT is a protein-specific satiety hormone essential for feeding control](#). *Nat Commun* 8:14161.
6. Wu, J. S. and Luo, L. (2006). [A protocol for dissecting *Drosophila melanogaster* brains for live imaging or immunostaining](#). *Nat Protoc* 1(4): 2110-2115.
7. Zwarts, L., Van Eijs, F. and Callaerts, P. (2015). [Glia in *Drosophila* behavior](#). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 201(9): 879-893.