果蝇幼虫脂滴的标记观察

Drosophila Larva Lipid Droplet Staining

赵雪璠, 黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式: 赵雪璠, 黄勋. (2019). 果蝇幼虫脂滴的标记观察. *Bio-101* e1010272. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010272.

How to cite: Zhao, X. F. and Huang, X. (2019). *Drosophila* larva lipid droplet staining. *Bio-101* e1010272. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010272.

摘要: 脂滴是细胞内重要的细胞器, 可以通过中性脂染料标记、观察其形态、大小与分布。

关键词: 果蝇幼虫, 脂滴, 染色

材料与试剂

1. 载玻片
2. 染色皿
3. EP 管
4. 锡箔纸
5. 果蝇幼虫
6. 甘油
7. 指甲油
8. 1 mg/ml BODIPY494/503 或 0.5 mg/ml Nile red 或 LipidTOX 母液
9. NaCl
10. KCl
11. Na₂PHO₄
12. KH₂PO₄
13. HCl
14. 多聚甲醛

15. 磷酸钠缓冲液
16. 双蒸水
17. 丙酮
18. DMSO 或者无水乙醇
19. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
20. 4% PFA 溶液 (见溶液配方)
21. 4%甲醇溶液 (见溶液配方)
22. DAPI 母液 (20 ng/μl) (见溶液配方)
23. Nile Red (见溶液配方)
24. BODIPY (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊
2. 高压蒸汽灭菌锅或过滤网
3. -20 °C 冰箱
4. 激光共聚焦显微镜或蔡司荧光显微镜

实验步骤

1. 幼虫在实验条件下饲养到三龄幼虫 Wandering 时期。
2. 将适量 PBS 缓冲液滴于载玻片上，果蝇三龄幼虫置于液滴中。室温条件下，用解剖镊解剖，分离出脂肪体。将分离好的组织放于含有 PBS 缓冲液的染色皿中。
3. 吸干 PBS 缓冲液，用 4%多聚甲醛 (PFA) 在室温下固定 30 min。
4. 吸干 PFA 溶液，用 PBS 清洗 3 次，每次 10 min。
5. 根据需要，用 PBS 按 1:1,000 稀释 1 mg/ml 的中性脂染料 BODIPY494/503 或按 1:2,500 稀释 0.5 mg/ml Nile red 或按 1:100 稀释的 LipidTOX。染料室温染色 1 小时或 4 °C 过夜。染色时应注意避光。(Liu 等, 2014)
6. 吸干染料溶液，用 PBS 清洗 3 次，每次 10 min。
7. 按照 1:10 稀释 20 ng/μl DAPI 母液，并染色 5 min。染色时应注意避光。
8. 吸走 DAPI，用 PBS 清洗 3 次，每次 10 min。

9. 80%甘油压片，用指甲油封片。封片后应尽快进行拍摄。如需保存样品，应避光并放于 4 °C。
10. 用激光共聚焦显微镜或者蔡司荧光显微镜扫描样品 (图 1)。

图 1. 野生型果蝇三龄幼虫脂肪体脂滴染色. 蓝色荧光标示染料 DAPI 着色的细胞核; 绿色荧光标示中性脂染料着色的脂滴; 放大倍数: 40 倍。

溶液配方

1. 1× PBS 缓冲液
 - 137 mmol/L NaCl
 - 2.7 mmol/L KCl
 - 10 mmol/L Na₂HPO₄
 - 2 mmol/L KH₂PO₄
 用 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂PHO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄。用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1 L。分装后在 15 psi (1.05 kg/cm²) 高压蒸汽灭菌 20 min, 或过滤除菌, 室温保存
2. 4% PFA
 - 10 g 多聚甲醛溶解在 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (250 ml), 60 °C 加热搅拌至澄清, 调 pH 到 7.4。配制好的溶液于 4 °C 保存
3. 4%甲醇溶液
 - 4 ml 甲醇溶解于 96 ml 蒸馏水
4. DAPI 母液 (1 mg/ml)
 - 10 mg DAPI 粉末加入 10 ml 双蒸水中配制成 1 mg/ml 母液, 分装在 10 个 EP 管中, 用锡箔纸包裹, 置于-20 °C 冰箱保存。实际使用时, 将母液 1:5,000 稀释

5. Nile Red (0.5 mg/ml)

用丙酮配制 0.5 mg/ml 的母液，配制好的溶液于 4 °C 保存。用时 1:500~1:2,000 稀释

6. BODIPY (1 mg/ml)

用 DMSO 或者无水乙醇配制 1 mg/ml 母液，用时 1:500~1:1,000 稀释。配制好的溶液于 4 °C 保存

参考文献

1. Liu, Y., Wang, W., Shui, G. and Huang, X. (2014). [CDP-diacylglycerol synthetase coordinates cell growth and fat storage through phosphatidylinositol metabolism and the insulin pathway](#). *PLoS Genet* 10(3): e1004172.