果蝇幼虫大脑的免疫荧光染色与观察

Immunofluorescent Staining of *Drosophila* Larval Brain

丛飞*, 鲍红村, 徐骁, 杨小杭, 戈万忠*

遗传学研究所, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: evacf@163.com; wanzhongge@zju.edu.cn

引用格式: 丛飞, 鲍红村, 徐骁, 杨小杭, 戈万忠. (2019). 果蝇幼虫大脑的免疫荧光染色与观察. *Bio-101* e1010278. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010278.

How to cite: Cong, F., Bao, H. C., Xu, X., Yang, X. H. and Ge, W. Z. (2019). Immunofluorescent staining of *Drosophila* larval brain. *Bio-101* e1010278. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010278. (in Chinese)

摘要: 果蝇幼虫大脑是研究干细胞不对称分裂 (Neumuller 和 Knoblich, 2009)、神经细胞发育与功能 (Spindler 和 Hartenstein, 2010)、神经系统环路形成 (Perry 等, 2017) 等众多神经发育生物学相关问题的理想模型。如何能够识别脑部不同细胞类型, 区分脑部不同功能区域, 标记感兴趣的蛋白在大脑中的定位是开展脑内研究的重要步骤。本实验将通过免疫学基本原理, 利用一抗定位抗原, 之后加入荧光二抗进行标记及信号放大, 进而能在共聚焦显微镜下观察到一种或多种荧光信号, 实现对感兴趣的蛋白或组织在脑部的特异性标记。本实验需 2~3 天完成, 适用于观察各个阶段的果蝇幼虫大脑。

关键词: 果蝇, 大脑, 免疫荧光染色

材料与试剂

1. 牙签
2. 透明指甲油
3. 锡箔纸
4. 海绵或纸巾
5. 口罩
6. 1.5 ml EP 管
7. 50 ml 离心管
8. 1 ml 无菌注射器
9. 0.22 μ m 过滤器 (Millipore)

10. 载玻片 (Fisher Scientific, catalog number: 12-550-15)
11. 盖玻片 (18 × 18 mm, Fisher Scientific, catalog number: 12-542A)
12. 玻璃皿或三孔解剖皿 (Fisher Scientific, catalog number: 21-379)
13. 果蝇幼虫
14. 中性树脂 (国药化学试剂, catalog number: 10004160)
15. 一抗 (根据实验所需)
16. 荧光二抗 (根据实验所需)
17. TO-PRO-3 (Invitrogen, catalog number: T3605)
18. 防淬灭剂 Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, catalog number: H-1000)
19. 胎牛血清 Bovine Serum Albumin, BSA (BBI Life Sciences, catalog number: A600332-0100)
20. 昆虫培养液 Schneider's Insect Medium, SD (Sigma, catalog number: S9895-1L)
21. Triton X-100 (Sigma, catalog number: 9002-93-1)
22. 多聚甲醛 (8% paraformaldehyde; Electron Microscopy Sciences; catalog number: 157-8)
23. Na_2HPO_4
24. KH_2PO_4
25. NaCl
26. KCl
27. HCl
28. PBS 溶液 (见溶液配方)
29. PBT 溶液 (见溶液配方)
30. 固定液 (4%多聚甲醛) (见溶液配方)
31. 封闭液 (见溶液配方)
32. SD 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀
2. 精细解剖镊 (Dumont, World Precision Instruments; no.5)

3. 解剖体视镜
4. 水平滚动式摇床
5. 实时激光共聚焦显微镜

实验步骤

1. 实验准备

1.1 观察片制作

将牙签尖端剪断，沾取适量的中性树脂，在载玻片上点两个大小相当、相距约 1.5 cm 的树脂液滴 (图 1A)。将两片小于载玻片宽度的盖玻片分别盖在液滴上，间距 5 mm。两根手指均匀用力的按压盖玻片，使树脂均匀分散，填充于载玻片与盖玻片间的空隙，空隙大部分被填满且没有溢出树脂 (图 1B)。制作成功的观察片应是树脂厚度一致，盖玻片间凹槽光滑垂直。将做好的观察片在室温下放置一天以上，保证树脂充分凝固，盖玻片不会移动。

注：

- 1) 牙签沾取的树脂不应过多或过少，过多会在压制过程中从盖玻片边缘溢出，过少则不能有效固定盖玻片且会在后续过程中浪费防淬灭剂。按压盖玻片时要保证两片盖玻片加上树脂后的厚度相同，使放置样品后再加盖的盖玻片保持水平。
- 2) 中性树脂有毒，请带口罩操作。

图 1. 观察片的制作. A. 将树脂滴于载玻片. B. 用盖玻片覆盖中性树脂。

1.2 溶液准备

- 1) 将 1 ml SD 溶液加入到 1.5 ml EP 管中。将 EP 管放置在冰盒上。

2) 将 PBS 溶液从 10×母液中稀释好, 调整 pH。

3) 用 1× PBS 溶液配制 PBT 溶液及封闭液。

2. 果蝇幼虫大脑解剖

2.1 将需要解剖的果蝇幼虫取出, 在盛有 PBS 的玻璃皿中洗去附着的食物等杂物, 重新放置在新的盛有 PBS 的玻璃皿或解剖板中。

2.2 两手持解剖镊, 一把镊子夹住幼虫头部即黑色牙齿部分 (图 2A), 另一把镊子夹住幼虫身体前三分之一处并向尾部均匀用力拉, 直到幼虫身体断裂 (图 2B)。

2.3 固定头部的镊子保持不动, 另一把镊子将其余不需要的组织摘除, 保留头部皮质、牙齿、大脑及少量其他组织 (图 2C)。可以先将身体后半段的肠子、脂肪等先去除, 再将靠近头部的唾液腺、成虫盘等去除。解剖数量视实验所需, 一般每个样品 10~20 只。

2.4 将剖好的组织块放入冰上盛有 SD 溶液的 EP 管中。整个样品解剖过程应尽量短, 最长不超过 20 分钟。

注: 由于幼虫大脑较小且容易损伤, 所以解剖时要保留部分组织, 防止在后续操作中幼虫大脑丢失或破损。

图 2. 果蝇幼虫大脑的解剖. A. 用镊子固定幼虫. B. 拉断幼虫暴露出组织. C. 摘除多余组织。

3. 果蝇幼虫大脑固定

3.1 将 EP 管中的 SD 溶液吸出, 加入 500 μ l 的 4%多聚甲醛, 室温静置, 固定 15~20 分钟。

3.2 将甲醛吸出, 加入 1 ml PBT 溶液于 EP 管中, 待组织沉于底部后吸出 PBT。重复一次。

3.3 在 EP 管中加入 1 ml PBT 溶液，盖好 EP 管后将 EP 管放于 50 ml 管中用海绵或纸巾固定。将 50 ml 管放在水平滚动摇床上，慢速滚动 10 分钟后吸去 PBT，重复三次。洗去甲醛，结束固定。

注：由于甲醛有毒且具有挥发性，3.1、3.2 步骤应在通风橱中操作。

4. 果蝇幼虫大脑封闭

将 EP 管中 PBT 吸出，加入 1 ml 封闭液进行封闭。同样将 EP 管放入 50 ml 离心管中，在水平滚动摇床上以相同速度滚动 30~60 分钟。后续实验中水平滚动摇床设置不变，不再重复。

5. 果蝇幼虫大脑一抗孵育

将 EP 管中封闭液吸出。将一抗以说明书提供比例用封闭液进行稀释，可多种一抗混合使用。将 1 ml 稀释好的一抗加入 EP 管中，4 °C 滚动摇床滚动过夜 (8 小时) 或常温滚动 2~3 小时。

注：对于特异性不佳的抗体更推荐低温长时间染一抗。

6. 果蝇幼虫大脑一抗清洗

6.1 将一抗吸出。吸出的一抗可 1:1,000 加入叠氮化钠保存，重复使用。

6.2 加入 1 ml PBT 溶液于 EP 管中，待组织沉于底部后吸出 PBT。快洗重复一次。

6.3 在 EP 管中加入 1 ml PBT 溶液，滚动 20 分钟，吸去 PBT。重复三次。完成一抗的清洗。

7. 果蝇幼虫大脑二抗孵育

7.1 将与一抗属性对应的二抗以说明书推荐比例用 PBT 稀释，可多种二抗混合稀释。

7.2 荧光二抗在长时间光照下会发生猝灭，所以稀释后至样品制备结束都应避光保存。此步开始所用 EP 管及 50 ml 管均需用锡箔纸完全包裹，形成避光环境，之后步骤不再重复说明。

7.3 将 1 ml 稀释好的二抗加入样品中，室温滚动 1~2 小时。

8. 果蝇幼虫大脑二抗清洗

8.1 吸出二抗，用 PBT 快洗两次。

8.2 在 EP 管中加入 1 ml PBT 溶液，滚动 20 分钟，吸去 PBT。重复三次。完成二抗的清洗。

9. 果蝇幼虫大脑细胞核染色

将 TO-PRO-3 染料 1:5,000 稀释与 PBT 中，滚动染色 30 分钟。

注：经过多种核染料尝试后发现，幼虫大脑细胞核染色 TO-PRO-3 效果较好，清晰不易淬灭。

10. 果蝇幼虫大脑样品制备完成

将染色液吸出，PBT 快速清洗两次后尽量吸干。滴入防淬灭剂，用量需没过全部样品。将样品放置在 4 °C 冰箱过夜或室温静置 2~3 小时，待样品沉于 EP 管底部时制备结束。样品在 4 °C 避光保存，可保存一周。

11. 样品制片

- 11.1 在共聚焦显微镜观察前制片。准备一张制作好的观察片及一张普通载玻片，放在体视镜的载物台上调整好视野。
- 11.2 将 200 μ l 黄色移液器枪头尖部用剪刀剪去，吸取样品及防淬灭剂至普通载玻片上，将样品中过多的防淬灭剂用注射器吸干 (图 3A)。
- 11.3 两手分别持注射器，在解剖体视镜下用注射器针头将幼虫大脑从组织块上分离，并将连有的成虫盘等去除干净 (图 3B)。
- 11.4 将干净完整的幼虫大脑放置在一只注射器尖端的凹陷中 (图 3C)，从载玻片转移到观察片的凹槽处。用另一只注射器轻轻将大脑拨出，沿其中一侧盖玻片边缘摆放 (图 3D)。
- 11.5 根据观察需要调整大脑摆放的位置角度。例如观察神经干细胞需将两个大脑半球向两侧分开，使大脑中心区域充分暴露。

图 3. 果蝇幼虫大脑样品的制片. A. 将组织块放在载玻片上. B. 清除幼虫大脑外的其他组织. C. 将幼虫大脑转移至注射器尖端. D. 摆放在观察片凹槽一侧边缘。

11.6 所有样品摆放完毕后，用注射器吸取足量的防猝灭剂，轻轻滴加在样品所在凹槽处。待防猝灭剂充分覆盖全部样品及缝隙后，将一片新的盖玻片轻放在样品上，避免产生气泡和移动样品。如果样品片中防猝灭剂不足，需沿缝隙补足。如防猝灭剂过多溢出，需用吸水纸吸掉。

11.7 待防猝灭剂充分分布后，用透明色指甲油轻薄的涂在最上层盖玻片四周，封闭样品。指甲油完全干透后，将制备好的样品片放置在 **4 °C** 避光环境中保存。保存不宜超过一周。

12. 实时激光共聚焦显微镜镜下观察。

结果与分析

正确成功的免疫荧光染色结果包括：幼虫脑部结构完整，形态清晰。荧光信号强度适中，基本无噪点。蛋白染色定位明确，各个样本间一致。

图 4. 果蝇幼虫大脑免疫荧光染色示例图. A. 幼虫大脑两个脑叶，绿色 GFP 标记 II 型神经干细胞，蓝色 Deadpan 标记神经干细胞，红色 Pros-pero 标记分裂的神经细胞。标尺为 50 μm 。 B. 幼虫大脑一个脑叶，绿色 Deadpan 标记神经干细胞，红色 Miranda 标记正处于分裂期的神经干细胞。标尺为 50 μm 。 C. 一个处于分裂中期的神经干细胞，红色 aPKC 标记顶端极性复合体，绿色 Miranda 标记底端极性复合体，蓝色 TOP-3 标记细胞核。标尺为 10 μm 。

失败经验

1. 染色过程中样品漂浮在表面不下沉
 - 1) 解剖的大脑上连有气管、脂肪体等其他组织导致不能沉于底部。
 - 2) PBT 溶液中的 Triton-X 浓度低。
2. 没有观察到荧光信号
 - 1) 所用的荧光二抗属性是否与一抗属性相同，不同属性的抗体不能相互结合。
 - 2) 抗体使用浓度过低或染色时间过短。染色时间短或浓度过低的一抗及二抗都会造成最终荧光信号弱，可根据自己的实验结果调整抗体稀释倍数。
 - 3) 清洗时间过长。抗体染色后的清洗是为了洗去非特异性的结合，减少噪点的产生。但过长时间的清洗可能降低目的蛋白的荧光信号，可适当缩短清洗时间。
3. 观察到非特异性的噪点

- 1) 观察到不应出现的噪点与 2 中的 2), 3) 条目相反, 可降低抗体浓度或延长清洗时间。
- 2) 在一些情况中, 甲醛固定时间过长会造成目的蛋白的定位发生变化, 所以固定时间不应超过 20 分钟。
4. 样品形态变化、软烂不能制片或观察
如果解剖过程没有花费过长时间, 那么一般是由于固定时间不足或固定用甲醛溶液浓度低导致。甲醛有挥发性, 应在通风橱中密封保存, 防止变质和浓度变化。
5. 拍摄过程中样品荧光发生猝灭
 - 1) 荧光信号在强光中会发生猝灭, 所以应该注意拍摄时所用荧光激发强度不易过高或拍摄时间过长。
 - 2) 防猝灭剂有保护样品荧光不易被猝灭的功能, 如果样品没有完全浸泡在防猝灭剂中或浸泡时间不足都会导致荧光的易猝灭。所以样品制备时应加入足量的防猝灭剂, 并保证样品浸透后沉在 EP 管底部后再制片观察。
6. 拍摄过程中样品移动
样品较小时, 拍摄中会移动的概率很大。为了减少这个概率, 在制片过程中要注意以下几点:
 - 1) 将样品从 EP 管吸出放在玻璃片上后, 尽量在不影响后续操作的情况下, 用注射器吸掉样品附着的防猝灭剂。
 - 2) 将不带有多余防猝灭剂的样品转移到观察片上, 在凹槽内整体加入防猝灭剂填充前样品都不要沾到液体且不要过多的移动, 保持样品牢固的黏着在观察片上。
 - 3) 在观察片上摆放样品时, 将样品靠在盖玻片边缘可以一定程度上减少样品的移动。
 - 4) 制片完成前加盖盖玻片时一次完成, 不要再次调整拖动样品。
7. 免疫荧光染色步骤间关联性强、不可逆, 样品较脆弱, 不到最终观察不易发现问题。
当上机观察到问题后并没有较好的挽救措施, 所以操作过程应认真仔细。

溶液配方

1. PBS溶液 (室温保存)
1× PBS 浓度

Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM

10× PBS母液 (1 L) 配制，需高压灭菌

Na ₂ HPO ₄	144 g
KH ₂ PO ₄	24 g
NaCl	800 g
KCl	20 g

使用时将母液用ddH₂O稀释，之后用HCl调整pH至7.4

2. PBT溶液 (室温保存)

1× PBS

0.1% Triton X-100

3. 固定液 (4%多聚甲醛) (通风橱中避光保存)

8%多聚甲醛，10 ml

10× PBS，2 ml

ddH₂O，8 ml

4. 封闭液 (4 °C保存)

PBT

3% BSA

5. SD溶液 (4 °C保存)

依照说明书，将粉末配制成澄清透明溶液，0.22 μm过滤器过滤后用50 ml管分装

致谢

本实验方法参考已发表文章 (Zhang 等, 2016) 和 (An 等, 2017) 中的实验方法。基金支持来自国家重大科学研究计划，2013CB945600。在此一同表示感谢。

参考文献

1. An, H., Ge, W., Xi, Y. and Yang, X. (2017). [Inscuteable maintains type I neuroblast lineage identity via Numb/Notch signaling in the *Drosophila* larval brain.](#) *J Genet Genomics* 44(3): 151-162.

2. Neumuller, R. A. and Knoblich, J. A. (2009). [Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer](#). *Genes Dev* 23(23): 2675-2699.
3. Perry, M., Konstantinides, N., Pinto-Teixeira, F. and Desplan, C. (2017). [Generation and evolution of neural cell types and circuits: Insights from the *Drosophila* visual system](#). *Annu Rev Genet* 51: 501-527.
4. Spindler, S. R. and Hartenstein, V. (2010). [The *Drosophila* neural lineages: a model system to study brain development and circuitry](#). *Dev Genes Evol* 220(1-2): 1-10.
5. Zhang, F., Huang, Z. X., Bao, H., Cong, F., Wang, H., Chai, P. C., Xi, Y., Ge, W., Somers, W. G., Yang, Y., Cai, Y. and Yang, X. (2016). [Phosphotyrosyl phosphatase activator facilitates localization of Miranda through dephosphorylation in dividing neuroblasts](#). *Development* 143(1): 35-44.