果蝇成虫复眼免疫电镜样品的制备及观察

Preparation and Observation of Immunogold Electron Microscopic Samples of Adult Fly Compound Eye

田焱, 韩俊海*

生命科学研究院, 东南大学, 南京市, 江苏省

*通讯作者邮箱: junhaihan@seu.edu.cn

引用格式: 田焱, 韩俊海. (2019). 果蝇成虫复眼免疫电镜样品的制备及观察. *Bio-101* e1010279. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010279.

How to cite: Tian, Y. and Han, J. H. (2019). Preparation and observation of immunogold electron microscopic samples of adult fly compound eye. *Bio-101* e1010279. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010279. (in Chinese)

摘要: 免疫电镜技术是将抗原抗体反应的特异性和电子显微镜的高分辨率相结合的在亚细胞和超微结构水平上对抗原进行定位分析的一种高精度度、灵敏的技术。本文将介绍用电子致密物质胶体金等标记抗体, 然后让其与含有相应抗原的果蝇成虫复眼标本反应, 以适宜电镜观察的方法处理该果蝇成虫复眼标本, 观察时可见电子致密物质的所在位置, 以在超微结构水平上识别抗原、抗体在果蝇成虫复眼的反应部位的免疫电镜方法。

关键词: 免疫电镜, 免疫标记, 电镜, 抗原抗体反应, 果蝇复眼

材料与试剂

1. 鹰牌单面保安刀片 (上海吉列有限公司)
2. Petri dish
3. 砂纸
4. Parafilm 封口膜 (PM996)
5. 包埋板, 30 孔金字塔型包埋板 (进口) (中镜科仪, GP10585)
6. 废液瓶
7. 果蝇
8. 502 胶
9. 超纯水

10. Tris-HCl 缓冲液
11. 无水乙醇 (上海生物工程股份有限公司, catalog number: A500737-0500)
12. 磷酸钠 (江苏永华精细化学品有限公司, HG/T 3493-2000)
13. LR White 树脂 (进口) (中镜科仪, GS02646)
14. 多聚甲醛 (Paraformaldehyde) (Sigma, catalog number: A500737-0500158127)
15. 戊二醛 (Glutaraldehyde solution) (Sigma, catalog number: G7651)
16. Na_3PO_4
17. 胶体金交联的抗鼠, Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Gold antibody produced in goat, IgG (Sigma, catalog number: G7527)
18. 氢氧化钠 (汕头市西腾化工厂有限公司, CAS: 310-73-2)
19. 柠檬酸铅 (进口) (中镜科仪, GA: 10701) (见溶液配方)
20. 醋酸双氧铀 (进口) (中镜科仪, catalog number: GS02624)
21. 山羊血清 (NGS, Sigma)
22. BSA (上海生物工程股份有限公司, catalog number: A600332-0100)
23. Tween 20 (上海生物工程股份有限公司, catalog number: A600560-0500)
24. Tris (上海生物工程股份有限公司, catalog number: A600194-0500)
25. 氯化钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: 746398)
26. 叠氮化钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: S8032)
27. 固定液 (见溶液配方)
28. 封闭液 (见溶液配方)
29. 1%柠檬酸铅染液 (见溶液配方)
30. 2%醋酸双氧铀染液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 高精细弯锯齿头镊子 (中镜科仪, EP5729)
2. 200 目方孔镍网 (进口) (中镜科仪, AP200N)
3. 切片机 (Leica-UC7)
4. 电镜 (Hitachi-7650)
5. 体视显微镜 (Nikon SMZ645)

实验步骤

注：未特殊标明的均为室温静置。

一、样品包埋

Day 1:

1. 配制固定液 (见溶液配方 1)。
2. 取实验所需的果蝇品系 (为保证实验成功率, 一般每个品系 6~8 只成虫), 用刀片将果蝇成虫头部切下, 切除口器后从中间将其切成左右两半 (即每个果蝇品系样品包含 12~16 个果蝇复眼), 放入固定液中 (可用镊子轻夹样品, 将其塞入固定液内, 在维持其浸于固定液内的状态下缓慢将盛固定液的 Eppendorf 管放置在冰上)。
3. 冰上固定 2 小时 (由于固定液毒性较大, 固定完毕应回收至相应的废液瓶内, 由院系统一进行易制毒废液处理)。
4. 用 pH 7.4 的 0.1 M 磷酸钠 (Sodium phosphate) 溶液漂洗 3×10 分钟。
5. 脱水: 依次用 50%、70% 和 90% 的乙醇各脱水 30 分钟。
6. 将样品置于 LR White 和 90% 乙醇体积比 1:1 混合溶液中, 于冷房内 (4 °C) 翻转 1 小时。
7. 将样品置于 LR White 和 90% 乙醇体积比 2:1 混合溶液中, 于冷房内 (4 °C) 翻转 1 小时。
8. 将样品置于 LR White 和 90% 乙醇体积比 2:1 混合溶液中, 于冷房内 (4 °C) 翻转过夜。

Day 2: (均置于 4 °C 冷房内)

9. 换新的纯 LR White 洗 1×2 小时。
10. 换新的纯 LR White 洗 1×2.5 小时。
11. 重复步骤 10。
12. 换新的纯 LR White 放置过夜。

Day 3: 包埋

13. 将烤箱预热至 60 °C。
14. 烘焙尖端: 向包埋板的每个孔内滴加一滴 (约 10 μ l) LR White (如图 1 所示), 放入烤箱内烘焙 3~4 小时 (时长视具体情况而定, 以基本凝固稍有些软度为适)。

图 1. 包埋板及包埋剂填充

15. 烘焙完整样品：取出烘焙好的尖端，用 LR White 填满每个孔 (如图 1 所示)，每个孔内放置一个复眼样品，在体视显微镜下使用镊子拨动复眼以调整其方向，尽量使复眼最凸出的部位朝向正下方 (图 2)。
16. 样品在包埋板的每个孔内放置好后，缓慢将包埋板放至烤箱内 (避免剧烈晃动使得调整好的样品方位改变)，60 °C 烘焙 18 小时 (时长视具体情况而定，过度凝固会使得样品太脆，影响后期切片)。

注：样品包埋好后可一直室温保存，待后续切片。

图 2. 样品在包埋板中朝向示意图

二、切片

如图 3 所示，将包埋好的样品 (金字塔型) 在体视显微镜下切除部分多余的成分，修成相应的形状，顶面按照包埋成形后复眼所处的方向调整切片初始面角度 (修顶面时须把握好与样品之间的距离，太远会使得切片前期空片较多，太近易不小心切得暴露样品；

此外，应尽量保证顶面平整，避免刀痕)，底面用砂纸磨平，用 502 胶粘在圆柱形的塑料底座上，以方便上机切片。

切片：厚度 100 nm，每个 grid (此处为镍网)上放~5 张切片。

图 3. 包埋样品切片前修形示意图

三、染色

Part 1:

1. 取一 Petri dish，内置封口膜，滴加 40 μ l 封闭液/每种样品，将 grid 正面朝上塞入封闭液的液球内，封闭 5 分钟 (为保证有效样品率，每个样品可选 2 片 grid 进行实验)。
2. 以同样的方法将样品孵育一抗 (鼠源) 1 小时 (抗体用封闭液配制)。
3. 准备 2 cm Petri dish，加入 Tris-HCl 缓冲液，将 grids 放入 dish 内进行洗涤，3 $\times$ 5 分钟 (过程中注意分清 grid 的正反面)。
4. 以同样的方法将样品孵育胶体金交联的抗鼠 IgG 1 小时。
5. 重复步骤 3。
6. 取出洗完的 grid，置于滤纸上晾干 (可室温放置较久)。

Part 2:

7. 如图 4 所示，准备一张宽约 5 cm 的封口膜 (长度视样品数量而定，如四种样品约 10 cm)，上下两侧成行排列放置片状 NaOH 固体，将柠檬酸铅滴加在两行 NaOH 中间，每种样品一滴。将 grid 正面朝上塞入液滴内部 (做法同 Part 1 的封闭、一抗、二抗)，静置 6~8 分钟 (具体时间可视最终染色程度进行调整)。

注：染色过程中要尽量减少与空气中的 CO₂ 接触，故在染色的环境中加一些固体的 NaOH 或 0.1 mol/L 氢氧化钠浸湿的滤纸以吸附 CO₂，减少环境中 CO₂ 的污染。

图 4. 铅/铀染色示意图

8. 准备三个 2 cm Petri dish，用超纯水填满，将铅染完的 grids 放入 dish 1 中漂洗后迅速移至 dish 2 中洗 10 秒，再移至 dish 3 中洗 10 秒，随后置于滤纸上晾干。
9. 同步骤 7，准备一张新的封口膜及放置 NaOH，将滴加的液体换为醋酸铀，将 grid 利用水滴表面张力倒扣于醋酸铀液滴表面 (放置切片的那一面贴向液滴表面)，静置 7~8 分钟。
10. 将步骤 8 的三个 dish 内换置新的超纯水，以同样的方法洗涤三次。
11. 置于滤纸上晾干，等待上镜观察。

四、电镜观察

以 80 kV 上镜观察拍摄。图 5 为果蝇复眼免疫电镜结果图，图中展示了野生型果蝇的单个小眼。果蝇的单个小眼包含了七个感光细胞 (R1-R7/8)，其中感光细胞 R1-R6 表达光受体 Rh1。图中通过免疫电镜技术利用 Rh1 的抗体成功标记出在感光细胞 R1-R6 的细胞膜上 (白色虚线内区域显示了 R 细胞的细胞膜区域) 高度聚集的 Rh1 蛋白 (R1-R6 细胞膜中的黑色小点)。

图 5. 电镜观察结果示意图

溶液配方

1. 固定液 (每 1 ml 固定液所含有的溶液体积)

4%多聚甲醛 600 μ l

50%戊二醛 25 μ l

0.5 M Na_3PO_4 200 μ l

双蒸水 175 μ l

注：粉末状多聚甲醛配制成溶液应在通风橱中操作，配制过程中需缓慢少量多次加入 NaOH 以达到完全溶解后定容。

2. 封闭液

5%山羊血清

0.9% NaCl

0.5% BSA

0.1% Tween 20

20 mM NaN_3

10 mM Tris (pH 8.2)

3. 1%柠檬酸铅染液 (柠檬酸铅)

柠檬酸铅 0.1 g，加双蒸水到 10 ml。乳白色柠檬酸铅是悬浊液，要滴加 1 mol/L NaOH，并不时晃动，直至溶液变清亮，最后定容

4. 2%醋酸双氧铀染液 (醋酸铀)

醋酸双氧铀 0.2 g，加双蒸水到 10 ml

致谢

该方法已用于发表文献 (Tian 等, 2013)。

参考文献

1. Tian, Y., Li, T., Sun, M., Wan, D., Li, Q., Li, P., Zhang, Z. C., Han, J. and Xie, W. (2013). [Neurexin regulates visual function via mediating retinoid transport to promote rhodopsin maturation.](#) *Neuron* 77(2): 311-322.