果蝇幼虫唾液腺组织中线粒体荧光蛋白标记观察

Observation of Mitochondrial Fluorescent Protein Markers in *Drosophila* Larvae Salivary Gland Tissues

杨晓, 黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京

*通讯作者: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式: 杨晓, 黄勋. (2019). 果蝇幼虫唾液腺组织中线粒体荧光蛋白标记观察. *Bio-101* e1010285. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010285.

How to cite: Yang, X. and Huang, X. (2019). Observation of mitochondrial fluorescent protein markers in *Drosophila* larvae salivary gland tissues. *Bio-101* e1010285. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010285. (in Chinese)

摘要: 线粒体是细胞内重要的能量与物质代谢中心。可以通过免疫荧光染色法和线粒体荧光蛋白 (LaJeunesse 等, 2004) 标记法观察并检测细胞内线粒体的形态、大小与分布状态。本实验通过线粒体定位的 EYFP 来观察果蝇组织细胞中线粒体的形态大小与分布状态。

关键词: 果蝇, 唾液腺, 脂肪组织, 线粒体, 线粒体荧光标记蛋白

材料与试剂

1. 培养皿
2. 载玻片和盖玻片
3. (可选) 过滤灭菌器
4. EP 管
5. 锡箔纸
6. 果蝇样本
7. 甘油
8. 指甲油
9. NaCl
10. KCl

11. Na_2HPO_4
12. KH_2PO_4
13. HCl
14. 多聚甲醛
15. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
16. 4% PFA 溶液 (见溶液配方)
17. DAPI 母液 (20 ng/μl) (见溶液配方)
18. 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊
2. (可选) 高压蒸汽灭菌锅
3. -20 °C 冰箱
4. 激光共聚焦显微镜或者荧光显微镜 (Leica, model: Leica SP8)

实验步骤

1. 将带有 *sqh-EYFP-Mito* 的果蝇亲本 (BL7194) 与待检测的果蝇亲本杂交；幼虫在实验条件下饲养到三龄幼虫 Wandering 时期。
 注：若用 *UAS-GFP*，购买 BDSC 果蝇编号为 BL8442。实验条件温度若无 *GAL4* 系统则用 25 °C 培养，若用 *UAS-GAL4* 系统，则用 29 °C 培养。
2. 在 PBS 缓冲液中用解剖镊解剖三龄幼虫分离唾液腺组织；将组织放置于含有 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. 按照 1:10 稀释 20 ng/μl DAPI 母液，并染色 5 min。
6. 吸走 DAPI，用 PBS 清洗 3 次。
7. 80%甘油压片，用指甲油封片。
8. 用激光共聚焦显微镜或者荧光显微镜扫描样品 (图 1)。检测光谱为 EYFP 检测光谱，激发光 488 nm 波长。

图 1. 果蝇唾液腺细胞 mito-EYFP

溶液配方

1. 1× PBS 缓冲液

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

用 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ 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, 或通过过滤除菌, 保存至室温

2. 4% PFA

10 g 多聚甲醛溶解在 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (250 ml), 加热 60 °C 搅拌至澄清, 调整 pH 到 7.4

3. DAPI 母液

1 mg/ml

10 mg DAPI 粉末加入 100 ml 双蒸水中配置成 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

4. 0.1 M 磷酸钠缓冲液

3.0 g NaH₂PO₄, 14.2 g Na₂HPO₄, 溶解到 1,250 ml 蒸馏水中

参考文献

1. LaJeunesse, D. R., Buckner, S. M., Lake, J., Na, C., Pirt, A. and Fromson, K. (2004). [Three new *Drosophila* markers of intracellular membranes](#). *Biotechniques* 36(5): 784-788, 790.