果蝇肠道组织免疫荧光染色

Immunofluorescence Staining of *Drosophila* Intestine

石林, 马虎兵, 赵航, 李周华*

首都师范大学, 北京

*通讯作者邮箱: zhli@cnu.edu.cn

引用格式: 石林, 马虎兵, 赵航, 李周华. (2019). 果蝇肠道组织免疫荧光染色. *Bio-101* e1010291. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010291.

How to cite: Shi, L., Ma, H. B., Zhao, H. and Li, Z. H. (2019). Immunofluorescence staining of *Drosophila* intestine. *Bio-101* e1010291. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010291. (in Chinese)

实验原理: 免疫荧光染色技术是基于具有荧光色素标记的特异性抗体和待测抗原进行结合, 进而通过激光激发荧光色素来实现在组织和细胞中对某种特定蛋白的定性检测技术。本实验方法使用的第一抗体不作荧光标记, 使用与第一抗体种属相同抗体的 Fc 段作为抗原免疫动物而制备的抗抗体, 即第二抗体, 并用荧光素标记第二抗体。反应时, 特异性的第一抗体与细胞中相应的待测抗原反应结合, 然后缓冲液洗掉未结合的第一抗体, 再用荧光素标记的第二抗体与结合在抗原上的第一抗体结合, 最终形成抗原—抗体—荧光抗体复合物。在激光扫描共聚焦显微镜下, 通过相应波长的激光激发荧光素, 从而接受信号形成图像。

实验目的: 检测某种特定蛋白在果蝇肠道细胞中的表达分布情况。

关键词: 果蝇, 肠道, 免疫荧光染色

材料与试剂

一、实验材料

1. 实验器具

1) 玻璃器皿

量筒: 1,000 ml, 100 ml, 50 ml

蓝盖瓶: 1,000 ml, 250 ml, 100 ml

烧杯

2) 一次性耗材

1.5 ml EP 管

50 ml 离心管

一次性枪头: 1,000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l

3) 多道计时器

4) 解剖器具

镊子 (DUMONT #5)

解剖用塑料培养皿 (直径 30 mm)

5) 载玻片: 25 $\times$ 75 mm, 厚度 1.0 mm

6) 盖玻片: 18 $\times$ 18 mm

7) 移液器: 1,000 μ l, 200 μ l, 10 μ l, 2 μ l (Eppendorf)

二、溶液与试剂

1. HCl

2. NaOH

3. NaCl

4. KCl

5. Na₂HPO₄

6. KH₂PO₄

7. Triton X-100 (Amresco)

8. 多聚甲醛 (PFA) (Sigma)

9. HEPES (Sigma)

10. 牛血清蛋白 (BSA) (Sigma)

11. 叠氮化钠

12. 甘油

13. DAPI (Beyotime)

14. 荧光标记的二抗

15. 1% Triton X-100 (见溶液配方)

16. 10%多聚甲醛 (PFA) (见溶液配方)

17. PBT (见溶液配方)

18. 1 M HEPES (见溶液配方)

19. 3%牛血清蛋白 (BSA) (见溶液配方)
20. 70%甘油 (GD) (见溶液配方)
21. 10%叠氮化钠 (见溶液配方)
22. 一抗工作液 (见溶液配方)
23. 二抗工作液 (见溶液配方)

仪器设备

1. MilliQ 纯水仪 (Millipore)
2. 磁力搅拌器
3. 数显恒温水浴锅 (江苏金坛市亿通电子有限公司)
4. 医用低温保存箱-20 °C (海尔)
5. 医用冷藏箱 4 °C (海尔)
6. 高压蒸汽灭菌器 (青岛胜方分析仪器有限公司, model: YXQ-LS-50SII)
7. 电子秤 (YUEPING)
8. pH 计 (SANXIN, model: MP512)
9. 体式显微镜及冷光源 (AmScoPe, model: LG-150)
10. 斜摇床 (Kylin-Bell, model: TS-8)
11. 平摇床
12. 激光扫描共聚焦显微镜 (ZEISS)

实验步骤

一、第一天：解剖、固定、封闭

1. 在 1× PBS 中解剖出果蝇肠道,用镊子把解剖好的果蝇肠道转移到装有固定液的 EP 管中。
2. 果蝇肠道在固定液中固定 20 分钟 (放在斜摇床上摇动, 转速 10, 保证样品不要沉在 EP 管底部)。
3. 吸弃固定液, 加入 500 μ l 1× PBT 润洗一次 (颠倒混匀三次即可)。
4. 吸弃 PBT, 再加入 500 μ l 1× PBT, 放在平摇床上摇动, 洗 5 分钟。

5. 吸弃 PBT (确保全部吸干净), 加入 200 μ l 3% BSA, 放在斜摇床上摇动, 封闭 1 小时。
6. 吸弃 3% BSA (确保全部吸干净), 加入 200 μ l 目的抗体, 即一抗, 放在斜摇床上, 转速 10, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

二、第二天: 孵育二抗

1. 回收一抗, 加入 500 μ l 1 $\times$ PBT 润洗一次 (颠倒混匀三次即可)。
2. 吸弃 PBT, 再加入 500 μ l 1 $\times$ PBT, 放在平摇床上摇动, 洗 5 分钟。
3. 吸弃 PBT (确保全部吸干净), 加入 200 μ l 二抗, 放在斜摇床上摇动, 室温避光孵育 1.5 小时~2 小时 (时间不宜太长)。
4. 吸弃二抗, 加入 500 μ l 1 $\times$ PBT 润洗一次 (颠倒混匀三次即可)。
5. 吸弃 PBT, 再加入 500 μ l 1 $\times$ PBT, 放在平摇床上摇动, 洗 5 分钟。
6. 吸弃 PBT (确保全部吸干净), 加入 GD (约 30~50 μ l 全部覆盖住样品即可), 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。
7. 制片: 用 200 μ l 移液枪装配剪去约 0.5 cm 枪头, 将样品吸到载玻片表面 (甘油不宜太多, 甘油太多在共聚焦显微镜下观察时样品容易移动), 用镊子去除多余的果蝇表皮和其他组织, 盖上载玻片。
8. 在激光扫描共聚焦显微镜下观察样品, 并保存结果图 (如图 1)。

图 1. 果蝇肠道免疫荧光染色图. 果蝇肠道细胞类型分为肠道干细胞 (ISC)、早期未分化细胞 (EB)、分泌细胞 (EE)、吸收细胞 (EC), 图中蓝色为 DAPI 标记细胞核, 绿色为 GFP 标记 ISC 和 EB 细胞, 红色为 LacZ 标记 EB 细胞。标尺: 20 μ m。

溶液配方

1. 固定液 (1 ml)

1× PBS 500 μl

1 M HEPES 100 μl

10% PFA 400 μl

混匀 (现用现配)

2. 1× PBS (pH = 7.4) (1,000 ml)

1) 称量 8.0 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na₂HPO₄; 0.24 g KH₂PO₄ 加入 1,000 ml 烧杯中

2) 加入 800 ml 纯水, 把烧杯放在磁力搅拌器上不停搅拌, 至完全溶解

3) 用 HCl 调 pH 值至 7.4

4) 加纯水定容至 1 L, 倒入蓝口瓶中, 在 15 lbf/in² (1,034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 21 min。保存于室温

3. PBT (1× PBS + 0.1% Triton X-100) (1,000 ml)

1) 用 1,000 ml 量筒量取 1,000 ml 1× PBS

2) 加入 1 ml Triton X-100 (Amresco), 在磁力搅拌器上充分搅拌混匀

4. 10%多聚甲醛 (PFA) (100 ml)

1) 称量 10 g PFA 粉末 (Sigma), 加入到 80 ml 1× PBS 中

2) 再加入 400 μl 10 M NaOH, 放入 60 °C 水浴锅中至粉末完全溶解, 期间摇匀 2~3 次

3) 将已溶解的 PFA 溶液取出放在室温, 使其自然冷却至室温, 用 1× PBS 定容至 100 ml

4) 4 °C 保存

5. 1 M HEPES (100 ml)

1) 称量 23.83 g HEPES (Sigma) 加入到 80 ml 蒸馏水中

2) 完全溶解后加入 10 M NaOH 调 pH 至 7.4

3) 加入蒸馏水定容至 100 ml

4) 4 °C 保存

6. 3%牛血清蛋白 (BSA) (50 ml)

1) 称量 1.5 g BSA (Sigma) 溶于到 30 ml 1× PBT 中

- 2) 再加入 1 ml 10%叠氮化钠
- 3) 用 1× PBT 定容至 50 ml
7. 70%甘油 (GD) (100 ml)
量取 30 ml PBS 和 70 ml 甘油, 混匀, 室温保存
注: 为防止荧光淬灭, 可以考虑在 70%甘油中加入适量的防荧光淬灭剂, -20 ° C 避光保存。
8. 10%叠氮化钠 (100 ml)
称量 10 g 叠氮化钠粉末溶于 100 ml 蒸馏水中, 4 °C 保存
9. 一抗工作液
 - 1) 用 3% BSA 稀释抗体, 根据所用抗体说明书的要求按比例稀释
 - 2) 4 °C 保存; 可重复使用
10. 二抗工作液 (1 ml)
取 1 ml PBT 溶液, 按比例加入 DAPI (终浓度 0.125 µg/ml)、荧光标记的二抗 (按说明书要求稀释)
注: 现用现配; DAPI 和带荧光的二抗注意避光保存。

致谢

该实验方案改编自首都师范大学马梅芳硕士毕业论文 (2016); 使用该实验方案发表的文章: Li等, 2013, 2014; Ren等, 2015; Ma等, 2016。

参考文献

1. Li, Z., Zhang, Y., Han, L., Shi, L. and Lin, X. (2013). [Trachea-derived dpp controls adult midgut homeostasis in *Drosophila*](#). *Dev Cell* 24(2): 133-143.
2. Li, Z., Guo, Y., Han, L., Zhang, Y., Shi, L., Huang, X. and Lin, X. (2014). [Debra-mediated Ci degradation controls tissue homeostasis in *Drosophila* adult midgut](#). *Stem Cell Reports* 2(2): 135-144.
3. Ren, W., Zhang, Y., Li, M., Wu, L., Wang, G., Baeg, G. H., You, J., Li, Z. and Lin, X. (2015). [Windpipe controls *Drosophila* intestinal homeostasis by regulating JAK/STAT pathway via promoting receptor endocytosis and lysosomal degradation](#). *PLoS Genet* 11(4): e1005180.