果蝇精巢免疫荧光染色

Immunofluorescent Staining of *Drosophila* Testis

赵航, 石林, 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: 赵航, 石林, 李周华. (2019). 果蝇精巢免疫荧光染色. *Bio-101* e1010292. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010292.

How to cite: Zhao, H., Shi, L. and Li, Z. H. (2019). Immunofluorescent staining of *Drosophila* testis. *Bio-101* e1010292. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010292. (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精巢中的表达分布情况。

关键词: 果蝇, 精巢, 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

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

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 (CITOGLAS, REF1A5101)

6) 盖玻片: 18 $\times$ 18 mm

二、实验对象

1. 雄果蝇

三、试剂与溶液

1. HEPES (Sigma)

2. NaOH

3. 1 $\times$ PBS (HyClone)

4. Triton X-100 (Amresco)

5. 多聚甲醛 (PFA) (Sigma)

6. 牛血清蛋白 (BSA) (Sigma)

7. 叠氮化钠 (Amresco)

8. 甘油 (Amresco)

9. DAPI (Beyotime)

10. 一抗

11. 荧光标记的二抗 (Jackson ImmunoResearch)

12. PBT (1 $\times$ PBS + 0.1% Triton X-100) (见溶液配方)

13. 10%多聚甲醛 (PFA) (见溶液配方)

14. 1 M HEPES (见溶液配方)

15. 3%牛血清蛋白 (BSA) (见溶液配方)

16. 70%甘油 (GD) (见溶液配方)

17. 10%叠氮化钠 (见溶液配方)

18. 一抗工作液 (见溶液配方)

19. 二抗工作液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子: DUMONT #5 两把
2. MilliQ 纯水仪 (Millipore)
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. 移液器 2/10/200/1,000 μ l (Eppendorf)
10. 体式显微镜及冷光源 (AmScoPe, model: LG-150)
11. 斜摇床 (Kylin-Bell, model: TS-8)
12. 激光扫描共聚焦显微镜 (Zeiss, model: 780)

实验步骤

1. 配制固定液

按照 PBT、10%多聚甲醛溶液、1 M HEPES 溶液体积比 5:4:1, 在 1.5 ml EP 管中配制固定液, 每管 500 μ l (固定液现用现配, 500 μ l 固定液中果蝇精巢样品数量不宜过多, 一般不超过 30 只)。

2. 解剖

在 30 mm 培养皿倒入 1 $\times$ PBS, 左手用镊子夹住雄果蝇胸部, 浸入到 PBS 溶液中, 使镊子与果蝇在培养皿底部保持不动, 不要松手。右手用镊子夹住果蝇腹部最后一节, 向果蝇后方轻轻拉去, 果蝇精巢会随着生殖器和最后一节表皮的扯掉而被拉出来。将拉出来的组织放入配制好的固定液中。

3. 固定

果蝇精巢中放在斜摇床上摇动, 转速 20, 固定 20 分钟 (保证样品摇动, 不要沉在 EP 管底部)。

4. 清洗

吸弃固定液，加入 500 μ l PBT，快洗一次 (轻轻颠倒三次即可)。吸弃 PBT，再加入 500 μ l PBT，放在平摇床上摇动，转速 20，慢洗 5 分钟。重复慢洗步骤，一共慢洗三次。

5. 封闭

吸弃 PBT，加入 300 μ l 3% BSA，放在斜摇床上摇动，转速 20，封闭 1 小时。

6. 配制一抗工作液

用 3% BSA 按一定比例稀释一抗，建议进行预实验，设制抗体浓度梯度寻找最适浓度，商业抗体可参考说明书推荐比例。

7. 孵育一抗

吸弃 3% BSA (此处确保全部吸干净)，加入 50~100 μ l 一抗工作液，放在斜摇床上，转速 20，4 $^{\circ}$ C 过夜孵育 (至少 10 小时)。

8. 回收一抗工作液并清洗

将一抗工作液全部回收，加入 500 μ l PBT，快洗一次 (轻轻颠倒三次即可)。吸弃 PBT，再加入 500 μ l PBT，放在平摇床上摇动，转速 20，慢洗 5 分钟。重复慢洗步骤，一共慢洗三次。

9. 配制二抗工作液

按二抗说明书提前配制二抗储存液，取相应比例的二抗储存液和 DAPI 加入到 PBT 中，每份样品配制 200 μ l 二抗工作液。

10. 孵育二抗

吸弃慢洗的 PBT，加入 200 μ l 二抗工作液，放在斜摇床上摇动，转速 20，室温避光孵育 2 小时。

11. 清洗

吸弃二抗工作液，加入 500 μ l PBT，快洗一次 (轻轻颠倒三次即可)。吸弃 PBT，再加入 500 μ l PBT，放在平摇床上摇动，转速 20，避光慢洗 5 分钟。重复慢洗步骤，一共慢洗三次。

12. 保存及制片

吸弃 PBT (确保全部吸干净)，加入 70%甘油 (约 30~50 μ l 全部覆盖住样品即可)，制片或放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存 (请在两周之内完成制片拍照，两周之后会存在

荧光淬灭的风险)。制片时，剪掉枪头尖端，吸出样品到载玻片上，去掉生殖器和表皮以及其它无关的组织，轻轻盖上盖玻片，用激光扫描共聚焦显微镜 (Zeiss 780) 拍照。

实验结果

在成体果蝇中，中心细胞 (hub) 位于精巢顶端，而胞囊干细胞 (cyst stem cell, CySC) 和生殖干细胞 (germline stem cell, GSC) 与 hub 紧密接触，它们共同形成一个“花环型”结构。每个 GSC 由一对 CySC 包裹，并同时进行不对称分裂，靠近 hub 的子细胞维持干细胞特性，而远离 hub 的子细胞形成一个精原母细胞 (gonialblast, GB) 和两个胞囊细胞 (cyst cell)。然后精原母细胞 (gonialblast, GB) 增殖形成精原细胞 (spermatogonial, SG)，精原细胞经过 4 次不完全有丝分裂，增殖至 16 细胞期，并分化成精母细胞 (spermatocyte, SC)，开始减数分裂，最终分化成精细胞 (Greenspan 等, 2015)。

通过本实验方法，我们对精巢组织中的发育早期细胞进行免疫荧光染色 (图 1)。基于 *gal4/uas* 系统，我们构建了一种在胞囊细胞世系中特异表达的驱动子 *c587-gal4*，驱动胞囊细胞中 *uas-gfp* 表达 (图 1B)。Vasa 在生殖细胞世系中特异表达。我们实验室制备了兔源 Vasa 的抗体。为了寻找合适的稀释比例，我们解剖了多组样品，设置了一抗稀释梯度，使用的二抗是 Cy3 标记的驴抗兔 IgG。图 1C 展示了我们摸索的最适抗体浓度下的染色结果。GFP, DAPI, Cy3 三种荧光的激发光和收集光谱均不同，可以在激光扫描共聚焦显微镜下打开三个通道同时检测。综上，本实验结果较为形象地展示出了精巢组织中发育早期的组织结构，通过对 Vasa 染色将生殖细胞世系与其他类型细胞区分开来，以便于观测生殖细胞的发育状态。

图 1. 成体果蝇精巢顶端组织结构. A. 蓝色显示的是细胞核 DNA。B. GFP 由 *c587-gal4* 驱动，在胞囊细胞世系中特异表达。C. *Vasa* 标记生殖细胞世系。D. 本图显示的是三个通道叠加。图中白色箭头指示中心细胞 hub，比例尺：10 μm 。

溶液配方

1. PBT (1 $\times$ PBS + 0.1% Triton X-100) (1,000 ml)
 - 1) 量取 1,000 ml 1 $\times$ PBS
 - 2) 加入 1 ml Triton X-100，在磁力搅拌器上充分搅拌混匀
2. 10%多聚甲醛 (PFA) (100 ml)
 - 1) 称量 10 g PFA 粉末，加入到 80 ml 1 $\times$ PBS 中
 - 2) 再加入 400 μl 10 M NaOH，放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中至粉末完全溶解，期间摇匀 2~3 次以加速溶解

- 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
3. 1 M HEPES (100 ml)
以配制 100 ml 1 M HEPES 溶液为例：
 - 1) 称量 23.83 g HEPES 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
4. 3%牛血清蛋白 (BSA) (50 ml)
 - 1) 称量 1.5 g BSA 溶于到 30 ml PBT 中
 - 2) 再加入 1 ml 10%叠氮化钠
 - 3) 用 PBT 定容至 50 ml
 - 4) 4 °C 保存
5. 70%甘油 (100 ml)
量取 30 ml 1× 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。
6. 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
7. 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) 放在 4 °C 保存，可重复使用
8. 二抗工作液配制 (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 (按说明书要求配制储存液并稀释至终浓度)； 现用现配
注：DAPI 和带荧光的二抗工作液注意避光保存或使用

致谢

该实验方案改编自首都师范大学赵航硕士毕业论文 (2016); 使用该实验方案发表的文章: Xu等, 2018。

参考文献

1. Xu, R., Li, J., Zhao, H., Kong, R., Wei, M., Shi, L., Bai, G. and Li, Z. (2018). [Self-restrained regulation of stem cell niche activity by niche components in the *Drosophila* testis](#). *Dev Biol* 439(1): 42-51.
2. Greenspan, L. J., de Cuevas, M. and Matunis, E. (2015). [Genetics of gonadal stem cell renewal](#). *Annu Rev Cell Dev Biol* 31: 291-315.