

免疫染色

Immunostaining Assay

程赛凤, 刘源, 陈香嵩, 赵毓*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: zhaoyu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 程赛凤, 刘源, 陈香嵩, 赵毓. (2018). 免疫染色. *Bio-101* e1010136. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010136.

How to cite: Cheng, S. F., Liu, Y., Chen, X. S. and Zhao, Y. (2018). Immunostaining assay. *Bio-101* e1010136. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010136. (in Chinese)

实验原理: 免疫染色类似于动物免疫细胞化学, 是指带显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应, 对相应抗原进行定性、定位、定量测定的技术。水稻免疫染色基本过程为: 将组织酶解分离细胞核后, 用特异性抗体免疫细胞核, 通过荧光标记的二抗孵育, 在荧光显微镜下观测荧光强弱及分布, 从而确定抗原蛋白的性质。

实验目的: 根据使用抗体的类型, 免疫染色可用于检测分析特定细胞时期或不同材料中组蛋白修饰情况, 进而测定相关蛋白活性; 或特定蛋白细胞核内的精细分布。

关键词: 核提取, 抗体, 激光共聚焦

材料与试剂

1. 200 目筛子 (实验室定制)
2. 2 ml 离心管
3. 载玻片
4. 各种型号枪头
5. Parafilm
6. 水稻种子
7. 多聚赖氨酸
8. 进口试剂
 - 1) Mannitol
 - 2) 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)

- 3) Formaldehyde solution (Sigma, catalog number: F8775-500ML)
 - 4) Spermine
 - 5) 4',6-diamidino-2-pHenyindole (DAPI)
 - 6) Mounting Medium for Fluorescence (VECTASHIELD[®], catalog number: H-1000)
 - 7) BSA
 - 8) CaCl₂
 - 9) NaCl
 - 10) EDTA
 - 11) KCl
 - 12) Tris base
 - 13) MgCl₂
 - 14) Na₂HPO₄
 - 15) KH₂PO₄
 - 16) Triton X-100
 - 17) Tween 20%
 - 18) 荧光标记二抗: 根据本实验室 confocal 的激光器类型, 常用的为 Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen, catalog number: A-11029), Alexa Fluor[®] 568 (Invitrogen, catalog number: A-11036)
9. 国产试剂
- 1) Cellulose “Onzuka R-10” (武汉创新生物技术有限公司, catalog number: BE1203)
 - 2) Macerozyme R-10 (武汉创新生物技术有限公司, catalog number: BE0201)
 - 3) Carbenicillin
10. 酶解液 (见溶液配方)
 11. Tris-HCl Buffer (见溶液配方)
 12. LOB1 Buffer (见溶液配方)
 13. Sorting Buffer (见溶液配方)
 14. 10x KPBS (pH 7.2) (见溶液配方)
 15. Blocking solution (见溶液配方)
 16. 生根培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 摇床
2. 量筒
3. 移液枪
4. 镊子
5. 激光共聚焦显微镜或超高分辨率显微镜
6. 真空干燥箱 (Hotpack Vacuum OVEN)
7. 恒温箱 (电热恒温隔水式培养箱, 黄石恒丰医疗器械有限公司)

实验步骤

1. 水稻种子经消毒处理后置于生根培养基 (见生根培养基配方) 上, 在暗室培养一周, 得黄化苗。
2. 取地上部分, 将其剪成 1 cm 大小, 于酶解液 (见溶液配方 1) 中室温酶解 3 小时。
3. 倒掉酶解液, 以蒸馏水冲洗样品 3 次, 于吸水纸上吸掉残留液体。
4. 将样品转移至冰上预冷的、含 4% (体积/体积) 甲醛的 Tris-HCl Buffer (见溶液配方 2) 中。真空交联 30 分钟 (交联步骤可省略)。
5. 倒掉含 4% (体积/体积) 甲醛的 Tris-HCl Buffer, 以预冷的 Tris-HCl Buffer (不含甲醛) 浸没样品, 置于冰上后于摇床上 (50 rpm/min) 洗涤样品 2 次, 10 分钟/次。
6. 倒掉 Tris-HCl Buffer, 于吸水纸上吸干样品水分。再将样品转移至 LOB1 Buffer (见溶液配方 3) 中, 用剪刀充分剪碎样品 (约剪 5 分钟)。
7. 将样品经 200 目筛子过滤两次, 收集滤液至 2 ml 离心管后放置于冰上 (视频 1)。



视频 1. 200 目筛子过滤样品

8. 以 3 倍体积的 Sorting Buffer (见溶液配方 4) 稀释步骤 7 中的滤液，即得到含水稻细胞核的样品 (视频 2)。



视频 2. 涂片细胞核样品的制备

9. 取洁净的载玻片，每两张上涂抹 20 μ l 多聚赖氨酸溶液，室温下晾干，约 30 分钟 (视频 3)。



视频 3. 载玻片多聚赖氨酸包被

10. 将步骤 8 中的样品点样到载玻片中央(120 μ l), 室温下风干至无可流动的液体为止 (风干时间不宜太长; 到此步骤的样品可于-20 $^{\circ}$ C 下存放 3 个月, 见视频 4)。



视频 4. 水稻细胞核涂片

11. 将载玻片置于染缸中, 往其中加入含 4% (体积/体积) 甲醛的 1x KPBS/0.1% Triton X-100 溶液 50 ml (KPBS 见溶液配方 5) 室温下固定样品 30 分钟 (视频 5)。



视频 5. 涂片固定

12. 以 1x KPBS/0.1% Triton X-100(不含甲醛)洗涤载玻片 3 次, 每次 50 rpm/min, 5 分钟/次 (视频 6)。



视频 6. 涂片漂洗

13. 取出载玻片, 于吸水纸上吸走残留液体 (载玻片在吸水纸上立一下即可), 往点有样品的部位加入 Blocking solution 100-200 μ l (见溶液配方 6)。剪取适当大小的 parafilm, 一端向上折一个角后轻轻盖到载玻片上 (注意样品与 parafilm 间不要有气泡!)。取一干净的空引物盒, 内置少许自来水后, 将载玻片平放于引物盒上 (保湿), 于 37 °C 恒温箱中封闭 30 分钟 (视频 7)。



视频 7. 涂片封闭

14. 用镊子夹住 parafilm 折角处，轻轻揭掉 parafilm (最好先浸没在 KPBS 中，再揭掉 parafilm)，室温下以 1x KPBS/0.1% Triton X-100 (不含甲醛) 洗涤载玻片 3 次，每次 50 rpm/min，5 分钟/次。
15. 取出载玻片，于吸水纸上吸走残留液体 (载玻片在吸水纸上立一下即可)，往点有样品的部位按 1:200 或 1:300 (体积/体积) 加入 50 μ l-100 μ l 一抗，剪取适当大小的 parafilm，一端向上折一个角后轻轻盖到载玻片上 (注意样品与 parafilm 间不要有气泡！)。取一干净的引物盒，内置少许自来水后，将载玻片平放于引物盒上(保湿)，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
16. 轻轻揭掉 parafilm(同上)，室温下以 1x KPBS 洗涤载玻片 3 次，每次 50 rpm/min，5 分钟/次。
17. 再次封闭样品，步骤同“13”。
注：以下步骤不宜在强光下进行，实验时室内最好关灯，并把窗帘拉上。
18. 根据一抗的类型，选择合适激发波长的二抗，以 Blocking buffer 按 1:200 的比例稀释二抗。取 100 μ l 加于玻片上，剪取适当大小的 parafilm，一端向上折一个角后轻轻盖到载玻片上 (注意样品与 parafilm 间不要有气泡！)。取一干净的引物盒，内置少许自来水后，将载玻片平放于引物盒上(保湿)，遮光后于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中封闭 2 小时。
19. 轻轻揭掉 parafilm，室温下以 1x KPBS 洗涤载玻片 3 次，每次 50 rpm/min，10 分钟/次。

20. 取出载玻片，于吸水纸上吸走残留液体(载玻片在吸水纸上立一下即可)，往点有样品的部位加入 20 μ l 2 μ g/ml 的 DAPI，再滴加一滴 Mounting Medium for Fluorescence，保湿和减缓荧光淬灭，盖上盖玻片后即可在激光共聚焦显微镜或超分辨率显微镜下观察。(见图 1)

注：水稻的细胞核较小，建议用激光共聚焦显微镜观察时选用油镜。

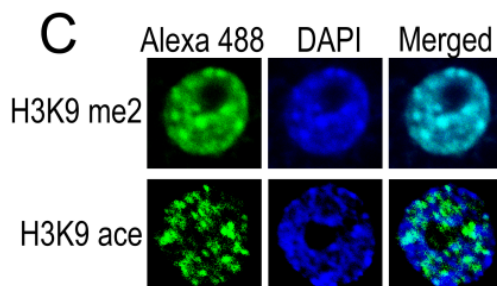


图 1. 免疫染色结果示意图

溶液配方

1. 酶解液 (for 10 ml)

0.6 M Mannitol	1.903 g
10 mM MES (pH=5.7)	1 ml 100 mM MES
1.5% Cellulose "Onzuka R-10"	0.15 g
0.75% Macerozyme R-10	0.075 g
0.1% BSA	0.01 g
1 mM CaCl ₂	0.1 ml 100 mM CaCl ₂
0.25 g/ml CN	2 μ l

55 °C 溶解后自然冷却至室温

2. Tris-HCl Buffer (for 10 ml)

10 mM Tris-HCl (pH=7.5)	100 μ l	1 M Tris-HCl (pH=7.5)
100 mM NaCl	200 μ l	5 M NaCl
10 mM EDTA	200 μ l	0.5 M EDTA (pH=8.0)

3. LOB1 Buffer (for 10 ml)

15 mM Tris-HCl (pH=7.5)	150 μ l	1 M Tris-HCl (pH=7.5)
2 mM EDTA	40 μ l	0.5 M EDTA
0.5 mM spermine	10 μ l	0.5 M spermine

80 mM KCl	800 μ l	1 M KCl
20 mM NaCl	40 μ l	5 M NaCl
0.1% Triton X-100	50 μ l	20% Triton X-100
4. Sorting Buffer (for 10 ml)		
100 mM Tris-HCl (pH=7.5)	1 ml	1 M Tris-HCl (pH=7.5)
50 mM KCl	500 μ l	1 M KCl
2 mM MgCl ₂	20 μ l	1 M MgCl ₂
0.05% Tween 20%	5 μ l	100% Tween
5% sucrose	0.5 g	Sucrose
5. 10x KPBS (pH 7.2)		
1.28 M NaCl		
20 mM KCl		
80 mM Na ₂ HPO ₄		
20 Mm KH ₂ PO ₄		
6. Blocking solution		
1% BAS in 1x KPBS/0.1% Triton-X		
7. 生根培养基		
MS _{max} stock solution (10x)	50 ml	
MS _{min} stock solution (100x)	5 ml	
Fe ₂ EDTA stock solution (100x)	10 ml	
Vitamin stock solution (100x)	10 ml	
Sucrose	20 g	
Phytigel	3 g	

加入单蒸水, 补水到 1,000 ml, 使用 KOH 调节 pH 值到 5.8, 121°C 灭菌 15 分钟。