bio-101 www.bio-protocol.org/e1010263 DOI:10.21769/BioProtoc.1010263

果蝇雌性生殖干细胞免疫组织化学染色

Immunohistochemistry for *Drosophila* Female Germline Stem Cells

石静远 [1, 2]，裘荣文 [1, *]

[1] 北京生命科学研究所，北京；[2] 生命科学学院，北京大学，北京

*通讯作者邮箱：xirongwen@nibs.ac.cn

引用格式：石静远，裘荣文. (2019).果蝇雌性生殖干细胞免疫组织化学染色. *Bio-101* e1010263. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010263.

How to cite: Shi, J. Y. and Xi, R. W. (2019). Immunohistochemistry for *Drosophila* female germline stem cells. *Bio-101* e1010263. Doi: 10.21769/BioProtoc.10101263. (in Chinese)

摘要：果蝇的生殖干细胞是研究干细胞调控和微环境作用的重要模型。利用果蝇的生殖干细胞模型，人们首次证明了干细胞的微环境调控学说。而对于果蝇的生殖干细胞，免疫组织化学是主要的研究手段之一。利用抗原抗体的特异性结合特性，将特定蛋白用其特异性抗体 (IgG) 标记，并通过带有荧光基团的抗体结合已标记蛋白上的 IgG，可以实现组织中特定蛋白质的标记，从而标记特定表达该蛋白的细胞并用于进一步分析。本文以雌性果蝇的卵巢为对象，通过抗 α-Spectrin, Vasa 两种抗体，标记原卵区 (germarium) 的雌性生殖干细胞和其微环境，以便分析雌性生殖干细胞的干性维持和分化。

关键词：果蝇，雌性生殖干细胞，原卵区，微环境

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 2 ml 离心管
3. 载玻片
4. 盖玻片
5. 雌性成体果蝇
6. 指甲油
7. 37%甲醛 (formaldehyde, Sigma, catalog number: F1635)
8. NaH_2PO_4
9. Na_2HPO_4

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

10. NaCl
11. 甘油
12. DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane)
13. Triton™ X-100
14. 羊血清 (NGS)
15. 一抗 (特异性结合目标蛋白)：大鼠抗 Vasa (DSHB, anti-vasa)，小鼠抗 alpha-Spectrin (DSHB, 3A9)
16. 二抗 (带有荧光基团，特异性结合一抗)：Alexa 568 大鼠抗 IgG (Molecular Probes)，Alexa 488 小鼠抗 IgG (Molecular Probes)
17. DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma)
18. 磷酸缓冲液 (1× PBS, pH 7.4) (见溶液配方)
19. PBT (1×) (见溶液配方)
20. 封片剂 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子 (WPI®，Dumoxel 合金镊子，#5 14098)
2. 移液器
3. 解剖板
4. 解剖显微镜 (Leica L2)
5. 摇床
6. 通风橱
7. 荧光显微镜 (Zeiss Meta 510)

实验步骤

一、组织解剖和固定

1. 挑选较年轻的雌性成体果蝇，用二氧化碳麻醉。
2. 在多孔板中倒入 PBS，在解剖显微镜下用镊子将卵巢从果蝇腹部取出，尽可能去除周围的脂肪，肠道等组织，加入带有 500 µl PBS 的 2 ml 离心管中。
3. 在通风橱中加入甲醛至甲醛 4%的体积比，放置在摇床上，在室温下固定 15 分钟。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

4. 使用移液器在通风橱中尽可能地吸去 4%甲醛溶液。
5. 使用 PBT 洗去残留的甲醛溶液，洗三次，每次放置在摇床上 5 分钟。

二、免疫组化染色

1. 吸去清洗的 PBT，加入新 300 µl PBT。
2. 加入羊血清至 5%体积比，用于封闭。
3. 加入两种一抗，大鼠抗 Vasa (1:200)、小鼠抗 α-Spectrin (1:200) 放在放置在摇床上 4 °C 孵育过夜。
4. 使用移液器尽可能多的吸去一抗溶液，并用 PBT 洗去残留的溶液，洗三次，每次放置在摇床上 5 分钟。
5. 吸去清洗的 PBT，加入新的 300 µl PBT。
6. 加入两种二抗，Alexa568 大鼠抗 IgG (1:300)、Alexa488 小鼠抗 IgG (1:300) 放在摇床上常温避光孵育 2 小时。
7. 使用 PBT 洗去残留的二抗，加入新 300 µl PBT，并加入 1 µl DAPI 染色，放置在摇床上，常温避光染色 5 分钟。
8. 使用 PBT 洗三次每次放置在摇床上 5 分钟。
9. 吸去清洗的 PBT，加入 30 µl 封片剂，放入 4 °C 孵育半小时。

三、制片与成像

1. 在解剖显微镜下放置一片载玻片。
2. 用移液器将卵巢和 20 µl 左右封片剂一起转移至载玻片上。
3. 在镜下用镊子剔去较大的卵细胞，留下卵巢前端，并将其轻轻分开，让卵巢小体 (ovariole) 分散在载玻片上。
4. 将盖玻片轻压在载玻片上，让封片剂填充满载玻片与盖玻片间空隙，再放上纸巾轻压，使得多余液体挤出并用纸巾吸干。如有液体不足，可用移液器补加适量封片剂，再重复步骤 4。
5. 之后可以用指甲油密封盖玻片边缘，待指甲油晾干后，用荧光显微镜成像观察。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

结果与分析

果蝇雌性生殖干细胞位于卵巢前部，原卵区的最前端，由它产生的子细胞经过一系列不完全分裂发育成 16 细胞的包囊细胞，并被卵泡细胞包裹成为卵室并出芽离开原卵区，在后续过程中其 16 个中的一个细胞发育为卵母细胞，其他细胞分化为滋养细胞合成卵黄成分，而滋养细胞本身也在之后分解凋亡，最终仅剩下一个卵细胞，形成成熟的卵。这一系列的生殖细胞系，均可通过 Vasa 蛋白的表达特异识别。通过对 Vasa 蛋白的免疫组织化学染色，可以明显观察到在原卵区的生殖细胞系的分化进程 (图 1B)。并且 DAPI 能够将整个原卵区细胞的染色质染色 (图 1A)。这使得我们通过将 DAPI 和 Vasa 的染色结果相结合 (图 1A, 1B)，观察到不属于生殖细胞的体细胞类群，而这些体细胞帮助构成了生殖干细胞干性维持和发育的微环境。

在原卵区里，果蝇雌性生殖干细胞收到微环境提供的 Dpp 信号调控，抑制生殖细胞分化所需的 Bam 基因表达，维持干细胞干性。而干细胞一旦离开提供 Dpp 信号的微环境，Bam 基因的抑制解除，从而促使果蝇雌性生殖干细胞分化。而后续分化过程中，生殖细胞特征的细胞器结构 spectrosome 也会随之变化。生殖干细胞中的 spectrosome 常呈球形或棒状结构，细胞分裂后形成融合体 (fusome) 联通 16 细胞，帮助这其中的物质运输和卵母细胞形成 (Song 等，2004)。而 spectrosome 中包含的 α-Spectrin 蛋白可以作为标记追踪 spectrosome 及之后的融合体的形态 (图 1C)，并帮助观察果蝇雌性生殖干细胞的后续分化过程 (Lin 和 Spradling，1995)。

除了正常免疫染色信号以外，免疫染色有时也会染上一些杂质，影响结果。在原卵区免疫染色中，有时会残留有附着原卵区的结构，例如鞘细胞。这些细胞很容易附着上抗体，造成假阳性的免疫荧光信号，需要注意区别，尽量选择特异性好的抗体。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

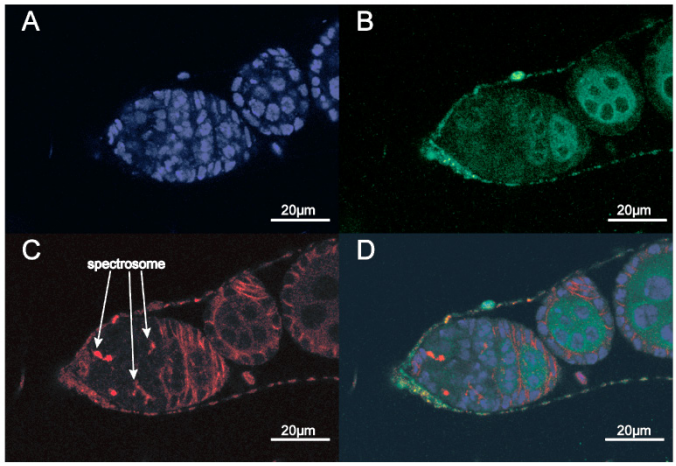

图 1. 果蝇卵巢原卵区免疫组化染色结果. A. DAPI 染色细胞核；B. Vasa 蛋白免疫组化染色，结合的是 Alexa 488 小鼠抗 IgG；C. α-Spectrin 蛋白免疫组化染色，结合的是 Alexa568 大鼠抗 IgG；D. 各个通道染色结果叠加图像。

注意事项

一、荧光信号弱或无信号

1. 一抗与二抗不匹配

   选用与一抗来源物种对应的二抗

2. 一抗或二抗浓度过低

   适当增加抗体浓度

3. 抗体存储不当或污染导致失效

   及时替换新抗体

4. 样品量过多

   减少每管的样品量，每管尽量不超过 5 对卵巢

5. 样品在固定前放置时间过长

   可以将解刨后组织浸泡在 PBS 中并插在冰上暂时保持一段时间 (不超过 3 小时) 至样品固定前

二、背景信号过强或非特异性识别

1. 一抗或二抗浓度过高

   适当降低抗体浓度

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

2. 孵育一抗或二抗后，未洗净多余抗体

   增加洗涤次数

3. 羊血清出现沉淀或变质，导致封闭效果不佳

   换用新的羊血清

4. 制片后长时间未进行成像

   制片后尽快进行成像，或者放到-20 °C 保存

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1× PBS, pH 7.4)

   10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4

   175 mM NaCl

2. PBT (1×)

   1× PBS

   0.1% Triton™ X-100

3. 封片剂

   70%甘油

   2% DABCO

   28% 1× PBS (v/v)

致谢

本文实验方案改编自发表文章 Li 等 (2010) 和 (2016)。

参考文献

1. Li, X., Han, Y. and Xi, R. (2010). Polycomb group genes *Psc* and *Su(z)2* restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes Dev* 24(9): 933-946.
2. Li, X., Yang, F., Chen, H., Deng, B., Li, X. and Xi, R. (2016). Control of germline stem cell differentiation by Polycomb and Trithorax group genes in the niche microenvironment. *Development* 143(19): 3449-3458.
3. Lin, H. and Spradling, A. C. (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Dev Genet* 16(1): 6-12.

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

4. Song, X., Wong, M. D., Kawase, E., Xi, R., Ding, B. C., McCarthy, J. J. and Xie, T. (2004). Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 131(6): 1353-1364.

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.