

果蝇肠上皮的免疫荧光染色

Immunofluorescence Staining of *Drosophila* Intestinal Epithelium

金真, 裘荣文*

北京生命科学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: xirongwen@nibs.ac.cn

引用格式: 金真, 裘荣文. (2019). 果蝇肠上皮的免疫荧光染色. *Bio-101* e1010270. Doi: 10.21769/BioProtoc.101270.

How to cite: Jin, Z. and Xi, R. W. (2019). Immunofluorescence staining of *Drosophila* intestinal epithelium. *Bio-101* e1010270. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010270. (in Chinese)

摘要: 利用抗原抗体特异性结合的免疫反应原理, 通过不同来源的抗体所带的不同荧光基团为内源蛋白标记上特定的荧光信号, 从而可以通过共激光聚焦显微镜同时检测多种蛋白的表达情况。该方法普遍适用于果蝇的各种组织来检测蛋白的表达位置以及表达水平, 可用于探究不同基因的表达特性、蛋白与蛋白之间的共定位关系等。本实验以果蝇肠上皮为例, 用小鼠来源的抗体标记在肠干细胞中特异表达的膜定位 Delta (DI) 蛋白, 并结合内源表达的绿色荧光蛋白 (GFP) 和 DNA 荧光染料, 通过激光扫描共聚焦显微镜同时进行多通道扫描, 从而获取两种蛋白与 DNA 在细胞中的定位信息。

关键词: 肠上皮, 免疫荧光染色, 固定, 脱水, Insect medium, 肠干细胞

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 载玻片 (Fan Yi, catalog number: 7105P)
3. 盖玻片 (DIAMOND, 20 × 20 mm, 0.13-0.17 thick)
4. 1.5 ml 离心管 (Axygen Scientific, catalog number: 07218934)
5. 0.22 μm 滤器 (MILLEX, catalog number: R3MA68255)
6. 雌性果蝇成虫
7. 37%多聚甲醛 (Sigma-Aldrich, catalog number: F1635)
8. 甲醇 (Sigma-Aldrich, catalog number: 061495)
9. 正庚烷 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 80066918)

10. 正常羊血清 (NGS, Cell Signaling Technology, catalog number: 5425)
11. 一抗: DI 小鼠 1:500 (DSHB, catalog number: AB528194)
12. 二抗: Alexa-Cy5 山羊抗小鼠 1:300 (Life Technology)
13. DNA 荧光染料: DAPI (Sigma-Aldrich, catalog number: D9542)
14. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: T9248)
15. 甘油 (Sigma-Aldrich, catalog number: SHBC5602V)
16. NaHCO₃ (北京化工厂)
17. CaCl₂ (北京益利精细化学品有限公司)
18. NaOH (北京益利精细化学品有限公司)
19. HCl (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 10011018)
20. NaCl (北京化工厂)
21. KCl (北京益利精细化学品有限公司)
22. Na₂HPO₄ (北京化工厂)
23. KH₂PO₄ (北京益利精细化学品有限公司)
24. Schncider's powdered medium (Sigma-Aldrich, catalog number: S9895)
25. Grace's Insect Medium (见溶液配方)
26. 10× PBS (见溶液配方)
27. 1× PBS (见溶液配方)
28. PBT (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖板
2. 超精细解剖镊子 (WPI, Dumoxel 合金镊子, #5 14098)
3. 体式光学显微镜 (Leica S6E)
4. 移液器 (GILSON)
5. 摇床 (Kylin Bell Lab Instruments)
6. 激光扫描共聚焦荧光显微镜 (Nikon A1 或 Zeiss LSM800)
7. 4 °C 冰箱

实验步骤

1. 在 Insect Medium (或 1× PBS) 中解剖出完整的果蝇中肠，转移至盛有 500 μl PBS 的 1.5 ml 离心管中置于冰上。

推荐解剖方法：

- 1.1 左右手各执一把镊子于体视镜下，取一只待解剖果蝇置于培养基润洗过的解剖板 (或直接在盛有培养基的槽中进行解剖)；
- 1.2 (可选) 根据操作习惯，通常用左镊子通过轻轻夹住果蝇身体两侧来固定住果蝇，右镊子夹住果蝇头胸部交界处夹断去掉果蝇头部；
- 1.3 (可选) 用同样的方法去掉果蝇的尾部体壁；
- 1.4 左镊子固定住果蝇胸部，右镊子夹住果蝇腹部两侧，轻轻向左右两端拖拽使果蝇胸腹交界处体壁破裂并暴露出果蝇肠道，继续向两端拖拽直至暴露出果蝇中肠末端；
- 1.5 通过左右镊子配合，一把镊子轻轻夹住肠道两侧固定肠道，另一把镊子拖拽果蝇体壁将肠道前端和后端分别从体壁中脱离出来 (图 1A)；
- 1.6 用镊子夹断有大量马氏管的后肠部分和前端的食囊 (避免在后续染色过程中缠绕中肠，图 1)；
- 1.7 轻轻剥离脂肪细丝等附着在肠道上的结构 (避免后续干扰成像效果)；
- 1.8 转移，用镊子将中肠挑入盛有培养基的 1.5 ml 离心管中，或用移液器将中肠和培养基一并转移至 1.5 ml 离心管中。

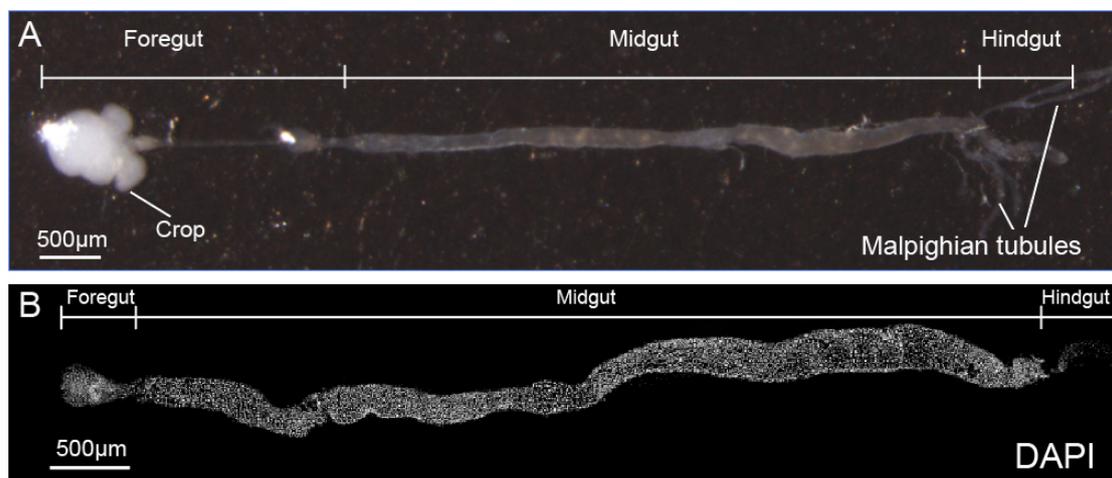


图 1. 果蝇成虫肠道解剖图及其分区. A. 体视镜下在解剖板上解剖出的果蝇成虫完

整的肠道，包括前肠的食囊 (Crop) 和后肠的马氏管 (Malpighian tubules)。B. 去掉食囊和马氏管并经过免疫荧光染色后的果蝇肠道，DAPI 标记了细胞核。

2. 用 4%多聚甲醛溶液及等体积的正庚烷置于旋转摇床上室温固定 30 min (王晨辉, 2013)。
3. 弃液，依次加入 500 μ l 的正庚烷及 500 μ l 100%甲醇，剧烈摇晃 30 s 后弃液 (王晨辉, 2013)。
4. 加入 1 ml 100%甲醇置于旋转摇床上室温 5 min (甲醇可以去除类脂并使细胞脱水，同时进一步固定并初步透膜，有利于降低背景信号，有利于肠道通过重力作用沉淀至离心管底，并使肠道结构不易被破坏，提高肠道的韧性避免相互缠绕)。
5. 弃液，重复步骤 4。
6. 弃液，用 1 ml PBT 洗 2~3 次，置于旋转摇床上室温每次 5 min (PBT 中的 Triton 用于透膜)。
7. 弃液，用 300 μ l PBT + 15 μ l NGS 置于旋转摇床上室温封闭 1 h (王晨辉, 2013)。
8. 加入适当稀释比例的一抗 (本实验中用到的 mouse-Dl 1:500)，置于旋转摇床上，室温杂交 2~3 h，或 4 $^{\circ}$ C 杂交过夜。
9. 弃液，用 1 ml PBT 洗 3 次样品，室温置于旋转摇床上，每次 5 min。
10. 弃液，加入 300 μ l PBT，并根据一抗的种属来源加入相应的荧光二抗 (本实验中用到的 anti-mouse-Cy5 1:300)，置于旋转摇床上室温杂交 2~3 h，或 4 $^{\circ}$ C 杂交过夜，避光。
11. 弃液，用 1 ml PBT 洗 3 次，置于旋转摇床上室温每次 5 min。
12. 弃液，加入 100 ng/ μ l 的 DAPI 溶液，置于旋转摇床上室温染色 5 min。
13. 弃液，用 PBT 洗 2 次，置于旋转摇床上室温每次 5 min。
14. 弃液，加入 150 μ l 70%甘油，置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待甘油充分浸润肠道组织后 (约 30 min) 制片。荧光染色样品置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱可保存数月。

结果与分析

野生型雌性果蝇成虫肠上皮免疫荧光染色图 (图 2)。其中蓝色为核定位的 DAPI 信号标记了所有细胞的细胞核，绿色为内源表达的 GFP 标记了肠 Enteroblast (EB) 细胞 (NRE,

notch responsive element, 特异性标记 EB 细胞), 白色膜定位信号 (DI) 标记了肠干细胞, 这两种细胞均为二倍体细胞 (小核 DAPI); 多倍体 (大核 DAPI) 细胞为肠吸收型细胞。

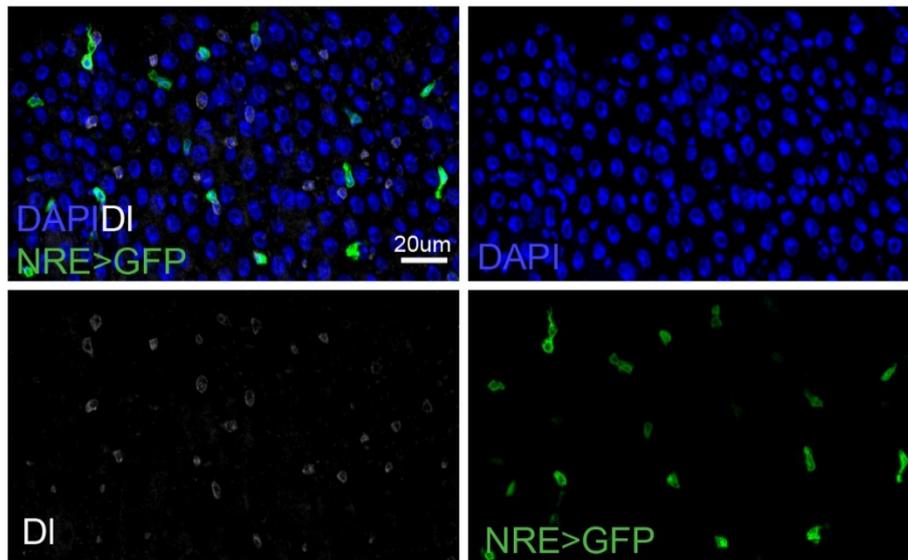


图 2. 野生型雌性果蝇成虫肠上皮免疫荧光染色

注意事项

1. 果蝇肠道解剖完成之后要尽快进行固定, 以确保信号的真实有效性, 固定失败会导致信号弥散。
2. 过多的有机溶剂会一定程度上影响透膜进而影响抗原抗体的结合, 对于较难通过杂交获取信号的抗体可用 PBT 多洗几遍有机溶剂固定及脱水后的肠道, 必要时可省略甲醇脱水的步骤。

溶液配方

1. Grace's Insect Medium

- 1) 在 900 ml ddH₂O 中加入以下成分

Schneider's powdered medium 24.49 g

NaHCO₃ 0.4 g

CaCl₂ 0.6 g

- 2) 待完全溶解后用 NaOH 溶液调节 pH 至 9.0 ± 0.2 , 然后用 HCl 调节 pH 至 $6.8 \pm$

0.2, 用 ddH₂O 定容至 1 L

3) 用直径为 0.22 μm 的滤器过滤除菌, 分装后保存于 4 °C 冰箱

2. 10× PBS

在 900 ml ddH₂O 中加入以下成分:

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄ 14.2 g

KH₂PO₄ 2.7 g

定容至 1 L, 灭菌室温可保存半年

3. 1× PBS

取 100 ml 10× PBS 稀释至 1×, 并调节 pH 至 7.4, 灭菌室温可保存半年

4. PBT

在 1× PBS 中加入 1‰的 Triton X-100, 充分混匀, 灭菌室温可保存半年

致谢

本文所述实验方案参照自王晨辉博士的博士研究生毕业论文《Ras 在果蝇 APC 突变所致肠道肿瘤进程的作用及 Notch 信号通路调节果蝇胃干细胞分化》中所述方法加以改进和优化。感谢郭兴庭博士提供图 1B。

参考文献

1. 王晨辉. (2013). Ras 在果蝇 APC 突变所致肠道肿瘤进程的作用及 Notch 信号通路调节果蝇胃干细胞分化. [博士学位论文]. 北京师范大学.