

小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色

Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain

郑茗芳, 刘学, 何苗*

复旦大学脑科学研究院, 中国, 上海市东安路 131 号, 邮编 200032

*通讯作者邮箱: hem@fudan.edu.cn

摘要

对小鼠脑切片进行免疫荧光染色和成像, 是对特定基因的蛋白产物进行定性、定位和定量检测的常用方法, 也常被应用于识别和标记脑组织中的不同细胞类型, 是神经环路发育、连接和功能研究的必备技术之一。本指南面向初学者, 对固定后成年小鼠脑组织振动切片和免疫荧光染色的完整实验流程进行了详细介绍, 其中包含从样品制备到封片的操作细节和注意事项, 并针对实验中常见问题给出解决方案。

关键词: 小鼠, 脑组织振动切片, 免疫荧光染色, 振动切片机, 荧光显微镜

研究背景

在脑科学研究中, 常常需要对脑组织切片进行免疫荧光染色来检测基因表达或鉴别细胞类型。免疫荧光染色的基本原理为: 以带荧光的特异性抗体在组织细胞原位反应形成抗原—抗体复合物, 进而通过相应波长的激光激发荧光色素, 可观察到目的蛋白的表达情况。

免疫荧光染色法分为直接法和间接法两种。前者令荧光基团标记的已知抗体直接与细胞或组织内的特定抗原结合; 后者先用无标记的一抗识别细胞或组织内的特定抗原, 再令荧光基团标记的二抗识别特定种属的一抗, 形成抗原-抗体-抗体复合物。二者相较, 间接法有助于信号放大, 敏感性高, 应用广泛 (Im et al., 2019)。本文所述为间接法。

为便于抗体渗透和成像观察, 在免疫染色之前通常需要对多聚甲醛固定过的脑组织进行切片, 常用方法包括石蜡切片、冰冻切片和振动切片。振动切片是在常温下通过振动切片机刀片的往复切削快速获得组织切片的一种实验操作。相比于石蜡切片和冰冻切片, 它省却了脱水、透明、浸蜡或沉糖、冰冻等过程 (Zhang and Xiong, 2014; 李贵莘等, 2015), 较为简便, 但切片的厚度一般不能低于 30 μm (Zhang and Xiong, 2014)。根据组织的软硬程度和所需收集的切片位置与角度, 在切片前可酌情进行琼脂糖包埋以增加硬度或扩大切片范围。本文所介绍的是针对固定后成年小鼠脑组织的振动切片及对漂浮状态的脑切片进行免疫荧光染色和封片的步骤。但是, 免疫荧光染色与封片这两部分操作也适用于漂片法收集的冰冻切片。对于贴片收集的新鲜或固定后组织冰冻切片, 因需直接在玻片上进行免疫染色, 本指南中的大部分操作并不适用。

材料与试剂

1. 称量纸
2. 无尘擦拭纸 (Kimtech)
3. 锡箔纸 (佳能)
4. 自制包埋模具 (自制包埋板 20×12 cm; 包埋支架三立面长 1.4 cm, 高 0.6 cm, 外侧线间距 0.7 cm。空心长方体包埋模具, 外尺寸 $2.5 \times 2.5 \times 2.6$ cm, 内尺寸 $2 \times 2 \times 2.6$ cm。适用于成年小鼠脑组织包埋。见图 1。) (Ragan et al., 2012)

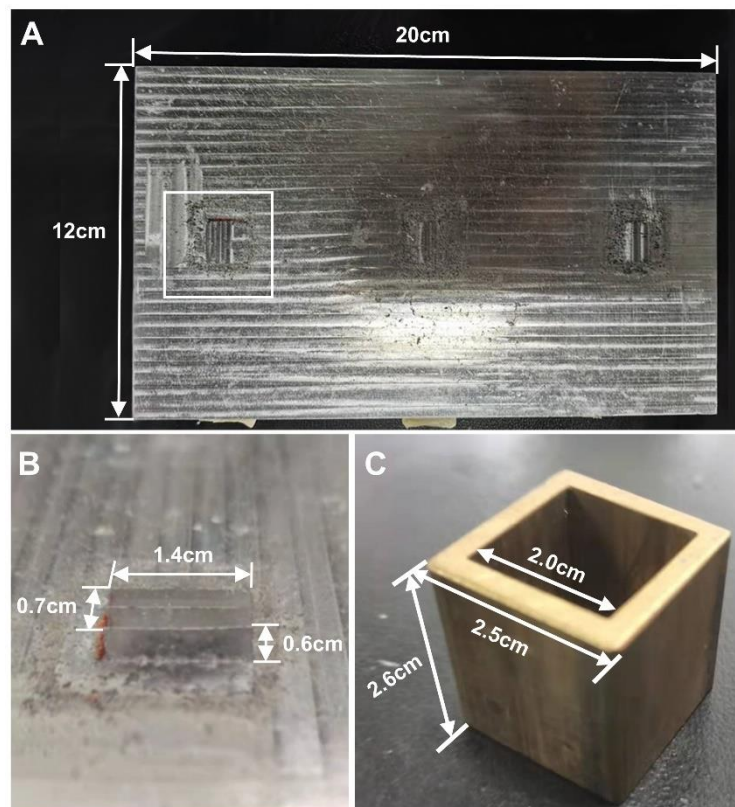


图 1. 自制包埋模具

(A) 自制包埋板。尺寸 20×12 cm。(B) 包埋板的放大图, 显示包埋板上的三片立面支架: 长 1.4 cm, 高 0.6 cm, 间距 0.7 cm。(C) 空心长方体包埋模具。外尺寸 $2.5 \times 2.5 \times 2.6$ cm, 内尺寸 $2 \times 2 \times 2.6$ cm。

5. 48 孔板 (路斯特, 23048) (孔径 16 mm, 孔深 17 mm)
6. 2 mL 一次性塑料滴管 (路斯特, 13002)
7. 载玻片 (世态, 80312-3161)
8. 盖玻片 (世态, 80340-3610)
9. 琼脂糖 (TSINGKE, 111860)
10. 双蒸水
11. 正常驴血清 (蕊特生物, W9030-05)
12. Triton X-100 (sigma, X100)
13. NaN_3 (sigma, S2002)
14. ProClean 300 (Beyotime, ST853)

引用格式: 郑茗芳, 刘学, 何苗. (2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

15. 一抗
16. 荧光二抗 (Thermofisher、Sigma 或 Jackson Lab)
17. DAPI (sigma, D9542)
18. 封片剂 (SouthernBiotech0100-01; 或 LERNER LABORATORIES, 13800)
19. 1× PBS (见溶液配方)
20. 封闭液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 25 mL 量筒 (蜀牛)
2. 50 mL 锥形瓶 (蜀牛)
3. 单面刀片 (Leica, 819)
4. 双刃刀片 (Gillette, 92359217)
5. 502 胶水 (得力)
6. 记号笔
7. 细毛笔 (HWAHONG, 345#1)
8. 无色透明指甲油 (国产)
9. 体式荧光显微镜 (Nikon, SMZ25)
10. 电子天平 (上海恒平, MP3002)
11. 微波炉 (Galanz, P70F23P-G5 (SO))
12. 振动切片机 (LEICA, VT1000S)
13. 1,000 μL 移液枪 (Eppendorf, 3120000267)
14. 200 μL 移液枪 (Eppendorf, 3120000259)
15. 10 μL 移液枪 (Eppendorf, 3120000224)
16. 桌面离心机 (Thermo Fisher, 75002420)
17. 脱色摇床 (QILINBEIER, TS-1)

实验步骤

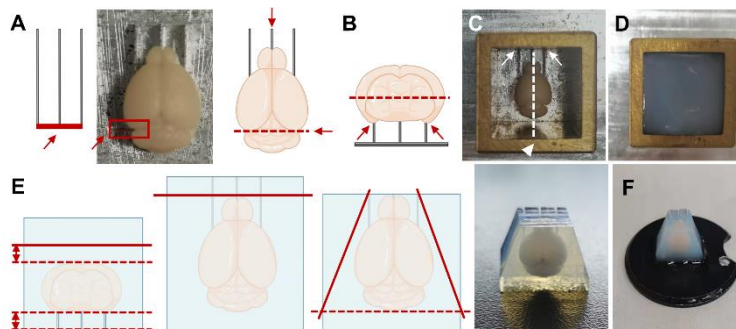
一、样品准备

1. 琼脂糖包埋切片 (可选)

注: 包埋切片适用于以下情况:

 - a. 脑组织较软。
 - b. 目标部位切片易脱离 (例如嗅球或小脑的冠状切片)。
 - c. 目标部位距离样品粘贴固定面过近 (例如对半边鼠脑进行矢状切片时, 贴近脑组织中缝线的部分)。
 - d. 水平切片, 鼠脑底面不平难以粘贴固定。
 - a. 将固定后鼠脑用 PBS 清洗三遍, 用无尘擦拭纸将其表面残留的 PBS 轻轻吸干。
 - b. 将全脑置于自制包埋板上, 使大脑中缝线与包埋支架的中央立面对齐 (图 2A, 红色箭头), 小脑人字缝切线 (图 2A, 红色虚线) 悬停于支架边缘。为方便判断位置, 可沿三个立面底部用记号笔画一条直线 (图 2A, 红色实线)。

- c. 从尾侧（小脑方向）观察鼠脑，调整两侧皮层腹外侧最低点（图 2B，红色箭头）位于两侧立面顶端以确保水平（图 2B，红色虚线）；若鼠脑偏小（或偏大），则调整两侧最低点位于两侧立面顶端内侧（或外侧）且左右对称（图 2B）。
- d. 将包埋模具开口垂直于包埋板，内侧贴合支架远离小脑一端放置（图 2C，白色箭头）。微调模具位置使脑组织左右居中（图 2C，白色虚线）。注意不要碰触鼠脑导致偏移。
- e. 以 1× PBS 或双蒸水为溶剂，配制 10 mL 4%琼脂糖溶液（包埋一个小鼠脑组织用量）。以锡箔纸包住锥形瓶瓶口，微波炉加热至溶液澄清。
注：加热过程中应每隔 15s 取出锥形瓶摇匀，避免单次加热时间过长引起溶液暴沸。
- f. 静置琼脂糖溶液，自然降温到 65 °C 左右（此时以手触碰锥形瓶底部，手感温热但不觉发烫）。
- g. 琼脂糖溶液倒入包埋模具：锥形瓶瓶口贴合包埋模具近小脑一端居中（图 2C，白色三角），微微倾斜使溶液沿壁进入模具，直至液面接近或到达模具顶端开口。
注：
 - i. 不可直接朝鼠脑倾倒溶液。
 - ii. 刚开始倒入溶液时速度应缓慢，待溶液完全没过脑组织后可加快速度，避免底部及模具壁上的琼脂糖溶液先凝结。若倾倒过程中产生气泡，可用干净枪头挑破或吸出。
- h. 静置，待琼脂糖溶液自然凝结。
- i. 当琼脂糖完全凝固、呈半透明乳白色、按压不变形时（图 2D），竖直向上取出模具和其内部凝固的凝胶块（注意沿着包埋支架取出，避免支架挤压凝胶）。在近脑组织背侧的模具开口处将凝胶块轻轻推出。
- j. 成型后切除多余凝胶。以冠状切片为例，可切除脑组织背侧、吻侧（嗅球方向）和两侧多余凝胶，使腹侧和背侧凝胶厚度大致相同，凝胶上端略高于嗅球（若无需嗅球切片，可沿嗅球与大脑连接缝切下嗅球），左右两侧对称切割使整体形状呈梯形（图 2E）。切割时确保凝胶块用于粘贴的一面（粘贴平面）平整，以备下一步脑组织粘贴。注意不要损伤鼠脑。
注：粘贴平面的选取取决于切片方向。
 - i. 冠状切片：脑组织嗅球端或小脑端为粘贴平面。
 - ii. 矢状切片：脑组织侧面为粘贴平面。
 - iii. 水平切片：脑组织腹侧或背侧为粘贴平面。
- k. 脑组织粘贴：用 502 胶水在振动切片机的圆形托盘中央涂一矩形薄层（面积较 j）所得凝胶块底面积大），将包埋脑组织粘贴在托盘上（图 2F）。
注：
 - i. 圆形托盘使用前均应用单面刀片刮净凝固胶水。
 - ii. 粘贴前确定好脑组织粘贴方位，满足切片时圆形托盘缺口不朝向托盘卡槽上的夹持装置或固定螺丝。
 - iii. 502 胶凝固过程中勿移动包埋脑组织。
 - iv. 注意凝胶底部若有缺口应用胶水将凝胶与圆盘间隙填满。
 - v. 凝胶周围多余胶水可用移液枪枪头吸去或用无尘擦拭纸吸掉。



引用格式：郑茗芳，刘学，何苗.(2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

图 2. 冠状切片脑组织的包埋、修块与粘贴

(A) 全脑放置于自制包埋板上，大脑中缝线与包埋支架中央立面对齐，小脑人字缝切线与红色虚线重合。(B) 左右脑保持水平（红色虚线），两侧皮层腹外侧最低点（红色箭头）位于两侧立面顶端。(C) 包埋模具贴合支架远离小脑一端（白色箭头）置于包埋板上，脑组织位置居中（白色虚线）。琼脂糖溶液倾倒点位于模具近小脑一端居中（白色三角）。(D) 琼脂糖完全凝固，呈半透明乳白色。(E) 切除脑组织背侧多余凝胶使腹背两侧凝胶厚度大致相同；切除嗅球侧多余凝胶使凝胶上端略高于嗅球；左右两侧对称切割使整体形状呈梯形。图中红色实线为切割线。(F) 用 502 胶水将包埋脑组织竖立（嗅球朝上）粘贴在圆形托盘上。

2. 无包埋切片

- 矢状切片：将脑组织平放，用单面刀片将其沿脑组织中缝线切成两半。将脑组织（尤其是断面）用无尘擦拭纸吸干，用 502 胶水将断面粘贴在圆形托盘上（图 3A）。
- 冠状切片：将脑组织平放，用单面刀片沿冠状面切下小脑。将脑组织（尤其是断面）用无尘擦拭纸吸干，用 502 胶水竖立（嗅球向上）粘贴在圆形托盘上（图 3B）。

注：

- 粘贴时应轻轻下压脑组织，使胶水完全覆盖脑组织与圆形托盘的接触面。
- 由于鼠脑底面不平，不易粘牢，若需水平切片建议包埋后切片。

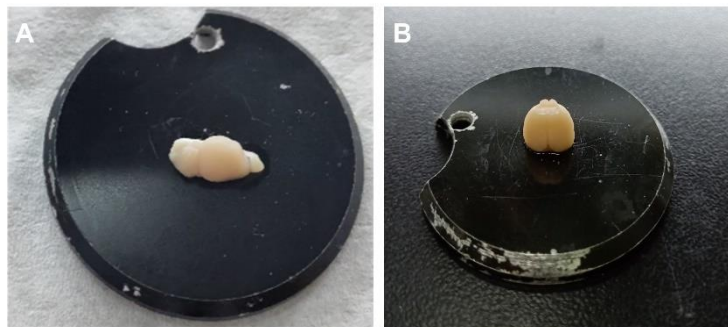


图 3. 无包埋脑组织粘贴

(A) 矢状切片脑组织粘贴。(B) 冠状切片脑组织粘贴。

二、振动切片机零件组装

- 振动切片机及其零部件见图 4。将圆形托盘嵌入托盘卡槽，托盘旋转至合适方位。圆形托盘缺口不得朝向卡槽上任一夹持装置（图 5A，红色三角）或固定螺丝（图 5A，红色箭头）。旋紧固定螺丝，固定托盘。
注：托盘方位取决于切片方向。
 - 冠状切片/矢状切片：脑组织背侧或腹侧正对刀刃（图 5E，红色虚线）。
 - 水平切片：大脑中缝线与刀刃垂直（虽然相比侧面进刀切口小，但左右平齐有利于切片均匀）。
- 将样品槽安装到冷却槽内的螺栓上，将锁杆（图 5B，红色箭头）沿顺时针方向旋转约至锁杆垂直，将样品槽固定稳固。注意不要过度旋转，易导致锁杆滑丝或样品槽无法取出。
- 调整刀架角度。拧松侧向螺丝（图 5C，红色三角），转动调节杆（图 5C，红色箭头）至所需角度，拧紧侧向螺丝固定所选角度。
注：刀架角度一经设置即固定。除有调整需求外，无需在每次实验中重复此操作。
- 将双刃刀片沿中缝对折成两片单面刀片，将单面刀片插入刀架内。拧紧刀架上的固定螺丝（图 5D，红色箭头）固定刀片。
注：刀片必须夹紧，与刀架夹片前缘平行（图 5D，红色虚线）。
- 旋紧刀架固定旋钮（图 5E，红色箭头），固定刀架。

引用格式：郑茗芳，刘学，何苗.(2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

6. 待 502 胶水干后，向样品槽内倒入 1× PBS 至液面没过刀片。开机，设置好切片厚度、刀架行进速度及振动频率。

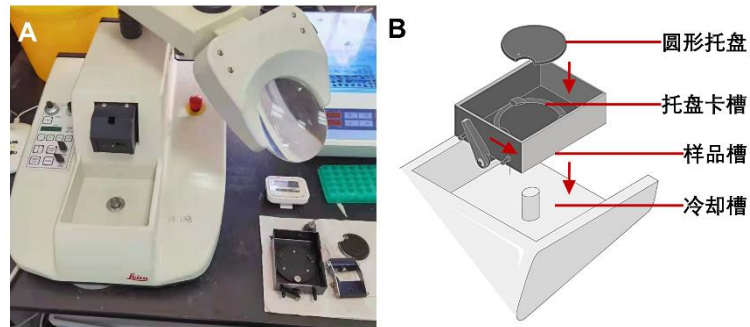


图 4. 振动切片机及零部件

(A) 振动切片机。(B) 振动切片机的载物台部分：自上而下零部件为圆形托盘、托盘卡槽、样品槽、冷却槽，沿红色短箭头指示方向组装。锁杆沿顺时针方向（红色长箭头方向）旋转至右侧，将样品槽固定在冷却槽螺栓上。

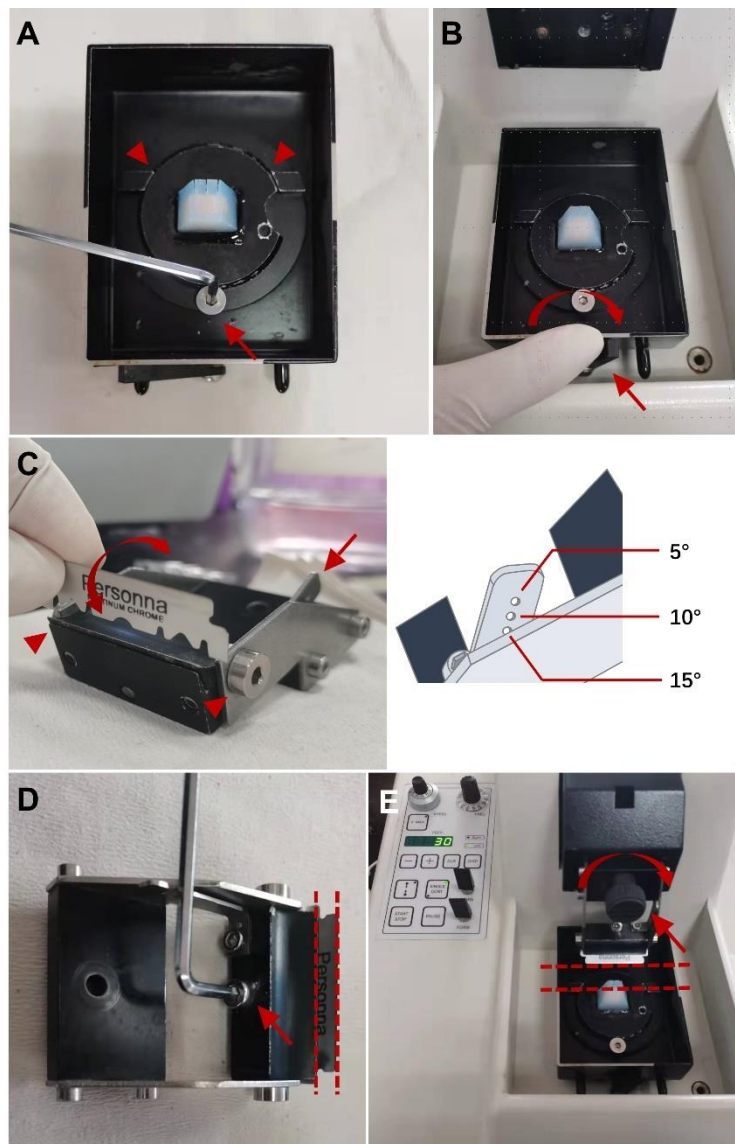


图 5. 零件的组装 (图示以包埋脑组织冠状切片为例)

(A) 圆形托盘固定于托盘卡槽。圆形托盘缺口不得朝向卡槽上任一夹持装置 (红色三角) 或固定螺丝 (红色箭头)。旋紧固定螺丝, 固定托盘。(B) 样品槽安装到冷却槽内的螺栓上, 顺时针旋转锁杆 (红色箭头) 将样品槽固定于冷却槽。(C) 调整刀架角度。拧松侧向螺丝 (红色三角), 转动调节杆 (红色箭头), 调整刀架 (刀片) 至所需角度。右图为调节杆的放大图。转动过程中调节杆紧贴刀架侧面的小孔指示即时刀架角度, 自上而下依次为 5°、10°、15°。(D) 组装刀片。刀片与刀架夹片前缘平行, 拧紧刀架上的固定螺丝 (红色箭头) 固定刀片。(E) 顺时针方向拧紧刀架固定旋钮 (红色箭头), 固定刀架。包埋脑组织背侧正对刀片, 冠状轴与刀片平行 (红色虚线)。

7. 确定每次切片刀片的始末位置

- 操作 REV/FORW 拨杆以前后调整切片时刀片的始末位置。当刀片前端快要到达脑组织时停止。观察刀片与凝胶块 (或无包埋脑组织) 上端位置, 适当调整 UP/DOWN 拨杆使刀片略高于样品。按下始末位置键, 确定切片初始位置。
- 再次拨动 REV/FORW 拨杆, 当刀片前端完全超过样品时, 再按下始末位置键, 确定切片终止位置。完成每次切片的始末位置设定。



图 6. 振动切片机控制面板

8. 脑切片的收集

- 根据切割部位选择合适孔板，在板盖正面写明样品基本信息（如小鼠基因型、病毒注射类型、编号、切片厚度、切片日期等）。孔板侧面写明小鼠编号并划线标记，避免孔板间板盖混淆。
- 使用一次性滴管向每孔中加入 1–1.5 mL 含 0.01% NaN₃ 的 1× PBS。
- 选择 SINGLE（单次切割）或 CONT（重复切割）挡位，按下 START/STOP（开始/暂停）按钮，用细毛笔按顺序收集脑切片于 48 孔板中。

注：

- 若所需收取脑片较靠后，可直接切除多余部分组织至接近目标位置，或选择较大切片厚度切除多余组织，临近目标位置时改为目标厚度。
- 如收集包埋脑组织切片则需在脑片切下后挑开琼脂糖，并及时清理样品槽中的絮状凝胶。

样品制备与振动切片操作参见视频链接：<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.v612>

三、免疫荧光染色

- 另取一 48 孔板（区别于振动切片中收集脑切片的孔板），逐孔加入 1 mL PBS。根据实验需求及切片数量挑取相应脑片于该孔板中。
- 配制封闭液（本次实验配制 10 mL，剩余封闭液可保留备用）。封闭液配比见溶液配方。一般封闭液配制总量=封闭所需量+一抗孵育所需量+二抗孵育所需量+分装损耗~5%–10%~封闭所需量的 3.3 倍。
- 封闭。吸除 PBS，逐孔加入 200 μL 封闭液（每孔 3–5 脑片时 200 μL 溶液较为合适，若每孔脑片数量较多可适当增大相应溶液体积），放入摇床封闭 2 h。
- 配制一抗和二抗。封闭期间，根据实验需求选择一抗和二抗，以封闭液为溶剂，按照合适比例和使用体积配制一抗和二抗溶液。配制全程在冰上操作。
- 一抗孵育。吸出封闭液，每孔加入 200 μL 一抗溶液，4 °C 冰箱中孵育过夜。
- 一抗漂洗。吸出一抗溶液，每孔加入 1 mL 1× PBS 溶液，置于摇床漂洗 15min，漂洗结束后吸除 PBS。重复漂洗 3 次。
- 二抗孵育：每孔加入 200 μL 二抗溶液，避光常温孵育 2 h。
- 二抗漂洗：吸出二抗溶液。加入 1 mL 1× PBS 后置于摇床漂洗 15 min，结束后吸除 PBS。
- DAPI 复染：每孔加入 200 μL DAPI 溶液，置于摇床孵育 15 min。结束后吸除 DAPI 溶液。
- 漂洗：每孔加入 1 mL 1× PBS，置于摇床漂洗 15 min，结束后吸除 PBS。
- 每孔加入 1 mL 1× PBS，准备封片。

引用格式：郑茗芳，刘学，何苗.(2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

注：每次换液时，既要尽量吸除上一步骤液体，又要避免切片干燥。建议先用吸管或大容量移液枪吸出大部分液体，再用 200 μL 枪头吸出剩余液体。若同时处理多孔，请掌握好吸液和加液之间的间隔时间。

四、封片

1. 封片前镜检。用细毛笔任取一片切片于载玻片上，在荧光显微镜下检查是否有对应二抗荧光信号。若无信号或信号太弱，可重新染色。若有杂质黏附在脑片上，可增加洗涤次数，或延长洗涤时间。若镜检荧光正常，则可进行捞片。
2. 在载玻片磨砂面（或白色涂料区域）写明切片信息，如实验日期、样品编号或信息（如基因型、年龄、给药情况等）、染色信息、脑片厚度（如 50 μm ）和玻片序号等。
3. 将载玻片斜放于装有适量 1 \times PBS 的培养皿，使其部分浸没在液面以下。可在 PBS 中加入微量 25% Triton，以降低表面张力，辅助贴片。
4. 贴片。

注：

- a. 用细毛笔将脑片从孔板转移到培养皿中，按顺序排布并使其吸附于载玻片上。先将单片脑片平铺在液面下的载玻片上，再以毛笔尖抵住脑片一端，借助少量 PBS 润滑向上拖动（施力过大、拖动过快易造成脑片撕裂或折叠）。脑片刚刚脱离液面时易携带较多 PBS，此时应适当停留沥去多余 PBS，否则脑片即使到达预定位置也容易随液体移动。
 - b. 单张玻片放置多张脑片时，通常保持同一朝向并按照切片顺序摆放。为避免先放置的脑片在贴后续脑片时过于干燥，在操作过程中应实时观察，及时从边缘用毛笔补充 PBS，保持所有脑片在贴片完毕前保持湿润状态。
 - c. 脑片位置不宜过于贴近玻片边缘，否则后续对盖玻片进行封片时指甲油有可能覆盖在脑片上方，影响成像。
5. 用纸张小心吸干载玻片周围 PBS，平放静置待玻片及脑片上方无明显液体时，加封片剂封片。不可过分干燥，会导致成像背景升高、组织形态受损。
 6. 用移液枪吸取 100 μL 封片剂沿玻片长轴中线滴加在脑片上，避免气泡。

注：

 - a. 吸取封片剂应适量。封片剂过多，易溢出污损玻片表面；过少则无法完全覆盖脑片。
 - b. 滴加封片剂时应在悬空的移液枪枪头与载玻片间形成一小段连续的液柱。缓慢、连续地移动移液枪，一边滴加封片剂一边沿中线引流，避免引入空气。
 7. 盖盖玻片。用拇指和食指固定盖玻片两侧长边使其悬空，先令盖玻片的一侧短边接触载玻片上的封片剂，再缓慢放平，使封片剂沿盖玻片与载玻片之间的缝隙延展开来，覆盖全部脑切片，直至盖玻片另一端也与载玻片贴合。

注：在此过程中，若因加封片剂前干片不足导致组织漂浮位移，可将组织挑回 PBS，充分洗净玻片上的封片剂（或换一干净玻片），重新贴片、晾干、加封片剂封片。
 8. 将整个玻片置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 4–6 h，待封片剂凝固。注意不可挤压或倾斜，避免组织变形或位移。
 9. 蘸取适量指甲油，沿盖玻片边缘刷一圈，完全封闭载玻片与盖玻片间缝隙，防止后期进入气泡（图 7）。

注：

 - a. 蘸取指甲油时应适中。蘸取过多，指甲油会扩散到盖玻片表面；蘸取过少，容易出现指甲油凝固拉丝且无法完全封闭缝隙。
 - b. 完成后检查载玻片与盖玻片间是否仍存在缝隙，若有缺口应及时补充指甲油。
 10. 将玻片置于玻片板上，避光保存。

免疫荧光染色与贴片封片操作参见视频 1。



图 7. 封片成品

脑片与载玻片边缘间留有适当大小的空隙，指甲油（白色箭头）完全封闭玻片间缝隙。



视频 1. 小鼠脑组织振动切片的免疫荧光染色与贴片封片

溶液配方

1. PBS（表 1）

1× PBS 由 20× PBS 稀释得到，20× PBS 配方如下：

用分析天平称取表 1 中药品，添加 800–900 mL 去离子水，使用磁力搅拌器充分溶解（无任何固体），以去离子水定容至 1 L 并充分混匀、过滤。滤好的 20× PBS 可立即稀释使用；稀释得 1× PBS pH = 7.4。暂时不用的 20× PBS 分装后高压灭菌，储存于室温或 4 °C 冰箱。

表 1. 配制 1 L 20× PBS 的药品配比

药品	分子式	分子量	配制 1 L 所需质量 (g)	20×储存液浓度 (mol/L)	1×工作液浓度 (mol/L)
十二水合磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.14	71.628	0.2000	0.0200
磷酸二氢钾	KH_2PO_4	136.085	4.8992	0.0360	0.0036
氯化钠	NaCl	58.443	160.1338	2.7400	0.2740
氯化钾	KCl	74.552	4.0258	0.0540	0.0054

此外，应提前配制好含 0.01% NaN_3 的 1× PBS 溶液，以备后续配制封闭液。

- 25% Triton
 倾倒 10 mL TritonX-100 于 50 mL 离心管，加入 30 mL 去离子水或 1× PBS，在旋转混匀仪上倒转混匀过夜。室温保存。
- 封闭液（表 2）
 以含 0.01% NaN₃ 的 1× PBS 为溶剂，按各试剂相应比例依次加入即可。本文以配制 10 mL 封闭液为例：

表 2. 配制 10 mL 封闭液的药品配比

试剂	配制 10 mL 封闭液所需体积 (mL)	终浓度 (百分比)
封闭血清 (本文使用驴血清，封闭血清种属应适配所选二抗种属)	0.5	5%
25% Triton	0.1	1%
含 0.01% NaN ₃ 的 1× PBS (或含 0.01% ProClean 的 1× PBS)	9.4	/

- 一抗混合液
 查找相应蛋白对应一抗及配制比例，以封闭液为溶剂配制一抗混合液，一般比例为 1:1,000。注意一抗选择种属应与封闭液中血清种属不一致。
- 二抗混合液
 查找相应一抗对应二抗及配制比例，以封闭液为溶剂配制二抗混合液，一般比例为 1:500。
- DAPI
 先用 1 mL 双蒸水将 DAPI 溶解，得到 DAPI 溶液 (1 mg DAPI/1 mL H₂O)。用时取适量 DAPI 溶液加到 PBS 中，制备成 10–50 μM 的 DAPI 溶液，存放于 4 °C 冰箱。注意 DAPI 不能直接用 PBS 等缓冲溶液直接溶解，需要先用水将其溶解。

注意事项与常见问题附解决方案

一、切片注意事项

- 切片前，建议对脑组织进行称重和全脑图拍摄存档，便于未来表型分析。当脑组织中表达荧光蛋白报告基因时，全脑图拍摄可初步观察到相应信号，使振动切片更加具有针对性。依次打开体式显微镜的汞灯、CCD 等组件开关，并调节全脑位于视野中央，选择相应的荧光通道和合适的曝光时间，拍照保存（图 8）。
- 脑组织若长时间暴露在空气中会因脱水而发黄变硬，影响后续实验，应及时完成包埋或进行切片。
- 当组织较软，或目标部位易脱离，目标部位距离样品粘贴固定面过近，或作水平切片时，须将样品包埋后再进行切片。
- 收取嗅球时应选择单次切割，避免连续切割速度过快导致收集次序错乱。
- 收集切片后应将样品置于 4 °C 冰箱待用。若放置时间较久，需加入 0.01% NaN₃ 防腐。

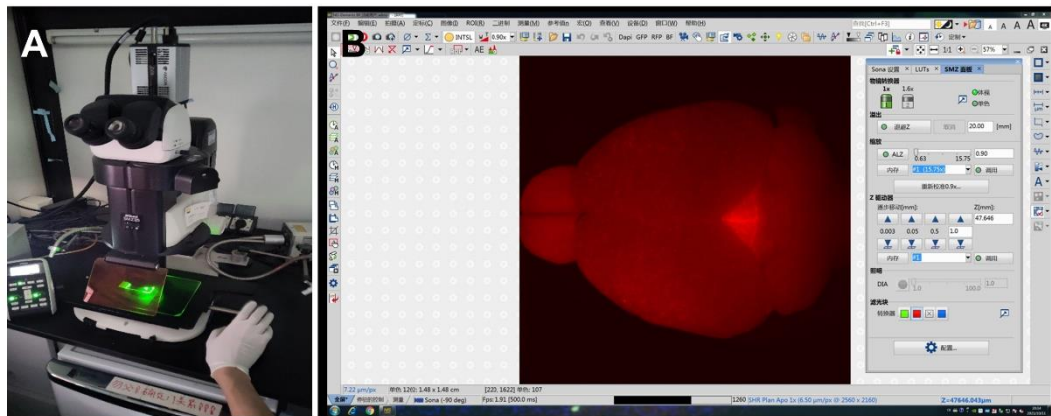


图 8. 体式显微镜与全脑图拍摄
(A) 体式荧光显微镜。(B) 全脑图拍摄。

二、染色注意事项

1. 合理安排实验顺序，实验开始之前备齐对应一抗二抗及封闭液所需成分。先配制封闭液，封闭时可配制一抗、二抗溶液。注意一抗二抗配制均在冰上操作。
2. 抗体配制：
 - a. 抗体配制时封闭液实际体积应比计算体积多 20%–30%，并按配制比例加入一抗或二抗。
 - b. 一抗二抗应从使用中的分装管内取用，勿直接使用原装管，避免原装管抗体受污染和反复冻融失活。
 - c. 抗体由冰箱取出后应暂存于冰盒中化冻。取放时避免手指接触、体温加热管底的抗体。
 - d. 抗体使用前注意观察是否出现固液分离，确保抗体本身在溶液中。若观察到分装管底部或者管身有白色（一抗）或彩色（二抗）粉末或斑块（有固体存在说明抗体溶液浓度不准），必须先让抗体溶解（颠倒混匀或者吹吸混匀）再离心（离心是为了去除可能仍未完全溶解的细微固体颗粒，避免黏附在组织上造成非特异信号（往往是高亮斑块或杂点））。
 - e. 小体积液体要确保从移液枪中完全吸入与打出。
 - f. 及时将抗体原液放回低温保存，切勿遗忘在外。
 - g. 为防止长菌，长时间使用的溶液中应加入 0.01% NaN_3 ，例如封闭液。
 - h. 一抗二抗溶液配制后可短期（一般不超过一周）存放于 4 °C 冰箱。
3. 加入封闭液、一抗、二抗等溶液时应选择无菌的滤芯枪头。
4. 一抗漂洗后二抗加入前吸取 1 mL PBS 可先用 1,000 μL 移液枪吸取大部分溶液，再换用 200 μL 移液枪。避免 1,000 μL 枪头吸出脑片或戳破脑片。
5. 若封闭液有剩余，可在 4 °C 冰箱中储存 1–2 周，注意标明配制日期。注意观察有无沉淀产生。
6. 一抗、二抗溶液使用后均可回收供再次使用，回收的抗体可重复使用 1–2 次（取决于抗体的稳定性和强度，某些抗体重复使用时需再加约 20% 的抗体。如出现沉淀，请勿继续使用）。
7. 实验过程确保清洁。移液枪枪身容易接触管内壁，移液枪使用前及使用后均应注意使用 75% 乙醇擦拭。

三、加样注意事项

1. 加样时要求液面没过脑片并使其悬浮，脑片尽量展平。
2. 不可直接朝脑片吹打液体，避免脑片破损，可沿壁逐滴加入试剂。
3. 加样后，将 48 孔板放于摇床上，调节速度至能看到脑片随摇床的摇动而轻微晃动。若摇床速率合适而脑片不动可能是由于加入溶液过少，应再补充；也可能是脑片粘在壁上，用毛笔将脑片挑到溶液中。

引用格式：郑茗芳，刘学，何苗.(2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

4. 每次更换溶液时（如 PBS 换封闭液、封闭结束换一抗、一抗漂洗换二抗），尽量吸干剩余液体，吸取液体时应根据溶液体积选择先大量程后小量程枪头吸取。
5. 从封闭开始所有的步骤，一定要注意样品的保湿，避免样品的干燥，否则极易产生较高的背景。
6. 综合 4 和 5，可在每吸干 2-3 个孔的剩余液体后立即换用枪头吸取下一种试剂打入，避免吸干所有加样孔后再加试剂使脑片放干过久。
7. 对于封闭液、一抗二抗此类粘稠液体，打出时移液枪打至第一停止档即可，初次加样不足可通过吸取少量剩余液体加样补偿。避免打至第二停止档时有较多气泡产生（若气泡附着于脑片上可能会形成染色的真空地带）。

四、其他

1. 对于 PBS 等试剂：建议标注配制日期，使用完后用双蒸水冲洗试剂瓶，重新配制并修改日期。
2. 配制封闭液等试剂时应在管盖或管身书写面上标明溶质类型、配制日期。
3. 48 孔板应轻拿轻放，剧烈晃动可能导致不同孔间试剂交叉污染或脑片样品混淆。
4. 闲置或转移孔板时应合上板盖，避免浮尘等杂物落入加样孔中。
5. 加样孔板放置长时间不用时，应用封口膜密封，防止试剂挥发和污染、或样品溢出。
6. 取放玻片时应手持边缘而非按压玻片表面，避免污损玻片影响观察。

五、脑组织包埋时被凝胶溶液冲走

解决方案：首先检查脑组织在包埋支架上是否摆放平稳，确定平稳后应注意倒琼脂糖溶液的位置及速度。应选择与包埋模具近小脑一端沿着模具壁倒入凝胶，刚开始时速度应缓慢，待溶液没过脑组织后加快速度，避免底部及模具壁上的琼脂糖先凝结。

六、包埋后粘贴不平稳

解决方案：首先注意包埋脑组织修块时尽量不要切割小脑朝向一侧的凝胶，粘贴时应以此面作为平整粘贴面。此外，修块时四刀即可，即切割脑组织背侧，吻侧，左右两侧多余凝胶。其中背侧切割时注意使剩余凝胶厚度尽量与腹侧凝胶厚度相同，嗅球上端切割应注意留出多余凝胶以保证包埋效果，左右两侧切割应注意不要触及凝胶底外侧两边界。

七、切片不完整

解决方案：应检查刀片、刀架和圆形托盘处固定螺丝是否拧紧，务必确保最大程度拧紧。若持续出现切片一片有一片无的情况，应重新包埋脑组织或调整切片速度和频率。去除凝胶时注意动作轻柔，不要损伤脑组织。若均能切出脑片，但部分完好部分残缺，应保留完整脑片，后续可能还可继续染色使用，但切勿继续对第二个样品切片。

致谢

本指南依托复旦大学脑科学研究院/脑科学前沿中心完成实验，受国家自然科学基金青年项目（32200918）与复旦大学珠峰计划“攀登学者”本科生科创项目的资助支持。

参考文献

引用格式：郑茗芳，刘学，何苗. (2023). 小鼠脑组织振动切片与免疫荧光染色. *Bio-101* e1010978.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978.

How to cite: Zheng, M. F., Liu, X., and He, M. (2023). Vibrating Section and Immunofluorescence Staining of Mouse Brain. *Bio-101* e1010978. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010978. (in Chinese)

1. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P. and Yong, W. H. (2019) . [An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining](#). In: Yong, W. (Ed.) . *Biobanking* (pp. 299–311) . Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York.
2. Zhang, J. and Xiong, H. (2014) . [Brain Tissue Preparation, Sectioning, and Staining](#). In: Xiong, H. and Gendelman, H. E. (Eds.) . *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research* (pp. 3–30) . Springer Protocols Handbooks. Springer, New York.
3. 李贵苹, 朱晓娜, 易静, 杭勤. (2015) . 两种方法制备的脑组织切片激光共聚焦显微镜成像效果的比较研究. 中国细胞生物学学报 (11) : 1528–1533.
4. Ragan, T., Kadir, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., Arganda-Carreras, I., Kim, Y., Seung, H. S., Osten, P., et al. (2012) . [Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging](#). *Nat. Methods* 9 (3) : 255–258.