光遗传学研究果蝇神经元与行为的关系

Optogenetic Interrogation of Neuronal Function in *Drosophila* Behavior

郭超，高灿，潘玉峰*

发育与疾病相关基因教育部重点实验室，生命科学研究院，东南大学，南京，江苏

*通讯作者邮箱: pany@seu.edu.cn

引用格式: 郭超, 高灿, 潘玉峰. (2019). 光遗传学研究果蝇神经元与行为的关系. *Bio-101* e1010262. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010262.

How to cite: Guo, C., Gao, C. and Pan, Y. F. (2019). Optogenetic interrogation of neuronal function in *Drosophila* behavior. *Bio-101* e1010262. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010262. (in Chinese)

摘要: 理解大脑的工作原理需要知道各类神经元在行为中的功能。近十几年来发展起来的遗传学工具使人们能够在以往观测神经元在动物行为反应中的活动之外，还能通过操纵神经元的活动来观测动物行为的变化，来探究神经元与行为的关系。我们在解析神经环路的主要模式生物的果蝇中，利用光遗传学激活其脑内神经元，检测其行为变化。我们介绍了实验果蝇的准备、光刺激和行为记录的装置搭建、行为的分析。这套系统使我们能够批量同步地对果蝇的神经元进行激活，鉴定产生和调控行为的神经元。

关键字: 黑腹果蝇，光遗传学，行为，神经元

研究背景: 理清神经元与行为的关系是理解大脑的功能和原理的基本步骤，其有两种互补的研究策略，一是观察神经元对感觉刺激或在行为中的反应，二是人为调控特定神经元的反应，看动物在行为上的改变。近十几年来发展起来的光遗传学方法 (Boyden 等, 2005), 能够在特定神经元中表达遗传编码的光门控的离子通道，利用光的开关对神经元在微秒时间分辨率上操控，观察其他神经元的反应或动物的行为改变，极大地扩展了人们探究脑和行为的关系的能力。

果蝇是遗传学方法研究神经发育和神经环路的经典模式生物，且最早实现了在体用光激活神经元 (Zemelman 等, 2002)。光遗传方法可以非接触、非侵入地激活或抑制果蝇的神经元，进而研究神经元的功能或通路。目前果蝇中的光遗传工具包括激活神经元的蓝光敏感的 ChR2 (460~480 nm) (Schroll 等, 2006; Zhang 等, 2007)、红光敏感的 ReaChR (590~630 nm) (Inagaki 等, 2014) 和 CsChrimson (590 nm) (Klapoetke 等,

2014), 以及抑制神经元的黄光 (570 nm) 敏感的 NpHR (Zhang 等, 2007; Inada 等, 2011; Doll 和 Broadie, 2015)、青光 (515 nm) 敏感的 GtACR1 或蓝光 (470 nm) 敏感的 GtACR2 (Mohammad 等, 2017) 等。因为红光在果蝇视觉受体感光光谱之外, 且有更好的体表穿透能力, CsChrimson 等目前使用较多。

我们以 CsChrimson 为例, 将其表达在果蝇视觉中间神经元 LC6 神经元, 观察红光激活神经元时对果蝇运动速率的影响。我们介绍了实验果蝇的准备、光刺激和行为记录的装置搭建、行为的分析。这套系统使我们能够批量同步地对果蝇进行神经元激活, 并鉴定产生和调控行为的神经元。

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 移液器
3. 果蝇管 (2.5 cm × 9.5 cm 透明聚苯乙烯塑料管)
4. 海绵塞
5. 锡箔纸或遮光布
6. 果蝇实验盘
7. 吸管
8. 果蝇: *UAS-CsChrimson* (B55136) (Klapoetke 等, 2014); 表达在果蝇视觉中间神经元 LC6 神经元的 *Split-GAL4* (OL0070B, B68348) (Wu 等, 2016), 方便起见记为 LC6-GAL4; 将以上果蝇品系与野生型 CS 杂交获得杂合对照基因型
9. 玉米糊
10. 红糖
11. 即发酵母 (法国燕牌)
12. 丙酸 (国药沪试 81011918, 500 ml)
13. 琼脂 (Biosharp, KGR0008, 500 g)
14. 全反式视黄醛 ATR (Sigma, R2500, 1 g)
15. 无水乙醇 (国药化试, 10009257, 500ml)
16. ATR 储存液 (见溶液配方)
17. 标准果蝇食物 (见溶液配方)

仪器设备

1. 培养箱
2. 红色背光源 (方千光电, VB200-R, 620nm)
3. 红外线光源 (方千光电, VL210-IR, 860 nm)
4. S48 单通道刺激器 (GRASS S48)
5. 工业相机 (PointGrey FL2G-50S5M-C)
6. Computar 镜头
7. 红外滤片 LP830-30.5
8. 光强计 (PS-310 V2, Gentec, Canada)
9. 体式显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)
10. 精密天平 (奥豪斯国际贸易(上海)有限公司, CP224C)
11. 微波炉
12. 4 °C 和-20 °C 冰箱

软件

1. QuickTime (Apple Inc, USA)
2. Viewpoint ZebraLab (Viewpoint, Lyon, France)
3. GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA)

实验步骤

一、实验果蝇的培养

光遗传所用的离子通道依赖于全反式视黄醛 (all trans-Retinal, ATR) 感光, 而果蝇的细胞中缺乏 ATR, 需要在实验前人为喂食 ATR, 因此需要配制添加 ATR 的果蝇食物 (ATR 食物)。

1. 用无水乙醇溶解全反式视黄醛 (ATR, 284.44 g/M) 得到 100 mM/L 的储存液, 存于 1.5 ml 离心管, 用锡箔纸密封隔离光线, 储存在-20 °C 备用。
2. 配制 ATR 食物: 将标准配方的食物用微波炉加热融解均匀, 待冷却至 50~60 °C, 加入丙酸 (6‰ v/v) 和 ATR 储存液 (0.2 mM/L), 混匀后倒入果蝇管, 盖上棉塞, 然后用锡箔纸或遮光布包装, 放 4 °C 冰箱保存备用。

3. 果蝇喂食 ATR: 我们将杂交的果蝇放入 ATR 食物管, 标明基因型、ATR 浓度、日期, 用锡箔纸或遮光布避光, 置于 25 °C、50%~60%湿度、早 9 点开始 12 h 光照/12 h 黑暗的培养箱培养。待果蝇羽化后将实验基因型的果蝇在体视显微镜下挑出, 继续在遮光的 ATR 食物培养, 隔日将果蝇转移到新 ATR 食物, 直到 4~6 日龄进行行为学实验。

二、搭建光遗传操作的实验平台

光遗传实验中我们用果蝇实验盘将果蝇限制在一定活动区域, 用红色背光源提供激活神经元的红光、用红外线光源提供光照并用红外相机进行录像, 见图 1。

1. 我们将果蝇单只置入果蝇实验盘 (上下盖板和中间夹层) 的夹层的 8 个圆孔 (直径 4 cm、高 3 mm) 中限定其活动区域。
2. 我们用红色背光源提供红光激活神经元。首先对光强进行核准, 将光功率计的探头置于果蝇板的位置进行光强的测定, 通过光源调整光的强度, 我们采用 0.03 mW/mm² 的光强。通过 S48 单通道刺激器控制红光开关的模式, 我们采用 40 Hz, 8 ms ON 的矩形波刺激, 可根据特定实验调整。
3. 我们用红外线光源提供红外照明, 用工业相机、红外镜头、滤光片来进行红外摄像, 以避免红光的干扰, 通过电脑的 QuickTime 软件进行录像。调整好果蝇盘的位置、红外光源的亮度和角度, 使录像清晰。

图 1. 光激活实验装置

三、行为实验

1. 果蝇准备与适应：我们用吸管将实验果蝇转移到果蝇实验盘，将果蝇实验盘置于实验环境使果蝇先适应约 1 小时。以一个实验盘 8 个孔里的 8 只果蝇为一组。
2. 实验过程：适应时间结束，即通过 QuickTime 软件用连到电脑的红外相机对果蝇进行视频记录。在特定的时间打开红光，激活神经元。本实验中，我们在录像开始 10 分钟左右，打开红光 1 分钟，然后关闭红光，继续录像 10 分钟左右，总共录像时间 20 分钟。

结果与分析

1. 数据的处理
 - a. 实验得到果蝇运动的视频，我们用 Viewpoint ZebraLab 软件对果蝇的运动进行轨迹追踪和定量，获得每 5 秒的运动轨迹长度。
 - b. 对于光激活引起的行为改变，我们截取数据中红光打开的一分钟及前后一分钟进行分析，可见每 5 秒的运动速率 (图 2A)，并对总的运动速率进行比较 (图 2B)。

2. 结果分析

我们用 GraphPad 软件对结果进行分析和绘图。对光激活神经元的果蝇的平均运动速率与基因型对照进行比较以及与光激活前后进行比较,可以看到LC6神经元激活,显著地增加了果蝇的运动速率 (图 2)。

图2. 光遗传激活LC6神经元引起果蝇快速运动. A. 果蝇在红光开启 (红色背景) 1 分钟及其前、后1分钟连续每5秒的运动速率。B. LC6神经元中表达CsChrimson的果蝇在红光开启的1分钟的运动速率显著提高 [与父、母本遗传学对照比较one-way ANOVA: $F(2, 21) = 13.45$, $P = 0.0002$; 其中*UAS-CsChrimson/+* (0.2 mM) vs. *UAS-CsChrimson/LC6-GAL4* (0.2 mM): $q(21) = 6.433$, $P = 0.0005$; *UAS-CsChrimson/LC6-GAL4* (0.2 mM) vs. *+LC6-GAL4* (0.2 mM): $q(21) = 6.266$,

$P = 0.0007$); 与其前后1分钟的速率比较one-way ANOVA: $F(2, 21) = 10.69$, $P = 0.0006$; 其中before vs. light: $q(21) = 5.756$, $P = 0.0015$; light vs. after: $q(21) = 5.563$, $P = 0.0021$]]. 注意到LC6神经元表达CsChrimson但未喂食ATR的果蝇 (*UAS-CsChrimson/LC6-GAL4* (0 mM)), 红光未能引起其运动速率的改变 (one-way ANOVA: $F(2, 21) = 0.2673$, $P = 0.7680$)。图示为Mean $\pm$ SEM, 统计用one-way ANOVA及Tukey多重比较检验, 所有实验组均n = 8。

溶液配方

1. ATR 储存液

ATR 0.0284 g

酒精 1 ml

2. 标准果蝇食物

琼脂粉 6 g

蔗糖 110 g

玉米粉 50 g

酵母 25 g

丙酸 6 ml

双蒸水 1 L (定容)

致谢

实验所用果蝇品系来自 Bloomington *Drosophila* Stock Center。本课题得到国家自然科学基金青年项目 (6531000063) 以及江苏省杰出青年基金 (BK20160025) 的资助。关于本实验方案, 作者声明无利益冲突。

参考文献

1. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. and Deisseroth, K. (2005). [Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity](#). *Nat Neurosci* 8(9): 1263-1268.

2. Doll, C. A. and Broadie, K. (2015). [Activity-dependent FMRP requirements in development of the neural circuitry of learning and memory](#). *Development* 142(7): 1346-1356.
3. Inada, K., Kohsaka, H., Takasu, E., Matsunaga, T. and Nose, A. (2011). [Optical dissection of neural circuits responsible for *Drosophila* larval locomotion with halorhodopsin](#). *PLoS One* 6(12): e29019.
4. Inagaki, H. K., Jung, Y., Hoopfer, E. D., Wong, A. M., Mishra, N., Lin, J. Y., Tsien, R. Y. and Anderson, D. J. (2014). [Optogenetic control of *Drosophila* using a red-shifted channelrhodopsin reveals experience-dependent influences on courtship](#). *Nat Methods* 11(3): 325-332.
5. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., Wong, G. K. and Boyden, E. S. (2014). [Independent optical excitation of distinct neural populations](#). *Nat Methods* 11(3): 338-346.
6. Mohammad, F., Stewart, J. C., Ott, S., Chlebikova, K., Chua, J. Y., Koh, T. W., Ho, J. and Claridge-Chang, A. (2017). [Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins](#). *Nat Methods* 14(3): 271-274.
7. Schroll, C., Riemensperger, T., Bucher, D., Ehmer, J., Völler, T., Erbguth, K., Gerber, B., Hendel, T., Nagel, G., Buchner, E., Fiala, A. (2006). [Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae](#). *Curr Biol* 16(17): 1741-1747.
8. Wu, M., Nern, A., Williamson, W. R., Morimoto, M. M., Reiser, M. B., Card, G. M. and Rubin, G. M. (2016). [Visual projection neurons in the *Drosophila* lobula link feature detection to distinct behavioral programs](#). *Elife* 5: e21022.
9. Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M. and Miesenböck, G. (2002). [Selective photostimulation of genetically chARGed neurons](#). *Neuron* 33(1): 15-22.
10. Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A. and Deisseroth, K. (2007). [Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry](#). *Nature* 446(7136): 633-639.
11. Zhang, W., Ge, W. and Wang, Z. (2007). [A toolbox for light control of *Drosophila* behaviors through Channelrhodopsin 2-mediated photoactivation of targeted neurons](#). *Eur J Neurosci* 26(9): 2405-2416.