

染料法测定果蝇不同营养状态下进食量的方法

Blue Dye Assay to measure Food Consumption of Adult *Drosophila* under Different Nutrition Conditions

白晓兵^{1,2}, 李晓雨^{1,2}, 陈彦博¹, 李岩^{1,2,*}

¹脑与认知国家重点实验室, 生物大分子科教融合卓越中心, 中国科学院生物物理研究所, 北京; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: liyan@ibp.ac.cn

引用格式: 白晓兵, 李晓雨, 陈彦博, 李岩. (2019). 染料法测定果蝇不同营养状态下进食量的方法. *Bio-101* e1010266. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010266.

How to cite: Bai, X. B., Li, X. Y., Chen, Y. B. and Li, Y. (2019). Blue dye assay to measure food consumption of adult *Drosophila* under different nutrition conditions. *Bio-101* e1010266. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010266. (in Chinese)

摘要: 进食行为作为本能行为之一, 与生物体的生存繁衍息息相关。以果蝇这一模式动物为研究对象, 研究进食行为的神经、分子机制对理解和解决各种代谢紊乱和神经疾病有重要意义。

目前, 多种方法和手段都被应用于研究果蝇的进食行为, 它们可以从不同的层次和方面反映果蝇的进食特征 (Deshpande 等, 2014)。伸喙反应法 (PER), 是通过统计果蝇伸喙反应的频率来表示果蝇对食物刺激的感知和摄取欲望 (Gordon 和 Scott, 2009)。在进食量的测定上, 比例粗估法 (PE) 通过统计检测群体中有摄食行为发生的果蝇数量百分比来反映进食量。染料法采用染料标记食物, 通过测定染料的含量反映食物摄入量。同位素标记法是采用放射性同位素标记食物, 测定同位素的含量来反映进食量。毛细玻璃管测定法 (CAFÉ) 通过测量液体食物在毛细玻璃管中的体积变化反应果蝇的摄入量。近年来, 研究者还开发了 FLIC、flyPAD、Espresso 等通过转化的电信号来实现测定果蝇进食量的自动化方法 (Itskov 等, 2014; Ro 等, 2014; Yapici 等, 2016)。

比较广泛和简便应用的染料法 (Edgecomb 等, 1994; Wood 等, 2004), 是用染料标记食物, 用作进食量的检测。果蝇的进食量与染料的摄入量正相关, 染料浓度与其吸光度成正比关系。使用分光光度法测定染料的浓度, 由染料的浓度来反映果蝇在

一定时间内的进食量。染料法测定进食量具有简便易行的优点，可以很好地反映一定时间内果蝇在自然状态下的固体食物中的进食量。

本方法以染料法为基础，通过给果蝇预喂不同的食物，实现对果蝇营养状态的控制，检测其在不同营养状态下的进食量。

关键词：果蝇，进食量，染料法，预喂范式

材料与试剂

1. 培养瓶
2. 2 ml 冻存管
3. 96 孔板
4. 果蝇：野生型果蝇为 *w¹¹¹⁸*，突变体果蝇为 *fit⁸¹*
5. 琼脂粉 (Solarbio, catalog number: A8190)
6. Tryptone (OXOID, catalog number: LP0042)
7. 蔗糖 (沪试, catalog number: 10021418)
8. 亮蓝染料 (Care, Chemodist Industris)
9. 超纯水 (Millipore)
10. PBS 溶液 (生工, catalog number: B548117-0500)
11. 液氮
12. 磁珠
13. 玉米粉
14. 黄豆粉
15. 啤酒酵母
16. 麦芽糖
17. 防腐剂丙酸
18. 固体食物 (见溶液配方)

仪器设备

1. 粉碎研磨仪 (上海净信) 与配套磁珠，或者研磨棒
2. 读板机 (Tecan, model: infinite F50)

3. 小型常温离心机 (Eppendorf, model: 5424)
4. 微波炉
5. -20 °C 冰箱
6. 4 °C 冰箱

软件

1. GraphPad Prism 6

实验步骤

1. 配制食物
 - 1.1 1%琼脂: 在每 100 ml 蒸馏水中, 加入 1 g 琼脂粉, 混匀, 微波炉加热, 使其沸腾, 搅拌之后, 再煮沸约 1 min, 倒入培养瓶, 晾凉凝固。
 - 1.2 10% sucrose: 1%琼脂基础上, 每 100 ml 琼脂食物中加入 10 g 蔗糖, 趁热搅拌溶解, 倒入培养瓶。
 - 1.3 1.7% tryptone: 1%琼脂基础上, 在每 100 ml 琼脂食物中加入 1.7 g 蛋白胨, 趁热搅拌溶解, 倒入培养瓶。
 - 1.4 1%蓝色检测用正常食物: 将培养基放入微波炉加热, 每100 ml培养基加入1 g 蓝色染料, 搅拌均匀, 倒入培养瓶。
2. 饥饿果蝇: 3~5 日龄的果蝇, 用指形管分装约 100 只左右, 放入 1%琼脂培养基中, 饥饿处理 24 h。
3. 预喂食物: 将饥饿的果蝇分为两组, 一组琼脂预喂组, 放在 1% agar 食物瓶中, 继续饥饿; 另一组蛋白预喂组, 放入 1.7% tryptone 食物中, 压低瓶塞到瓶高的一半或 2/3 处, 25 °C 静置 30 min。注意实验过程中尽量不要把果蝇压在棉塞与培养瓶之间, 如果有压到的果蝇, 收集时要去除这些压到的, 因为它们没有接触检测食物。
4. 检测果蝇进食: 将饥饿后/预喂后的果蝇快速倒入蓝色食物瓶中, 压低瓶塞到瓶高的一半或 2/3 处 (见图 1A), 25 °C 静置 10 min 后, 迅速收集果蝇到空管中, -20 °C 暂时冷冻 (最长可以保存到两周左右)。

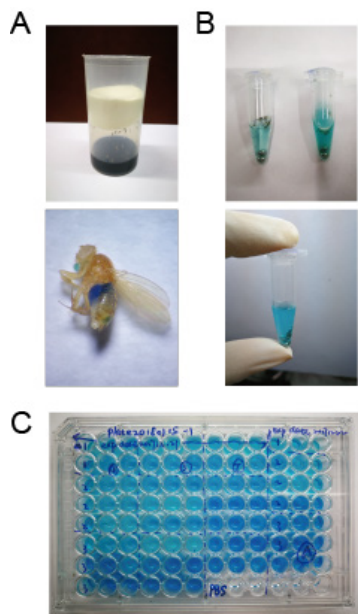


图 1. 染料法检测进食量. A. 上图：实验过程中压低瓶塞；下图：果蝇摄取蓝色食物。B. 上图为研磨前后的离心管，下图为离心后的离心管。C. 加样的 96 孔板。

5. 收集冷冻果蝇中的雌蝇，转移到 2 ml 冻存管，而后放入液氮迅速冷冻。
6. 摇动液氮速冻过的果蝇，以将果蝇头部去除，收集身体躯干部分，每 10 只/组分装到预先加入 500 ml PBS 溶液及磁珠的离心管中，每个样品分装 3 组重复。
7. 将样品置于粉碎研磨仪以 60 Hz 研磨 5 s。
8. 将样品置入常温离心机中以 $15,871 \times g$ 转速离心 20~30 min (见图 1B)。
9. 取出样品，小心吸出 100 μ l 上清液，加入 96 孔板中 (见图 1C)。
10. 吸取 100 μ l PBS 作为溶液吸光度的本底值，重复 3 个孔。
11. 将 96 孔板尽快放入读板机中在 620 nm 波长下读取 OD 值。
12. 数据处理和分析：导出读板机读数文件，对应样品标记，整理数据，将同一实验处理的 3 个采样重复做平均，减去 PBS 的空白对照，作为该处理下果蝇群体的进食量。数据处理以 agar 组进食量为单位 1，进行归一处理，获得两组处理的相对进食量。

计算不同营养食物预喂后的抑制指数，以蛋白预喂为例：

$$\text{抑制指数} = \frac{(\text{蛋白预喂组进食量} - \text{琼脂预喂组进食量})}{\text{琼脂预喂组进食量}}$$

统计分析组间差异显著水平，数据处理和作图可在 GraphPad Prism 6 等统计软件完成。

结果与分析

野生型果蝇经过蛋白食物的预喂，果蝇表现出显著降低的进食量 (图 2)，这一现象，我们定义为蛋白引起的进食抑制现象 (Protein-Induced Feeding Inhibition, PIFI) (Sun 等, 2017)。在蛋白营养感知突变体果蝇 *fit⁸¹* 中，预喂蛋白组的果蝇进食量维持较高水平。突变体的蛋白抑制指数与野生型果蝇相比具有显著差异。该结果是已发表论文中部分结果的独立重复。

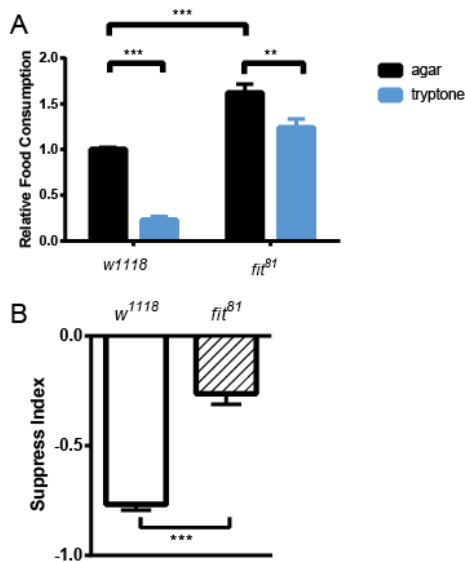


图 2. 野生型与突变体果蝇在预喂范式中进食结果. A. *w¹¹¹⁸* 与 *fit⁸¹* 果蝇在预喂范式中的相对进食量. B. *w¹¹¹⁸* 与 *fit⁸¹* 果蝇的抑制指数. $n = 8$, $**P < 0.05$, $***P < 0.001$, Student's *t*-test.

注意事项

1. 本实验建议对果蝇品系做双盲标记。
2. 实验需要测定果蝇摄入不加染料的食物后的吸光度，作为空白对照。
3. 由于食物做好以后晾干时间的长短差异会导致其水分含量有差别，注意控制检测培养基在不同批次制作中的软硬一致。

4. 染料的浓度可以根据实际情况进行调整，但要保证同一实验浓度一致；终浓度不能超过读板机读取吸光度的最大量程。
5. 加有防腐剂的检测食物，可以 4 °C 保存并重复使用 3~4 天，无防腐剂的食物 4 °C 保存可以使用 2 天。
6. 在倒入和倒出果蝇到检测瓶过程中要尽可能快速，同时进行的检测果蝇组数不宜过多 (10 组以内)。
7. 由于雌雄果蝇在进食表现往往具有雌雄差异，后续检测根据需要，选择雌雄分别分析，本方法中以雌蝇为分析对象，故只收集雌蝇做后续检测。
8. 装入冻存管的果蝇，要注意检查，是否有果蝇是饥饿处理过程中已经死亡的，要剔除。
9. 去头步骤中，要注意检查果蝇的头部是否去除，躯干是否完整，不完整的躯干会有色素泄露，要剔除。
10. 由于气候原因，果蝇可能会带静电，分装时，一定要确保每个离心管果蝇只数准确。
11. 分装果蝇到离心管时，尽可能随机采样，避免人为因素的偏差。
12. 尽量保证一个测量处理有 2~3 个测量重复做平均。
13. 染料法的使用需要注意限制检测时长，果蝇摄入的食物量不能超出检测时间内其消化系统的总容量，否则由于染料不能在体内累积，会发生排泄，就不能准确反映其进食量。在本方法中，我们推荐检测时长为 10 min。

溶液配方

1. 固体食物 (1,000 ml)

玉米粉	68 g
黄豆粉	9 g
啤酒酵母	16 g
琼脂	5 g
麦芽糖	43 g
防腐剂丙酸	4.5 ml

致谢

感谢刘畅, 孙璟晗对该方法的贡献。感谢国家自然科学基金 (31571089、31730045) 对本工作的支持。本方法参见 2017 年已发表于 *Nature Communications* 的 *Drosophila* FIT is a protein-specific satiety hormone essential for feeding control (Sun 等, 2017)。

参考文献

1. Deshpande, S. A., Carvalho, G. B., Amador, A., Phillips, A. M., Hoxha, S., Lizotte, K. J. and Ja, W. W. (2014). [Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology](#). *Nat Methods* 11(5): 535-540.
2. Edgecomb, R. S., Harth, C. E. and Schneiderman, A. M. (1994). [Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state](#). *J Exp Biol* 197: 215-235.
3. Gordon, M. D. and Scott, K. (2009). [Motor control in a *Drosophila* taste circuit](#). *Neuron* 61(3): 373-384.
4. Itskov, P. M., Moreira, J. M., Vinnik, E., Lopes, G., Safarik, S., Dickinson, M. H. and Ribeiro, C. (2014). [Automated monitoring and quantitative analysis of feeding behaviour in *Drosophila*](#). *Nat Commun* 5: 4560.
5. Ro, J., Harvanek, Z. M. and Pletcher, S. D. (2014). [FLIC: high-throughput, continuous analysis of feeding behaviors in *Drosophila*](#). *PLoS One* 9(6): e101107.
6. Sun, J., Liu, C., Bai, X., Li, X., Li, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Guo, J. and Li, Y. (2017). [Drosophila FIT is a protein-specific satiety hormone essential for feeding control](#). *Nat Commun* 8: 14161.
7. Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004). [Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans](#). *Nature* 430(7000): 686-689.
8. Yapici, N., Cohn, R., Schusterreiter, C., Ruta, V. and Vosshall, L. B. (2016). [A taste circuit that regulates ingestion by integrating food and hunger signals](#). *Cell* 165(3): 715-729.