果蝇肠道损伤检测方法–蓝精灵实验

Smurf Assay to Detect *Drosophila* Intestine Leakage

俞珺璟¹, 杨烁², 潘磊^{2,*}

¹ 细胞分析技术平台, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海; ² 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海

*通讯作者邮箱: panlei@ips.ac.cn

引用格式: 俞珺璟, 杨烁, 潘磊. (2019). 果蝇肠道损伤检测方法–蓝精灵实验. *Bio-101* e1010267. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010267.

How to cite: Yu, J. J., Yang, S. and Pan, L. (2019). Smurf assay to detect *Drosophila* intestine leakage. *Bio-101* e1010267. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010267. (in Chinese)

摘要: 肠道的完整性是衡量个体健康的重要指标之一, 与肠道感染、炎症、衰老等生理病理过程密切相关。无论是 Crohn 肠病和溃疡性肠炎, 还是肠道局部恶性增生都会伴随着肠壁结构的破坏, 导致肠内容物渗漏至体腔, 甚至诱发机体系统性的菌毒血症。果蝇的中肠上皮细胞层可以很好的模拟高等动物的小肠上皮细胞结构, 是解析肠道病原-宿主互作过程中肠上皮结构动态平衡的优良场所。本文详细地描述了如何利用蓝精灵 (Smurf) 实验, 快速简便地评判果蝇肠道的完整性。以非可代谢性蓝色染料溶液饲喂果蝇, 通过观察染料在果蝇体内的浸透性, 来判断果蝇肠道完整度 (Rera 等, 2012)。如果蝇肠道出现渗漏, 饲喂后的蓝色染料将从肠道渗漏至全身; 反之, 蓝色染料只会存在于消化道中, 不会扩散。因此, 蓝精灵实验可以作为评判肠道生理病理变化的指标之一。

关键词: 果蝇, 肠道损伤, 蓝精灵实验

材料与试剂

1. 0.22 μ m 滤膜 (Millipore, SLGV033RB)
2. 滤纸
3. 成虫果蝇或三龄幼虫
4. Sucrose (Sigma, catalog number: S0389)
5. 可食用蓝色染料 (Care™ 亮蓝特浓级 85%, OC BB 85%)
6. DSS (MP, 160110)

7. 5%蔗糖溶液 (见溶液配方)
8. Smurf 染料溶液 (见溶液配方)
9. 5% DSS 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 体视镜 (Leica, S6)

实验步骤

1. 配制指示溶剂，将可食用蓝色染料以 2.5% (质量体积比) 溶于 5%的蔗糖溶液，并用 0.22 μm 滤膜过滤后无菌保存。
2. 将双层圆形滤纸片塞入装有食物的饲养管中，完全覆盖食物，吸取 200 μl 指示溶剂，均匀的悬滴于滤纸片上，等滤纸片吸干溶剂后，再吸取 200 μl 指示溶剂，二次均匀滴加在滤纸片上，静置 (滤纸被浸润至饱和但不会有多余液体溢出为准)。
3. 将待检测的成虫果蝇先用 CO_2 麻醉，每挑选 20 只，放入一个饲养管中。将饲养管横放，用刷子先将果蝇轻轻刷到管壁上，等果蝇完全苏醒后，再将饲养管慢慢竖放。
4. 在该果蝇管中饲喂 9~12 个小时后在镜下观察 smurf 的情况，如果只有口器至消化道呈现蓝色者判定为肠道未出现渗漏；如果除口器至消化道之外腹腔、胸腔、头部等部位出现蓝色则判定为肠道出现渗漏，说明果蝇肠道结构发生变化出现严重损伤。
5. 因肠道出现渗漏后，蓝色染料浸满全身，果蝇形似蓝精灵，因此，此实验命名为蓝精灵实验，实验结果以呈现蓝精灵果蝇的数目除以总数目乘以 100%，以指征肠道渗漏果蝇的比例数。对于同一种基因型果蝇的同样处理，至少需要三管作为平行实验，且至少需要三次独立实验重复。

注意事项

成虫果蝇可以提前饥饿脱水 2 小时，再喂食染料，将会极大提高摄入率和缩短观察时间。但对于有些生理病理缺陷的果蝇，长时间饥饿脱水处理可能会造成部分果蝇死亡。

结果与分析

正常果蝇肠道壁完整，饲喂可食用蓝色染料后，染料将集中于果蝇的口器、前胃及肠道中。我们以 **Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS)** 饲喂后的果蝇为阳性对照。DSS 可对肠道基底层造成损伤（主要成分为胶原蛋白 IV），使得肠道壁变薄，肠道组织出现损伤。也因此 DSS 常被用来作为诱导肠炎模型的药物（Amcheslavsky 等，2009）。给果蝇高剂量长时间饲喂 DSS 引发的果蝇死亡率增加，也是由肠道损伤引起的。果蝇中常用 DSS 诱导肠道损伤作为研究肠道干细胞修复的模型（Amcheslavsky 等，2009）。因此，蓝精灵实验可以指示果蝇在 DSS 诱导下肠道渗漏的现象。DSS 诱导肠道损伤的果蝇在饲喂可食用蓝色染料后，不仅在口器、前胃及肠道中滞留蓝色染料，在果蝇的整个腹腔，甚至胸腔及头部都会出现蓝色染料。同理，在幼虫时期也可以使用该方法来指征果蝇肠道的完整性（He 等，2017）（图 1）。

图 1. 果蝇蓝精灵实验. 3 龄幼虫饲喂 5% DSS 24 小时后, 大约有 20% 的幼虫可检测到肠道渗漏 (图 A 与图 B 对照); 成虫饲喂 5% DSS 48 小时后, 大约有 40% 的成虫可检测到肠道渗漏 (图 C 与图 D 对照)。E 图为统计数据。

溶液配方

1. 5%蔗糖溶液

称取 5 g 蔗糖溶于 100 ml ddH₂O, 并用 0.22 μm 的滤膜过滤后无菌保存

2. Smurf 染料溶液

称取 2.5 g 可食用蓝色染料，溶于 100 ml 5%蔗糖溶液中，并用 0.22 μ m 的滤膜过滤后无菌保存

3. 5% DSS 溶液

0.5 g DSS 溶于 10 ml 5%无菌蔗糖溶液中

致谢

感谢潘磊实验室全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (31870887, 31570897–潘磊)、(31670909–俞璟璟) 和中国科学院青年创新促进会优秀会员 (潘磊) 的支持。本文实验方案改编自本实验室已发表的文章 Nat Microbiol. 2017 Apr 18; 2:17056. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.56.

作者贡献声明：俞璟璟和杨烁完成全部实验和图片采集。俞璟璟和潘磊撰写文章。

参考文献

1. Amcheslavsky, A., Jiang, J. and Ip, Y. T. (2009). [Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*](#). *Cell Stem Cell* 4(1): 49-61.
2. He, X., Yu, J., Wang, M., Cheng, Y., Han, Y., Yang, S., Shi, G., Sun, L., Fang, Y., Gong, S. T., Wang, Z., Fu, Y. X., Pan, L. and Tang, H. (2017). [Bap180/Baf180 is required to maintain homeostasis of intestinal innate immune response in *Drosophila* and mice](#). *Nat Microbiol* 2: 17056.
3. Rera, M., Clark, R. I. and Walker, D. W. (2012). [Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(52): 21528-21533.