果蝇感光神经元细胞内记录

Intracellular Recording of *Drosophila* Photoreceptors

吴静琳¹, 胡雯², 韩俊海^{1,*}

¹生命科学研究院, 东南大学, 南京, 江苏; ² 科研中心, 赣南医学院, 赣州, 江西

*通讯作者邮箱: junhaihan@seu.edu.cn

引用格式: 吴静琳, 胡雯, 韩俊海. (2019). 果蝇感光神经元细胞内记录. *Bio-101* e1010269. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010269.

How to cite: Wu, J. L., Hu, W. and Han, J. H. (2019). Intracellular recording of *Drosophila* photoreceptors. *Bio-101* e1010269. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010269. (in Chinese)

摘要: 光信号传导是将光信号转化为细胞内电信号的过程, 该过程主要发生在感光细胞中。光刺激可以激活感光细胞膜上的感光受体 (视紫红质), 进而激发下游的信号通路, 最终引起感光细胞膜上的离子通道开放或者关闭, 将光信号转化为电信号。感光神经元细胞内记录能够记录单个 R1-R6 感光细胞接收光刺激前后的电位变化, 可以精细反映 R1-R6 感光细胞对于光刺激的反应。

关键词: 感光神经元, 信号传导, 细胞内记录

材料与试剂

1. 双面胶带
2. 单面胶带
3. 1 ml 无菌注射器 (江苏客乐医用器械有限公司)
4. 硼硅玻璃毛细管 (World Precision Instruments, catalog number: 1B100-4, 批号: 2009326)
5. 微量上样枪头 0.5~10 μ l (Eppendorf, 批号: E273231P)
6. 离心管 (海门臣星实验器材经营部, 规格: 1.5 ml)
7. 培养皿 (直径: 35 mm) (康宁, catalog number: 430165)
8. 6 cm $\times$ 5 cm $\times$ 2 cm 的塑料板
9. 1~3 日龄的果蝇

10. 凡士林 (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A510146)

11. 林格氏溶液 (见溶液配方)

氯化钠 (NaCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: 746398)

氯化钾 (KCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: P4504)

二水氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sangon Biotech, catalog number: C0556)

碳酸氢钠 (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761)

酚红 (南京助研生物技术有限公司, CAS: 143-74-8)

12. 导电溶液 (见溶液配方)

导电膏 (Parker Laboratories, 批号: REF 17-05, 容量: 5 盎司)

林格氏溶液

13. 2 M 氯化钾溶液 (见溶液配方)

氯化钾 (KCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: P4504)

仪器设备

1. 避光布

2. 镊子 (中镜科仪, catalog number: EZ5889B)

3. 电子快门控制器 (Newport)

4. 轴突数据采集系统 (Molecular Devices, model: 1550B)

5. 细胞内静电计 (Warner Instruments, model: IE-210)

6. 供电系统 (Newport, model: 68938)

7. 钨灯 (飞利浦, model: 409850)

8. 热过滤器 (Newport, model: 60008)

9. 聚光镜 (Newport, model: 76992)

10. 光纤 (Newport, model: 40230)

11. 电脑 (联想, model: L195wD)

12. 显微镜 (尼康, model: SMZ800)

13. 玻璃管电极 2 个 (Warner Instruments, model: 64-0964)

14. 三轴精细机械显微操纵器 2 个 (Narishige, model: TM-1; Sarasota, model: KITE-R)

15. 电极夹 1 个 (Warner Instruments)
16. 拉针仪 (Sutter Instrument, model: P-97)

软件

电信号处理软件:

1. Clampfit10.6
2. Clampex10.6
3. AxoScope10.6

实验步骤

1. 拉针: 将拉记录电极的程序设定为: 加热 650, 拉力 70, 速度 75, 时间 90。此时拉出来的玻璃毛细管的椎体长度约为 7 毫米, 尖端为 0.5 至 0.9 微米, 电阻为 60 至 70 兆欧。将拉参比电极的程序设定为: 加热 625, 拉力 85, 速度 78, 时间 98。此时拉出来的玻璃毛细管的椎体长度约为 4 mm, 尖端为 1~3 μm , 电阻为 1~10 M Ω 。特别注意的一点是记录电极的电阻达到 60 M Ω 以上的目的是为了让电极尖端只记录到单个感光细胞。
2. 将微量上样枪头剪短, 细长部分套在 1 ml 无菌注射器的针头上, 共制作两个, 分别用来吸取培养皿内的林格氏溶液和 2 M 的氯化钾溶液, 将两种溶液分别注入参比电极和记录电极, 拧好以后, 将参比电极和记录电极固定在左右三轴精细机械微操纵器上。(图 1)

图 1. 玻璃电极和毛细管

3. 挑选 1~3 日龄的果蝇，用镊子夹住果蝇翅膀，将果蝇翅膀轻轻粘在双面胶上，并使其身体倾斜 45°左右，完整露出一侧复眼，操作过程中避免触碰到果蝇复眼，以防止复眼被损坏。最后用单面胶带分别固定住果蝇背侧和果蝇腹部，这样既可以保证复眼结构完整，又能够避免果蝇在实验过程中颤动。(图 2)

图 2. 固定果蝇示意图

4. 在显微镜下，利用两个 1 ml 无菌注射器在果蝇复眼表面上开一个 0.5 mm 左右的小口，尽量避免破坏果蝇复眼内部结构，损伤感光细胞，在开口处抹上少量凡士林，避免开口处干燥，细胞死亡。同时在整个操作过程中，要时刻注意果蝇是否仍然活着，可通过观察果蝇触角是否运动来判断。(图 3)

图 3. 复眼开口示意图

5. 将果蝇放置在显微镜底下。在显微镜视野范围内，利用使用过的玻璃毛细管沾取少量导电溶液均匀涂抹于果蝇靠近单面胶带上面位置的背部，避免涂到复眼。使得背部变得透亮即可。此时应注意导电溶液的涂抹量，过少的导电溶液在实验过程中容易干掉，过多的导电溶液则会使果蝇的复眼和背部连通，都会使得电信号的获取无法顺利进行。
6. 通过操控三轴精细机械显微操纵器将参比电极轻轻搭在果蝇背部涂有导电溶液的位置，随后将记录电极轻放在复眼开口处，通过缓慢地调控三轴精细机械显微镜的 Z 轴使得记录电极逐渐插入到复眼内部，在插入复眼内部过程中，在不同的插入点，给予果蝇光刺激，通过观察记录到的电位结果来判断是否将记录电极插入到单个的 R1-R6 感光细胞。当发生静息电位突然骤降，则暗示电极有可能进入感光细胞，此时进行光照刺激，如记录的电位结果图如图四，则表示记录电极成功插入单个感光细胞。随后暗适应 5 分钟后开始记录果蝇的电压变化。

7. 先在暗光下运行程序 10 s，随后给果蝇一个 5 s 的光刺激，光强为 400 lx，再让果蝇暗适应 10 s，随后再次给一个 5 s 的刺激，循环记录两次。每只果蝇记录时间不要超过 20 min。(图 4)

野生型果蝇细胞内记录：

注：on开灯 off关灯

图 4. 野生型果蝇细胞内记录

8. 每个基因型的果蝇测 12 只以上。然后统计实验结果并进行分析。

溶液配方

1. 林格氏溶液
 - NaCl 8.6 g/L
 - CaCl₂·2H₂O 0.33 g/L
 - KCl 0.3 g/L
 - NaHCO₃ 4 g/L
 - 酚红少量 (作为 pH 指示剂)
2. 导电溶液 (存放于 1.5 ml 离心管)
 - 导电膏 600 μl
 - 林格氏溶液 600 μl
3. 2 M 氯化钾溶液
 - KCl 149.1 g/L

致谢

此实验方法是基于实验室胡雯 (Hu 等, 2015) 已发表的论文进行的拓展和细化。

参考文献

1. Hu, W., Wang, T., Wang, X. and Han, J. (2015). [I_h channels control feedback regulation from amacrine cells to photoreceptors](#). *PLoS Biol* 13(4): e1002115.