果蝇肠道上皮干细胞克隆的诱导和大小分析

Induction and Analysis of Intestinal Stem Cell Clones in the *Drosophila* Midgut

殷畅，裘荣文*

北京生命科学研究所，北京

*通讯作者邮箱: xirongwen@nibs.ac.cn

引用格式: 殷畅, 裘荣文. (2019). 果蝇肠道上皮干细胞克隆的诱导和大小分析. *Bio-101* e1010275. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010275.

How to cite: Yin, C. and Xi, R. W. (2019). Induction and analysis of intestinal stem cell clones in the *Drosophila* midgut. *Bio-101* e1010275. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010275. (in Chinese)

摘要: 本文系统介绍在果蝇肠道上皮中诱导干细胞克隆的两种主要方式—FRT/FLP 系统和 MARCM 系统, 并简述这两种系统的作用原理。利用这两种系统, 可以在果蝇肠道上皮中诱导产生由干细胞后代组成并能被标记蛋白 (如 GFP) 所标记的细胞克隆。通过这一方法, 可以对特定基因在干细胞增殖和分化过程中发挥的作用进行分析。本文同时对干细胞克隆的诱导方法和分析过程进行了简要说明。

关键词: FRT/FLP 系统, MARCM 系统, 干细胞克隆

背景介绍

FRT/FLP 系统:

依赖于酵母中位点特异的重组酶 flippase (Flp) 和它的识别靶向序列 (FRT), 我们可以在果蝇肠道上皮中实现具有时空限制的转基因表达 (del Valle Rodriguez, 2011)。这一技术称为 Flp-out, 其主要原理是通过热激 (heat shock) 或其他手段诱导 Flp 的表达, 使其识别 FRT 位点并通过两个 FRT 位点的翻转去除导致基因沉默的转录终止信号, 从而实现在单一细胞中诱导特定基因的激活 (图 1)。

通过这一技术, 我们可以在成体果蝇肠道上皮中诱导特定基因激活或沉默的单细胞克隆, 并通过观察克隆内外细胞形态和组成的差异研究特定基因在果蝇肠道上皮干细胞自我更新和分化过程中发挥的功能。

Flp-out 技术还可以与其他的双向基因表达系统 (如 GAL4-UAS) 相结合, 实现多层基因表达控制体系。

图 1. Flp-out 系统原理示意图

MARCM 系统:

于 1999 年出现的 MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) 系统实现了在特定组织中诱导产生特定基因突变的克隆。MARCM 通过 GAL4/UAS 双向转基因诱导系统控制报告基因的表达。在 MARCM 系统中, 通过热击使携带突变基因和 Gal80 (Gal4 抑制因子) 的杂合细胞在有丝分裂过程中发生重组, 产生两个纯合的子细胞, 其中一个子细胞含有两个拷贝的突变基因并因为 Gal80 的缺失表达 GFP 荧光蛋白, 并且这一子细胞的后代都将表达 GFP (Lee, 2014)。

通过这一技术, 我们可以在成体果蝇肠道上皮中诱导特定基因突变、激活或沉默的干细胞克隆, 从而进一步研究特定基因在果蝇肠道上皮干细胞自我更新和分化过程中发挥的功能 (具体原理详见 Wu 和 Luo, 2006)。

材料与试剂

1. 移液枪配套枪头
2. 培养管
3. 3~5 天的雌果蝇
4. 染色剂

5. 酵母

仪器设备

1. 移液枪 (吉尔森公司)
2. 精细解剖镊 (WPI, Dumoxel 合金镊子, #5 14098)
3. 激光共聚焦显微镜 (尼康公司, Nikon A1-R)
4. 体式显微镜 (Leica S6E)
5. 水浴锅 (上海一恒科技有限公司)

软件

1. Adobe Illustrator
2. ImageJ

实验步骤

一、果蝇肠上皮干细胞克隆诱导方法

1. 根据研究目的和所选用的系统正确地收集处女蝇和雄蝇, 并 25 °C 下进行交配。
2. 在 F1 代中挑选孵化 3~5 天的雌果蝇, 放入空的培养管中 (在培养管侧壁上涂抹一层薄薄的酵母), 待果蝇苏醒后放入 37 °C 水浴锅热激 1 小时。
3. 将果蝇转入 25 °C 培养一段时间 (根据实验需要确定培养时长, 可以选择多个时间点观察不同时期克隆的生长情况, 如 4 d, 7 d, 10 d 和 14 d)。
4. 对 F1 代果蝇进行解剖和抗体染色, 具体方法参照“果蝇肠上皮免疫荧光染色” (金真和裘荣文, 2019)。
5. 制片, 并通过共聚焦显微镜观察及拍摄典型克隆。

二、使用 AI (Adobe Illustrator) 对果蝇肠道上皮干细胞克隆进行处理

1. 在 AI 用铅笔工具绘制路径圈出克隆所在的区域。
2. 更改路径的描边颜色, 并在描边菜单选项中修改相关的参数 (图 2)。
3. 使用 Ctrl + C 复制已有路径, Ctrl + Shift + V 将路径粘贴至其他通道上, 并对每一组路径和图片进行编组。

图 2. 使用 AI 对图片进行处理。通过铅笔工具描绘出克隆的边缘，并对路径边框的颜色和类型进行调整，如可以将其设置为虚线形式。

三、使用 ImageJ 软件统计肠道上皮干细胞克隆中的细胞数目

1. 通过 **freehand selections** 工具选择克隆所在的区域。
2. 根据图片格式将此区域复制到各个通道上。
3. 通过 **Multi-point Tool** 工具对区域内的细胞数目进行统计。

参考文献

1. 金真，裘荣文. (2019). [果蝇肠上皮的免疫荧光染色](#). *Bio-101* e1010270. Doi: 10.21769/BioProtoc.101270.
2. del Valle Rodriguez, A., Didiano, D. and Desplan, C. (2011). [Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*](#). *Nat Methods* 9(1): 47-55.
3. Lee, T. (2014). [Generating mosaics for lineage analysis in flies](#). *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3(1): 69-81.
4. Wu, J. S. and Luo, L. (2006). [A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker \(MARCM\) in *Drosophila*](#). *Nat Protoc* 1(6): 2583-2589.