记录与分析视觉刺激引发的果蝇爬行行为的实验方法

Protocol for Recording and Analyzing Vision-induced Walking Behavior in *Drosophila*

纪小小^{1,2}, 周艳琼¹, 段文兰^{1,2}, 刘力^{1,2,*}

¹脑与认知国家重点实验室, 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: liuli@ibp.ac.cn

引用格式: 纪小小, 周艳琼, 段文兰, 刘力. (2019). 记录与分析视觉刺激引发的果蝇爬行行为的实验方法. *Bio-101* e1010276. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010276.

How to cite: Ji, X. X., Zhou, Y. Q., Duan, W. L. and Liu, L. (2019). Protocol for recording and analyzing vision-induced walking behavior in *Drosophila*. *Bio-101* e1010276. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010276. (in Chinese)

摘要: 不同的外界视觉刺激可以引起果蝇不同的行为学反应。本实验中, 利用圆筒状的LED (Light Emitting Diode) 显示器模拟给予果蝇不同的视觉刺激, 并通过摄像机记录果蝇实时的运动轨迹来监测果蝇对于不同视觉刺激的反应。最终通过分析轨迹的坐标信息来获取果蝇的各项行为学参数, 例如爬行速度, 运动活性, 追踪指数等等。

关键词: 果蝇, 视觉, 爬行, 行为

材料与试剂

1. 羽化后的果蝇成蝇

仪器设备

1. 5#镊子
2. 解剖剪 (维纳斯剪, catalog number: 54138B)
3. 体式显微镜
4. 二氧化碳麻醉设备
5. 空调
6. 加湿机
7. 本实验装置

装置部件:

- 1) LED 圆筒状屏幕
- 2) 白色圆形塑料实验平台
- 3) 数码摄像机 (Panasonic, WV-BP330, 松下电器中国有限公司)和镜头 (Tamron, 13VG550ASII, 日本腾龙公司)
- 4) 电缆 (183882-02 IMAQ-BNC-1, 松下电器中国有限公司)
- 5) 视频采集卡 (NI PCI-1410, 美国国家仪器有限公司)
- 6) 计算机

具体装置如下(如图 1):

图 1. 实验装置示意图 (红点示意果蝇)

一个高 330 毫米，内径为 300 毫米的 LED 圆筒状屏幕，筒内壁均匀分布了 200×64 个三色 LED 小灯 (深圳市美德医疗电子技术有限公司，深圳，中国)，LED 圆筒状屏幕所呈现的视觉刺激可由与其相连的电脑上的 LED 演播室软件 (深圳灵星雨科技发展有限公司) 所控制，电脑中的发送卡将视觉刺激的信号通过网线传送至 LED 屏幕的接收卡，而与接收卡通过并口数据线连接的电路板可以直接控制 LED 屏幕的状态。

在圆筒底部的中心有一个直径为 100 毫米，高为 5 毫米的白色圆形塑料实验平台，实验平台外侧有一个环形水槽，水槽外侧边缘应略高于实验平台 (约 2 毫米)，

水槽注满水后可以防止实验时果蝇从实验平台上爬离。平台和水槽均由北京生科院精密加工中心制作。当果蝇位于实验平台正中央 (即圆筒底部正中心) 时, 每个 LED 小灯对应的果蝇的水平视角为 1.8 度。

平台正上方有一台数码摄像机 (Panasonic, WV-BP330, 松下电器中国有限公司) 和镜头 (Tamron, 13VG550ASII, 日本腾龙公司), 通过同轴电缆 (183882-02 IMAQ-BNC-1, 松下电器中国有限公司) 与计算机主机中的视频采集卡 (NI PCI-1410, 美国国家仪器有限公司) 连接, 将实验中采集到的图像传递至电脑的 Limelight 软件 (Coulbourn Instruments) 进行果蝇位置及其爬行轨迹的分析。Limelight 软件的采样频率设定为每秒 12 帧。帧率也可以根据需求自行调节, 主要受到摄像机采样频率的限制。通过调节摄像机与实验平台间的距离以及镜头的放大倍数, 使摄像机记录到的真实视野为 $100 \times 100 \text{ mm}^2$ 的正方形区域 (覆盖实验平台), 得到的画面分辨率为 480×480 (也可设置为 240×240) (Zhou 等, 2012)。

软件

1. LED 演播室软件 (深圳灵星雨科技发展有限公司)
2. Limelight 软件 (Coulbourn Instruments)

实验步骤

一、实验前准备

1. 选择果蝇品系, 根据实验需要进行杂交。实验果蝇在温度为 25°C , 相对湿度为 60%, 日夜周期 12 h/12 h 的培养间饲养。
2. 收集实验所用品系当日羽化的果蝇于新培养瓶中备用, 约 40 只/大瓶。
3. 至少在实验前 24 h 对果蝇进行剪翅膀处理, 并保证实验当天果蝇为 3~5 日龄:
 - 3.1 用二氧化碳将果蝇麻醉后置于麻醉台上, 并放置于体式显微镜下。
 - 3.2 打开冷光源, 将体式显微镜的倍数调至最低 (使视野内呈现尽量多的果蝇, 提高效率), 调整焦距及冷光源的光照方向至剪翅台的中央清晰可见 (图 2A)。
 - 3.3 用刷子轻轻将果蝇平铺在尽可能小的面积中。
 - 3.4 左手持 5#镊子, 右手持解剖剪 (维纳斯剪, 54138B), 用镊子将果蝇调整至右侧身体正对物镜, 翅膀的后部指向左手镊子, 用镊子将果蝇的两只翅膀在靠近

端 1/3 处夹住，同时用解剖剪剪去两个翅膀远端的 2/3 部分 (图 2B~2D)。

3.5 重复步骤 3.4 完成剪翅台上所有果蝇的剪翅后，将果蝇重新扫入培养瓶。

图 2. 果蝇剪翅处理

二、实验操作

1. 打开空调和加湿机，调整 LED Arena 的温度至 24~25 °C (实验期间需监测温度)，湿度尽量接近 60%。
2. 打开摄像头、LED Arena 以及电脑的电源。
3. 向果蝇实验平台周围的水槽中注满 25 °C 的水，保证液面与实验平台接近水平。
4. 打开 LED 演播室软件，设置实验所用的视觉刺激 (运动的光栅、静止的黑色条纹等)。可以根据需要调节屏幕亮度 (现设置为 5%)。
5. 打开 Limelight 软件，使用 1 camera-1 channel 通道，在该模式下新建一个文件夹，在该文件夹中建立一个实验轨迹数据组，以视觉刺激和果蝇品系命名该文件夹和数据文件 (例如：数据组的名称“W-D-2 bars-4off_WTB”中“W-D-2 bars-4off”代表所用的视觉刺激，“WTB”代表果蝇品系)。
6. 用 chamber 从培养瓶中取出一只果蝇。将培养瓶竖直拿在手中，有塞子的一侧朝上，将塞子慢慢打开一个小口，果蝇会沿着小口向外爬出，用 chamber 将果蝇罩住，待果蝇爬到 chamber 的壁上再将 chamber 从瓶口处移开并用手指堵住 chamber 口。

- 将装有果蝇的 **chamber** 扣放在桌面上 (图 3)。在实验轨迹数据组下新建一个轨迹，并以果蝇的性别和序号命名 (例如“m1”代表本实验组的第一只雄蝇，“f1”代表本试验组的第一只雌蝇)。点击“reference”，采集一帧作为参考帧。
- 视觉刺激选定后，将果蝇放至实验平台上，待其适应 5~10 s 的时间后，点击“start”开始记录爬行轨迹，轨迹记录结束后取出果蝇。每只果蝇的记录时间可以自行调整，一般每只果蝇 3 min。若使用水平运动刺激，则每只果蝇给予顺时针、逆时针两个方向的刺激各 90 s。
 - 重复步骤 6 和 7，完成该组轨迹记录。重新开始一组果蝇的记录时需要用高浓度酒精清理台面，避免残留的气味等对之后的果蝇行为产生影响。在清理台面之后要及时通风，使用电风扇等工具加速空气流通，等待十分钟后再继续进行实验。重复步骤 5 开始下一组实验。
 - 实验结束后用吸耳球吸干水槽中的水。
 - 关闭 LED 演播室软件，关闭 Limelight 软件。
 - 关闭摄像头、LED Arena 以及电脑的电源。
 - 关闭空调，关闭加湿机。

图 3. 用 **chamber 取果蝇的方法.** A. 手持装有果蝇的培养瓶并使瓶口向上，将 **chamber** 靠近瓶口，然后将靠近 **chamber** 处的瓶塞掀起一个小口. B. 等待果蝇 (红色椭圆形圈出) 沿着开口的缝隙爬至 **chamber** 内. C. 果蝇爬入 **chamber** 后，将 **chamber** 扣放在桌面上等待实验取用。

结果与分析

1. 通过在实验中对于果蝇的行为轨迹的追踪，我们获得了记录果蝇所有坐标信息的“.lidd”类型的文件，我们需要点击 **Limelight** 软件位于 **1 camera-1 channel** 旁边的 **Analysis** 黄色按钮进入分析界面，并在该界面中打开实验得到的“.lidd”文件。
2. 点击 **analysis** 菜单栏下的 **Export path data** 和 **Export path pictures** 依次导出包含有每只实验果蝇爬行的轨迹坐标信息的 **Excel** 文件以及爬行轨迹的图像。
3. 在该实验组的文件夹下新建“**data**”、“**pic**”和“**result**”三个文件夹，并将 **Excel** 文件以及爬行轨迹的图像分别转移至“**data**”和“**pic**”文件夹下。
4. 将整理好的实验组文件夹放入 **matlab** 分析程序指定的“**data analysis**”文件夹下，打开 **matlab**，打开并运行对应的分析程序，分析需要的各种指数（例如瞬时运动速度、平均运动速度、运动活性，运动距离，运动目标追踪指数等等），最终得到的结果将存入实验组文件夹下的“**result**”文件夹。
5. 各种参数的计算原理如下：

瞬时运动速度：两帧之间的距离除以 1/12 秒；平均运动速度：所有瞬时运动速度的平均值；运动活性：运动时间（瞬时速度大于 0 的所有时间段）除以总时间；运动距离：所有两帧之间距离的加和。运动目标追踪指数：追踪目标的时间减去不追踪目标的时间再除以运动的总时间。

注意事项

1. 给果蝇剪翅膀时果蝇的麻醉时间应尽可能的短（每组控制在 5 min 之内），并且尽可能减少操作中对果蝇的伤害。
2. 二氧化碳麻醉后的果蝇在实验前应该至少恢复 24 h。
3. 给平台周围的水槽加水要适量，尽可能保证液面与台面平齐，否则可能会出现阴影或者反光区域，干扰果蝇运动轨迹的记录。
4. 用 **chamber** 将果蝇转移至平台时，要尽可能的轻放，避免果蝇受到剧烈震荡的刺激，而影响接下来的行为检测。
5. 水平运动的视觉刺激，每只果蝇应该先后检测两个方向的运动刺激，顺时针刺激时文件中果蝇的命名应在序号后加上“_clc”（如 **m1_clc**），而逆时针时则不需要添加任何后缀（如 **m1**）。

6. 在实验记录过程中，不要做倚靠操作台等会导致操作台有晃动的行为，减少对果蝇追踪目标的干扰。

致谢

该文章得到国家自然科学基金 (31571033, 91632107) 和中国科学院前沿重点研究计划 (QYZDY-SSW-SMC015)的资助；该实验方案改编自中国科学院生物物理研究所周艳琼和纪小小的博士毕业论文；使用该实验方案发表的文章: Zhou Y.O., *Journal of Experimental Biology* (2012)。

参考文献

1. Zhou, Y. Q., Ji, X. X., Gong, H. Y., Gong, Z. F. and Liu, L. (2012). [Edge detection depends on achromatic channel in *Drosophila melanogaster*](#). *J Exp Biol* 215: 3478-3487.