果蝇视网膜电图记录

Electroretinogram Recording of *Drosophila* Eye

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). 果蝇视网膜电图记录. *Bio-101* e1010280. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010280.

How to cite: Wu, J. L., Hu, W. and Han, J. H. (2019). Electroretinogram recording of *Drosophila* eye. *Bio-101* e1010280. Doi: 10.21769/BioProtoc.10101280. (in Chinese)

摘要: 光信号传导是将光信号转化为电信号的过程。它是通过激活 G 蛋白偶联受体信号通路完成的, 该过程在不同物种间具有高度的保守性。视网膜电位记录是一种场电位记录方法, 显示了果蝇复眼所有细胞对于光刺激反应的总和, 可以用来表征视觉信号传导的过程。

关键词: 光信号传导, 视网膜电位, 果蝇

材料与试剂

1. 双面胶带
2. 单面胶带
3. 6 cm × 5 cm × 2 cm 的塑料板
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 µl (Eppendorf, 批号: E273231P)
6. 1 ml 无菌注射器 (江苏客乐医用器械有限公司)
7. 离心管 (海门臣星实验器材经营部, 规格: 1.5 ml)
8. 培养皿 (直径: 35 mm) (康宁, catalog number: 430165)
9. 1~3 日龄的果蝇
10. 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: 143-74-80)

11. 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

仪器设备

1. 避光布 (图 1)

图 1. 视网膜电位记录装置

2. 镊子 (中镜科仪, catalog number: EZ5889B)

3. 电子快门控制器 (Newport) (图 2)

4. 轴突数据采集系统 (Molecular Devices, model: 1550B) (图 2)

5. 细胞内静电计 (Warner Instruments, model: IE-210) (图 2)

6. 供电系统 (Newport, model: 68938) (图 3)

7. 钨灯 (飞利浦, model: 409850) (图 3)

8. 热过滤器 (Newport, model: 60008) (图 3)
9. 聚光镜 (Newport, model: 76992) (图 3)
10. 光纤 (Newport, model: 40230) (图 3)
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) (图 4 和图 5)
14. 三轴精细机械显微操纵器 2 个 (Narishige, model: TM-1; Sarasota, model: KITE-R) (图 4)
15. 电极夹 1 个 (Warner Instruments) (图 4)
16. 拉针仪 (Sutter Instrument, model: P-97)

图 2. 电生理记录设备

图 3. 刺激光源装置

图 4. 果蝇视网膜电位记录台

图 5. 玻璃电极和毛细管

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: 将拉针仪的程序设定为: 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 。
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, 用来吸取培养皿内的林格氏溶液, 再将溶液注入玻璃电极和拉好的玻璃毛细管, 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。为防止毛细管溶液蒸发, 在未开始实验前, 将两个毛细管浸没在用培养皿盛放的林格氏溶液里。(图 4 和图 5)
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。操作过程中注意不要触碰到复眼, 以保持复眼的完好。最后用单面胶带固定住果蝇腹部, 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 6)

图 6. 固定果蝇示意图

4. 将固定的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整个复眼表面及其靠近单面胶带上位置背部，使得复眼和背部变得透亮即可。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。
5. 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，记录电极轻放在果蝇复眼表面。注意放电极的力度，要让果蝇复眼和背部都处于自然状态，尽量不要有凹陷，才能保证果蝇状态正常，这样记录的电信号结果才会更加稳定。(图 7)

图 7. 置放电极示意图

6. 最后让果蝇暗适应 5 min，再开始记录果蝇的视网膜电位。先运行程序 10 s，随后给果蝇一个 5 s 的光刺激，光强为 400 lux，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。(图 8)

野生型果蝇视网膜电图:

注: on开灯 off关灯

图 8. 野生型果蝇视网膜电图

7. 每个基因型的果蝇测 12 只以上。电位记录分析软件为 AxoScope10.6 与 Clamfit10.6, 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

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.