

全细胞记录成年果蝇大脑 I-LNv 细胞

Whole Cell Recordings of I-LNv Cells in Adult *Drosophila* Brain

王婷婷, 李倩, 韩俊海*

生命科学研究院, 东南大学, 南京, 江苏

*通讯作者邮箱: junhaihan@seu.edu.cn

引用格式: 王婷婷, 李倩, 韩俊海. (2019). 全细胞记录成年果蝇大脑 I-LNv 细胞. *Bio-101* e1010286. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010286.

How to cite: Wang, T. T., Li, Q. and Han, J. H. (2019). Whole cell recordings of I-LNv cells in adult *Drosophila* brain. *Bio-101* e1010286. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010286. (in Chinese)

摘要: 电生理技术是指以多种形式的能量 (电、声等) 刺激生物体, 记录和分析生物体发生的生物电现象和电特性的技术。本文中, 我们使用全脑解剖和全细胞记录的方法来表征成年果蝇 I-LNv 神经元的电学特性, 揭示调控生物节律和睡眠行为的细胞机制。

关键词: 电生理, 成年果蝇, I-LNv

材料与试剂

一、果蝇品系

1. *PDF-Gal4/+; UAS-mCD8-GFP/+*

注: *PDF-Gal4/+; UAS-mCD8-GFP/+* 由 *pdf-Gal4* 与 *UAS-mCD8::GFP* 杂交得到。

2. *pdf-Gal4* (Bloomington Stock Center, BL-6900, 此株 *pdf-GAL4* 位于 2 号染色体)

3. *UAS-mCD8::GFP* (Bloomington Stock Center, BL-5130, 此株 *UAS-mCD8::GFP* 位于 3 号染色体)

二、体外离体解剖

1. 1× PBS (Sangon Biotech, catalog number: E607008)

2. 木瓜蛋白酶悬浮液 (Diamond, catalog number: A003124)

3. L-半胱氨酸 (BBI Life Science, catalog number: CB0132)

三、电生理试剂

1. 氯化钠 (NaCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: 746398)
2. 氯化钾 (KCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: P4504)
3. 二水氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sangon Biotech, catalog number: C0556)
4. 六水氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sangon Biotech, catalog number: C0288)
5. TES (Sigma-Aldrich, catalog number: T1375)
6. 葡萄糖 (Glucose) (Sigma-Aldrich, catalog number: G8270)
7. 海藻糖 (Trehalose) (BBI Life Science, catalog number: TB0919)
8. 蔗糖 (Sucrose) (Sigma-Aldrich, catalog number: S1888)
9. 碳酸氢钠 (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761)
10. 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4) (Sangon Biotech, catalog number: S0571)
11. HEPES (Sigma-Aldrich, catalog number: H3375)
12. 葡萄糖酸钾 (K-gluconate) (Sigma-Aldrich, catalog number: G4500)
13. EGTA (Sangon Biotech, catalog number: E0732)
14. Mg-ATP (Sigma-Aldrich, catalog number: A9187)
15. Na_3GTP (Sigma-Aldrich, catalog number: G8877)
16. 组织消化液 (见溶液配方)
17. 细胞外液与电极内液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 水平拉制仪 (Sutter Instrument, model: P-97)
2. 玻璃毛细管 (Sutter Instrument, model: BF120-69-15)
3. 光照培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂)
4. 显微解剖台 (尼康)
5. 生物专用直头镊子 (中镜科仪, model: EP525)
6. 直立显微镜 (Olympus, model: X51)
7. 微操纵器 (Sutter Instrument, model: SD-MX760)
8. 放大器 (Molecular Devices, model: Axopatch200B)
9. 数字化仪 (Molecular Devices, model: Digidata 1320A)
10. 空气台和法拉第笼 (Sutter Instrument, model: AT-3036)

11. 蠕动泵系统 (Cole-Parmer, catalog number: EW-77910-20)
12. 记录槽
13. 铂金丝网
14. 汞灯

软件

1. pClamp 软件套件 (最低版本 8.2): Minianalysis program (Synaptosoft) 软件

实验步骤

1. 果蝇预处理

挑选 2~3 日龄的雌性果蝇，将其放置于 12 小时光照/12 小时黑暗的培养箱中饲养两天，再转入持续黑暗的培养箱中饲养两天，在 CT2-CT4 (CT0 代表开灯时刻，CT2-4 相当于开灯 2 h~4 h 之间)时取果蝇进行实验。

2. 微电极的制备

将玻璃毛细管放置在 P-97 水平拉制仪上采用四步法将其拉成记录用的微电极。本实验旨在记录 I-LNvs 神经元的电活动，由于其胞体直径只有 5~8 μm ，所以电极尖端必须严格控制在 2.5 μm 以下，灌注电极内液后电极阻抗为 3.5~4 M Ω 。

3. 细胞外液预处理

实验前预先向细胞外液充入 95% O₂/5% CO₂ 的混合气体，并循环灌流。

4. 组织解剖

将果蝇放入大脑解剖溶液中，在显微镜下用镊子使果蝇头部和身体分离，保留头部，小心去除头部的表皮并保持其眼睛和大脑的完整性，此步骤需要在 3 分钟内完成 (视频链接：

http://video.tudou.com/v/XMjlyOTM5Mjl1Ng==.html?_fr=oldtd)。

5. 组织消化

将果蝇大脑迅速转移到细胞消化液中，37 °C 水浴处理 8 min，充分暴露 PDF⁺细胞，消化充分的 PDF⁺细胞一般胞体饱满均匀，边界清楚。

6. 组织转移与固定

将消化处理后的组织转移到记录槽中，正面朝上，用铂金丝网压在大脑中央，置于 Olympus X51 显微镜视野正中 (图 1A 和 1B)。

7. 定位目标 I-LNV 细胞 (图 1)

打开汞灯，在 40 倍物镜下，寻找绿色荧光蛋白标记的 PDF⁺细胞。(PDF⁺细胞是一组位于果蝇头部腹外侧的神经核团 (LNVs)，包含 8 个 Large-LNVs 和 8 个 small-LNVs 细胞，Large-LNVs 体积比 small-LNVs 大)

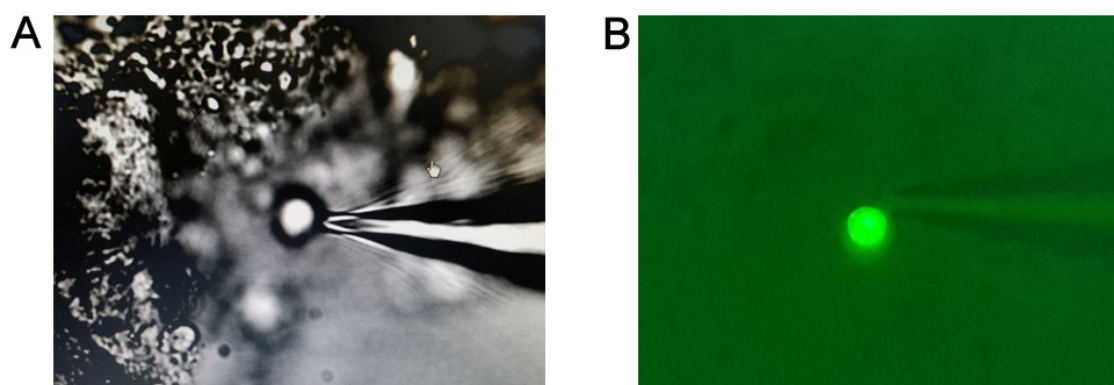


图 1. 显微镜视野下 1-LNVs 神经元胞体. A. 光学显微镜下 1-LNVs 神经元胞体，目镜 40×，荧光显微镜下 1-LNVs 神经元胞体，目镜 40×。

8. 全细胞记录

在电压钳模式下用 SD-MX760 微操纵器控制充有电极内液的玻璃微电极靠近细胞，待电极尖端进入外液前，轻轻将注射器向前推 1/10 的体积在电极内给一个正压，正压大小约为神经元 1/5，最终尖端电阻为 9~10 Ω 。待电极靠近 Large-LNVs 细胞后 (表现为胞体附近组织明显被电极吹开，还能观察到电极阻抗上升现象)，释放掉正压并顺势用嘴给一个负压，同时 holding 电压调节到 -50 mV 形成高阻封接 (> 1 G Ω)。再慢慢将钳电压调到 -70 mV。待封接稳定形成之后，给予大而短促的负压可以使电极尖端下的局部细胞膜破裂，从而形成全细胞记录模式 (Whole-cell recording)。

9. 对 Large-LNVs 记录模式采用电流钳式，即神经元自发放电在电流为零 ($I = 0$) 时的放电频率，记录细胞在这一过程中的自发放电情况。

10. 实验结果通过 Minianalysis program (Synaptosoft) 软件分析。

失败经验

1. 若组织解剖时间过久，会出现细胞状态变差，在显微镜下可以观察到清晰的细胞核结构，细胞不够饱满，此时不能够记录到动作电位。
2. 若组织消化时间不够或过久都会导致实验失败，当组织消化不够充分时，目标细胞不能完全暴露出来，一方面周围的胶质细胞会阻止电极尖端到达目标细胞，另一方面即使能够接触到目标细胞但是也不能够将目标细胞吸破，导致记录不到细胞内的电位变化。若组织消化时间过久，会导致细胞状态变差，此时记录到细胞的静息电位为正。因此，对于木瓜蛋白酶的浓度及组织消化时间都要提前试好条件。
3. 细胞外液要现用现配，不易放置过久时间。

溶液配方

1. 组织消化液

50 U/ml 木瓜蛋白酶、1 mM L-半胱氨酸，溶于 1× PBS 溶液中

注：溶液需要现配，配制完成后 37 °C 活化 10 min 后放置于冰上待用

2. 细胞外液与电极内液

细胞外液		电极内液 (pH = 7.3, 渗透压 265 mOsm)	
所需试剂	浓度 (mM)	所需试剂	浓度 (mM)
NaCl	103	K-gluconate	160
KCl	3	EGTA	1
TES	5	HEPES	10
Trehalose	10	Mg-ATP	4
Glucose	10	Na ₃ GTP	0.5
Sucrose	7		
NaHCO ₃	26		
NaH ₂ PO ₄	1		
CaCl ₂	1.5		
MgCl ₂	4		

注：细胞外液需实验当天配制，电极内液可配好后分装成 0.5~1 ml/管，放置于 -20 °C 保存待用。

致谢

感谢东南大学生命科学研究院刘安博士提供电生理技术支持。感谢国家自然科学基金项目 (31471031) 的支持。

参考文献

1. Li, Y., Zhou, Z., Zhang, X., Tong, H., Li, P., Zhang, Z. C., Jia, Z., Xie, W. and Han, J. (2013). [Drosophila neuroligin 4 regulates sleep through modulating GABA transmission](#). *J Neurosci* 33(39): 15545-15554.
2. Li, Q., Li, Y., Wang, X., Qi, J., Jin, X., Tong, H., Zhou, Z., Zhang, Z. C. and Han, J. (2017). [Fbxl4 serves as a clock output molecule that regulates sleep through promotion of rhythmic degradation of the GABAA receptor](#). *Curr Biol* 27(23): 3616-3625 e3615.
3. Roemmich, A. J., Schutte, S. S. and O'Dowd, D. K. (2018). [Ex vivo whole-cell recordings in adult Drosophila brain](#). *Bio-protocol* 8(14): e2467.