果蝇雄性求偶与雌性接受行为的高通量检测方法

A High-throughout Method for Assaying Male Courtship and Female Receptivity in *Drosophila*

孙梦实, 郭超, 潘玉峰*

发育与疾病相关教育部重点实验室, 生命科学研究院, 东南大学, 南京, 江苏

*通讯作者邮箱: pany@seu.edu.cn

引用格式: 孙梦实, 郭超, 潘玉峰. (2019). 果蝇雄性求偶与雌性接受行为的高通量检测方法. *Bio-101* e1010287. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010287.

How to cite: Sun, M. S., Guo, C. and Pan, Y. F. (2019). A high-throughout method for assaying male courtship and female receptivity in *Drosophila*. *Bio-101* e1010262. Doi: 10.21769/BioProtoc.10101262. (in Chinese)

摘要: 本能行为如何受基因调控是生命科学领域的一个重要问题。雄性果蝇的求偶行为和雌性果蝇的接受行为是两种重要的本能行为模型, 其分子与神经环路机制已有深入研究, 促进了我们对于本能行为的分子与神经机制的理解。本实验利用果蝇求偶行为检测板和录像设备, 批量记录果蝇在一定时间内的求偶和接受行为, 从而实现对果蝇求偶行为和接受行为的高通量检测与定量分析。

关键词: 黑腹果蝇, 求偶行为, 接受行为, 雌雄差异

材料与试剂

1. 果蝇小号饲养管 (2.5 cm × 9.5 cm 透明聚苯乙烯塑料管, 海门市科佳实验器材)
2. 果蝇大号饲养瓶 (2.5 cm × 10 cm 玻璃瓶, 海门市科佳实验器材)
3. 果蝇吸取管 (简易自制, 材料包括: 透明塑料软管, 蓝色枪头, 纱布, 成品见图 1)
4. 高透明塑料薄膜 (高透明 PET 片材, 淘宝店铺: 景兴塑胶材料制品)
5. 毛刷
6. 便利贴或纸条
7. 野生型果蝇
8. 冰

图 1. 果蝇吸取管。 由软管，纱布，蓝色枪头组成。黑色箭头所示处用于接触果蝇，另一端接触口腔，且每次使用前，需换上新枪头。

仪器设备

1. 光照培养箱 (赛福智能人工气候箱, model: PRX-1000A)
2. 果蝇求偶行为检测板:
聚甲基丙烯酸甲酯材质，一套求偶行为检测板由 2 个盖板 (见图 2)，2 个求偶孔板 (见图 3) 和高透明塑料薄膜组成。
3. 果蝇装载板 (用于吸取法装载果蝇，见图 4)
4. 高清数码摄像机 (索尼，FDR-AX45 4K)
5. 128G SD 存储卡 (SanDisk 闪迪，SDSDXXG-128G-ZN4IN)
6. 相机翻拍架 (起鹤牌，QH-C082)

图 2. 盖板. 规格: 195×115 ; 长 195 mm, 宽 115 mm, 厚 5 mm

图 3. 求偶孔板. A. 概念图. B. 实物图. 规格: 孔呈 8×6 分布, 孔径 $\varnothing 10$ mm,

孔间距 5 mm; 尺寸 196 × 115 mm; 长 195 mm, 边距 40 mm; 宽 115 mm, 边距 15 mm; 厚 3 mm

图 4. 果蝇装载板. A. 概念图 B. 实物图. 规格: 底板 200 × 160 mm; 长 200 mm, 宽 160 mm, 厚 3 mm

软件

1. LifeSongX (<http://lifesong.bio.brandeis.edu/>)
2. (可选) FlyTracker (<http://www.vision.caltech.edu/Tools/FlyTracker/index.html>)
3. (可选) JAABA (<http://jaaba.sourceforge.net>)
4. (可选) MateBook (<https://github.com/Dicksonlab/MateBook>)

实验步骤

准备工作: 1) 高透明塑料薄膜, 用于隔离雌雄果蝇, 购买回来后需要自己裁剪, 要求是可以遮盖求偶孔板上所有孔。2) 求偶行为检测板制作购买回来后需要过水清洗, 散味。使用过后的行为学检测板需要用酒精清洗干净, 以去除上一次实验中果蝇残留的气味。3) 可在实验培养箱内部安装电源插座, 为相机供电; 且相机及相机翻拍架需提前组装、调试。

1. 果蝇饲养

一般挑选 10~20 对雌雄果蝇进行杂交, 并饲养于大号饲养瓶, 约每 2 天换一次果蝇瓶, 使果蝇卵的数目适中。一般饲养于 25 °C 或者 22 °C, 特殊情况下可以饲养在其他温度下。饲养条件采用 12 h 光照:12 h 黑暗。

2. 准备待测果蝇

挑选处女雌蝇和未交配的雄蝇, 每 10~15 只装一小号饲养管至 4~6 日龄时进行行为实验。如检测雄性果蝇求偶行为, 则挑选野生型雌蝇进行实验; 如检测雌性果蝇接受行为, 则挑选野生型雄蝇进行实验。如要排除后天环境对求偶行为的影响, 则在挑处女雄蝇时即单只饲养于小管中直至行为实验。针对雄蝇的求偶行为, 一般检测 20 只以上; 针对雌蝇的接受行为, 一般检测 100 只左右。

3. 装配果蝇

3.1 冰冻法

- 1) 预先准备一盒冰, 并把干净的空玻璃管放置于冰中预冷, 同时准备一套或多套求偶行为检测板以及毛刷。
- 2) 以先装载雄蝇为例, 将雄蝇倒入空管中, 放于冰上麻醉约 1 分钟。期间整理行为学板, 由上至下分别为两个孔板和一个底板, 两个孔板之间的边缘插入塑料薄膜, 但暂且不分隔两层求偶孔。待果蝇被麻醉后, 用毛刷轻柔将其装入行为学板第一层, 一孔一只, 且同时平移塑料薄膜将两层求偶孔分隔开。
- 3) 用同样的办法把另一性别的果蝇装配于第二层求偶孔中, 并加上顶板, 此时由下至上形成底层盖板-孔板-塑料薄膜-孔板-顶层盖板的求偶装置 (图 5)。
- 4) 在便利贴或纸条上写上基因型、日期等信息后置于顶层盖板上方。

图 5. 果蝇求偶视频截图。左右两边分别为实验组和对照组，且实验组果蝇求偶强度与对照组并无显著差异。

3.2 吸管吸取法

- 1) 预先准备一套果蝇吸尿管，干净的空果蝇饲养管，一套求偶行为检测板和装载板。
- 2) 以先装载雄蝇为例，将雄蝇倒入干净的空果蝇管中，用吸管吸取一只或多只果蝇，再通过装载板上的小孔，将果蝇轻轻吹入孔板中，一孔一只。移动装载板直至第一层果蝇全部装载完毕，并在第一层上插入塑料薄膜，并放置第二层求偶孔板，采用同样的吸管吸取法装配另一性别的果蝇，并在装载结束后用逐步平移的方法将装载板换成顶层盖板，最终同样形成底层盖板–孔板–塑料薄膜–孔板–顶层盖板的求偶装置。
- 3) 在便利贴或纸条上写上基因型、日期等信息后置于顶层盖板上方。
4. 将求偶行为板放入 25 °C (或其他温度)、湿度约 60%、适当光照强度的培养箱，适应约 1 小时。若使用表达温度敏感蛋白 (如 dTrpA1) 的果蝇进行实验，则在适应这一步时，先在不激活的温度 (例如 22 °C) 适应 30 min，再于激活的温度 (例如 27 °C) 适应 30 min 以到达激活效果再进行行为检测。
5. 适应结束后开始录像。按下录制键，拿走求偶行为板上写有实验信息的纸条，抽去塑料薄膜让雌雄果蝇开始接触。
6. 实用技巧
 - 6.1 在装载过程中，装载板和孔板之间不要产生任何空隙，否则果蝇会寻着缝隙钻出。

- 6.2 塑料薄膜不仅可以分隔待测雌雄果蝇，还可以用于遮挡装了果蝇的孔，防止在移动装载板时果蝇逃走。
- 6.3 抽膜时手不要挡到相机镜头以防止变焦，且若不小心夹到果蝇翅膀，回推一下膜即可。整个过程尽量不干扰果蝇。
- 6.4 推荐每个求偶行为板分为左右两部分，分别装配实验组和对照组果蝇，同时进行实验，减少实验误差。
- 6.5 视频通常录制 30 min 即可，若关注雄蝇的求偶行为，分析前 10 min 的求偶指数；若关注雌蝇的接受行为，则分析 30 min 内的接受度。

结果与分析

1. 求偶行为分析

以塑料薄膜被抽掉的时间作为 0 点（即雌雄果蝇可以开始接触的起点），统计之后 10 min 中之内的雄果蝇求偶行为。求偶行为包括定位 (orientation), 追逐 (following), 伸展翅膀唱求偶歌 (wing extension), 舔对方尾部 (Licking), 弯曲腹部试图交尾 (attempted copulation) 和成功交尾 (copulation) 这几个步骤。统计求偶行为时通常包括了以上所有步骤 (Licking 行为不易定量，一般可忽略)。常用的求偶统计参数包括：

- (1) 求偶指数，即 $\text{Courtship index (\%)} = \text{Time spent on courtship} / \text{total time} * 100\%$;
- (2) 扇翅指数，即 $\text{Wing extension index (\%)} = \text{Time spent on wing extension} / \text{total time} * 100\%$;
- (3) 求偶起始时间，即 Courtship latency，是从 0 点到果蝇开始求偶的时间；
- (4) 成功交配指数，指特定时间内（比如 10 min 或 30 min）成功交配的百分比。以上参数中，求偶指数应用最多（图 6）。

可用于求偶行为分析的免费软件至少包括以下四种：(1) LifeSongX；(2) FlyTracker；(3) JAABA；(4) MateBook。

本实验室主要用 LifeSongX，操作相对简单，但需要手动分析，较耗时间。

图 6. 野生型 (Canton-S) 雄蝇在有光照条件下对正常雌蝇的求偶和在黑暗条件下对无头雌蝇的求偶指数 (n = 24). 无头果蝇制备方法: 用刀片在显微镜下切断果蝇头部和身体连接的组织, 后用普通镊子夹住果蝇翅膀将其放入求偶板中。录制黑暗状态下的求偶需要用到红外光源和能感知红外线的相机。

2. 接受行为分析

以塑料薄膜被抽掉的时间作为 0 点, 统计之后 30 min 中之内的雌果蝇接受行为。一般每 5 min 统计一次雌蝇接受雄蝇并成功交配的百分比 (Percentage copulated = Number of copulated flies/total files * 100%), 并以曲线的形式作图 (图 7)。

图 7. 野生型 (Canton-S) 雌蝇的接受行为. 处女雌蝇在 30 分钟内逐步接受雄蝇求偶, 与其交配 (n = 144); 已交配后的雌蝇不接受雄蝇求偶 (n = 48)。获取已交配雌蝇的方法: 将 20 只 4 至 6 日龄的处女雌蝇和 20 只雄蝇装于小果蝇管共同饲养一天即可。

致谢

本课题得到国家自然科学基金青年项目 (6531000063) 以及江苏省杰出青年基金 (BK20160025) 的资助。