Nano-injection 注射方法构建 DCV 果蝇感染模型

Using Nano-injection to Prepare Models of DCV Infected *Drosophila*

赵娅娅^{1,2,#}, 俞珺璟^{3,#}, 潘磊^{1,2,*}

¹中国科学院上海巴斯德研究所-广州市妇女儿童医疗中心感染与免疫联合研究中心, 广州; ²中国科学院上海巴斯德研究所, 上海; ³中国科学院生化与细胞研究所, 上海

*通讯作者邮箱: panlei@ips.ac.cn

#共同第一作者

引用格式: 赵娅娅, 俞珺璟, 潘磊. (2019). Nano-injection 注射方法构建 DCV 果蝇感染模型. *Bio-101* e1010288. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010288.

How to cite: Zhao, Y. Y., Yu, J. J. and Pan, L. (2019). Using nano-injection to prepare models of DCV infected *Drosophila*. *Bio-101* e1010288. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010288. (in Chinese)

摘要: 病毒是引发重大流行性传染病的源头之一。因此, 深入解析病毒与宿主的相互作用, 对于了解病毒的致病机理, 进而寻找最优抗病毒方案具有重要的理论意义和实际应用价值。黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 源于其同高等动物高度保守的天然免疫信号通路和其他模式生物无法比拟的遗传操作优势, 已经被广泛应用于病原体和宿主的互作研究之中。特别是, 对于虫媒传播的 RNA 病毒, 果蝇已被证明是理想的宿主模式动物, 发现了大量的保守的抗病毒天然免疫机制。本文将以 DCV 病毒为范例, 详细描述如何通过定量显微注射的方法构建果蝇的病毒感染模型, 并介绍评价该模型体系的经典指标和必须加以考虑的注意事项。

关键词: 果蝇, DCV, *Wolbachia*, Nano-injection

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管 (Safe-Lock Tubes) (Eppendorf, catalog number: 0030120086)
2. 1 ml 注射器
3. KIMTECH 纸
4. 细胞培养皿
5. 0.5 mm 无菌陶瓷研磨珠
6. 硼硅酸盐玻璃管 (3.5" Drummond #3-000-203-G/X 100 Replacement Tubes)

7. 96 孔板
8. 果蝇培养管
9. 野生型雄性雌性果蝇成虫
10. Schneider 果蝇培养基
11. 玉米粉
12. 酵母粉
13. 琼脂糖
14. 氯化钙
15. 蔗糖
16. 葡萄糖
17. 山梨酸钾
18. $C_8H_8O_3$
19. 10 mM Tris-HCl 缓冲液, pH 7.2
20. EDTA
21. SDS
22. 异丙醇 (Sigma, catalog number: I9516)
23. 70%酒精
24. 醋酸钾溶液
25. 无菌 ddH₂O
26. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410-500ML)
27. PCR 试剂盒 (TAKARA, catalog number: R011)
28. 10% FBS
29. 四环素 (Sigma, catalog number: 87128)
30. 四环素溶液 (见溶液配方)
31. 正常果蝇食物 (见溶液配方)
32. 溶液 A (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊子

2. PCR 仪 (ABI 2720 Thermal Cycler)
3. LEICA S6 体视显微镜
4. -80 °C 冰箱
5. 水浴锅
6. 昆虫细胞培养箱
7. 离心机 (Eppendorf, model: 5424R)
8. 研磨机器 (Minilys personal homogenizer - Bertin Instruments)
9. 激光微电极拉制仪 (Sutter P-2000)
10. NANOJECT II (Drummond Scientific Company)

实验步骤

一、DCV 病毒的制备

果蝇 C 病毒 (DCV) 是一种单链正向无包膜的 RNA 病毒，类似于脊椎动物小 RNA 病毒，是模式生物果蝇中普遍存在的一种病毒 (Yang 等, 2018)。果蝇 S2* 细胞用于 DCV 增殖和滴定。S2* (S2 Star cell) 细胞系是从晚期果蝇胚胎的原代培养物中获得的 (Schneider, 1972)。该细胞系可在无 CO₂ 的室温条件下生长，在 Schneider 果蝇培养基中以单层半贴壁细胞或悬浮细胞的形式存在。健康细胞应大小均匀，呈圆形。

1. 感染前一天，用无抗生素的 Schneider 果蝇培养基 + 10% FBS 将 S2* 细胞铺板于 d = 10 cm 细胞培养皿，密度为 1×10^7 cells/ml。

将 S2* 细胞 (1×10^5 个/ml) 铺板于 96 孔板。在每孔加入细胞悬液 100 μ l。

- 1.1 用 S2* 细胞完全培养基将 DCV 病毒作连续 10 倍稀释 (10^{-1} ~ 10^{-10})。将稀释好的病毒接种到 96 孔板中，每一稀释度接种一纵排，共 8 孔，每孔接种 50 μ l (如图 1 所示)。

注：果蝇 DCV 病毒产率通常在 10^8 ~ 10^9 PFU/ml 左右，稀释至少要覆盖在 10^{-5} ~ 10^{-10} 范围内。

- 1.2 设正常细胞作为阴性对照 (100 μ l 细胞悬液 + 50 μ l S2* 细胞完全培养基)。
- 1.3 每天在显微镜下用 20 $\times$ 或 40 $\times$ 目镜的亮视野观察细胞状态，并记录每孔是否出现 CPE。一般在第 4 d 会观察到 CPE 现象。将细胞外观模糊、培养基中出现碎片的孔，称为“阳性孔”，将细胞形态正常的孔，称为“阴性孔”。CPE 阳性或阴

性孔，分别用+或-标记 (如图 1 所示)。用 Reed-Muench 方法计算病毒 TCID₅₀ (Reed 和 Muench, 1938)。

注：病毒相关实验所用的材料和手套均应放入指定废液缸中处理。

- 1.4 如果病毒不能达到所需的 TCID₅₀ (视实验目的不同，可采用 $10^2 \sim 10^6$ TCID₅₀ 单位的剂量进行病毒感染。通常，我们使用 TCID₅₀ 为 3×10^6)，解决方案如下：将 100 ml 病毒 $68,000 \times g$, 4 °C 离心 1 h。弃上清液，用 1 ml Tris-HCl 缓冲液 (10 mM, pH 7.2) 将其重悬。20 μ l/管分装后存储在 -80 °C。随机抽取 5 管，再次测定 TCID₅₀ 病毒的平均水平。

图 1. CPE 观察法评估病毒感染能力。 用 S2*细胞完全培养基将 DCV 病毒作连续 10 倍稀释 (10⁻¹-10⁻¹⁰)。将稀释好的病毒接种到铺有 S2*细胞的 96 孔板中，每一稀释度接种一纵排，共 8 孔。每孔接种 50 μ l。设正常细胞作为阴性对照 w/o (100 μ l 细胞悬液 + 50 μ l S2*细胞完全培养基)。一般 4d 出现 CPE。将细胞外

观模糊、培养基中出现碎片的孔，称为“阳性孔”，将细胞形态正常的孔，称为“阴性孔”。CPE 阳性或阴性孔，分别用+或-标记。

2. 感染当天将从-80 °C 取出的 DCV 病毒置于 25 °C 水浴锅迅速融化。直接在步骤 1.1 准备好的含有 S2*细胞的 10 ml 完全培养基中加入 1 ml 的 DCV 病毒溶液，MOI = 0.01。
3. 将细胞置于 25 °C 昆虫细胞培养箱中培养。感染 3~5 d 后，当细胞形态异常 (细胞形状模糊不清) 且培养基中充满黑色颗粒的细胞碎片时，准备收集病毒。
4. 将收集的含有 DCV 病毒的培养基置于-80 °C 快速冷冻。随后将其取出，迅速置于 25 °C 水浴锅中快速融化。
5. 6,000 × g, 4 °C 离心 15 分钟。
6. 将上清液收集在无菌的 15 ml 离心管中，旋涡震荡，以 200 µl/管将 DCV 病毒分装于无菌的 1.5 ml 离心管中。

注：病毒在 4 °C 可存放 3~5 d，在-80 °C 可存放一年。应避免反复冻融循环使用。

7. 随机选取 5 个含 DCV 病毒的离心管，用于病毒滴度测定。

病毒在细胞内增殖，引起细胞产生形态上病变，表现为细胞皱缩、变圆、出现空泡、融合、死亡和脱落的现象称为细胞病变效应 (cytopathic effect; CPE) (Cotarelo 等, 1999)。对于 DCV 滴度的计算，采用 CPE 的方法。S2 细胞按每孔 1×10^4 个细胞铺在 96 孔板中，随后加入梯度稀释的 DCV 病毒液，在 25 °C 培养，第 4 d 观察 CPE 表型，并计算病毒滴度。

二、Wolbachia-free 果蝇的制备

Wolbachia 是一种通过母体传播的 α -变形细菌。它可以感染大约 40% 的节肢动物。它也是实验室果蝇中常见的共生菌，它可以通过胞质不相容性影响宿主的生殖 (Teixeira 等, 2008; Bhattacharya 等, 2017; Chrostek 等, 2013; Ferguson 等, 2015; Hedges 等, 2008)。目前，有文献报道，*Wolbachia* 对果蝇有抗病毒感染的作用 (Merkling 等, 2015)。因此，在以果蝇为模型，研究 RNA 病毒感染机制时，需要去除 *Wolbachia* 的影响，从而创造一个更单一和纯粹的背景，有利于病毒感染机制的研究 (Yang 等, 2018)。

1. 含四环素果蝇食物的制备

每 4 g 新鲜果蝇食物中加入 400 μ l 浓度为 50 μ g/ml 的四环素溶液，充分混匀，并将食物在 4 °C 放置过夜。

注：因四环素是用 70% 酒精配制，高浓度的酒精会影响果蝇的生育，因此食物配置后在 4 °C 放置过夜将起到有效挥发酒精的作用。

2. 第二天，将含有四环素的果蝇食物提前预热到室温。按 20 个雌性，10 个雄性果蝇每管传到预热后的果蝇食物管中，按照正常的饲养条件进行培养，每 3~4 天传管一次。

注：每一管食物中不能含有太多的卵，不然将降低四环素的效率。

3. 收集从四环素食物中新生长成的果蝇成虫 (3~5 天之内)。并将这些成虫按照 1~2 的步骤在四环素食物中继续饲养，重复至少 3 代。基本上 3 代后，所生长出的果蝇将不含有 *Wolbachia*。

4. *Wolbachia* 的鉴定

经过三代四环素处理后的果蝇成虫，随机收集 5 只果蝇进行 *Wolbachia* 的鉴定。

5. 在 1.5 ml 离心管中，装入 5 只雄果蝇。加入 250 μ l 无菌 ddH₂O 以及 0.5 mm 的无菌陶瓷研磨珠，用研磨机器 high speed 研磨 1 分钟。加入 250 μ l 2 $\times$ 溶液 A 并震荡混匀。

注：因溶液 A 中含有 SDS，如果直接加入溶液 A 进行研磨，会产生大量的泡沫，从而影响研磨效果。如果为红眼果蝇，在研磨前去除头部，红眼色素会影响 DNA 产物的颜色。

6. 加入 190 μ l 5M 醋酸钾溶液，震荡混匀，冰浴 15 分钟。
7. 室温离心 13,000 $\times g$ ，5 分钟，收集上清并转移至新的 1.5 ml 离心管。
8. 重复步骤 2~7。
9. 加入 750 μ l 异丙醇，轻柔地上下颠倒几次，室温孵育 5 分钟。
10. 室温离心 13,000 $\times g$ ，5 分钟，去除上清，底部白色沉淀为基因组 DNA。
11. 加入 1 ml 70% 酒精，上下颠倒几次，清洗基因组 DNA，室温离心 13,000 $\times g$ ，5 分钟，去除上清。
12. 风干直至基因组 DNA 呈透明状。
13. 用 100 μ l 无菌 ddH₂O 重悬 DNA，并检测浓度，将 DNA 浓度稀释至 100 ng/ μ l。
14. 取 200 ng DNA 作为模板，用 *Wolbachia* 特异性引物进行 PCR 鉴定。PCR 程序：

第一步：95 °C，15 min；第二步：95 °C，45 s；第三步：50 °C，45 s；第四步：72 °C，1 min；第二至第四步循环 36 次；第五步：72 °C,延伸 10 min。

15. 用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 *Wolbachia* 16S rRNA (200 bp) 以及 wsp (600 bp) 特异性条带。引物信息如下：

引物	序列
<i>Wolbachia</i> 16S rRNA	
Forward	5'TGAGGAAGATAATGACGG 3'
Reverse	5'CCTCTATCCTCTTTCAACC 3'
<i>Wsp</i>	
Forward	5'CATTGGTGTGTTGGTGTGTTGGTG 3'
Reverse	5'ACCGAAATAACGAGCTCCAG 3'

16. 将去除了 *Wolbachia* 的果蝇在正常果蝇食物上进行保种。*Wolbachia*-free 的果蝇生长发育正常，可长期保种。建议定期检测是否存在二次污染。

三、*Pastrel* 基因分型

果蝇的基因型背景会影响果蝇的抗病毒反应。最显著的是位于果蝇 3 号染色体上的基因 *pastrel* (*pst*) 在 512 位点发生 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 时产生的 R (Resistance) allele 与 S (susceptible) allele 可改变果蝇对 DCV 病毒感染的易感性 (Cao 等, 2017; Magwire 等, 2012)。在构建果蝇 DCV 病毒感染模型时，应调整目标果蝇位于同样的遗传背景之下。例如：可以用梯度 PCR 快速检测 *Pastrel* 基因的分型。

1. 提取果蝇基因组 DNA (步骤二中 5~13)。
2. 以 100 ng DNA 为模板，20 μl 反应体系。引物 512C 与 512T 分别用来检测 R 等位基因与 S 等位基因。PCR 程序：第一步：95 °C，15 min；第二步：95 °C，45 s；第三步：梯度退火温度设定，梯度如下：54 °C，54.7 °C，55.5 °C，58 °C，59.7 °C，62.2 °C，63.7 °C，64 °C，45 s；第四步：72 °C，1 min；第二至第四步循环 30 次；第五步：72 °C,延伸 10 min。
3. 用 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 512C 与 512T (均为 100 bp) 特异性条带。引物信息如下：

Primer	Sequence
<i>pst</i> 512C	
Forward	5'CAGCATGGTGTCCATGAAGTC3'
Reverse	5'ACGTGATCAATGCTGAAAGT3'
<i>pst</i> 512T	
Forward	5'CAGCATGGTGTCCATGAAGTT 3'
Reverse	5'ACGTGATCAATGCTGAAAGT3'

四、果蝇 DCV 感染以及死亡率分析

Nano-injection 注射方法操作简单，定量重复性好，可用于筛选参与病毒-宿主相互作用的宿主/病毒因子，进而深入阐述先天免疫信号通路与其他生物通路在病毒感染反应中的相互作用 (Merkling 等, 2015; Yang 等, 2018)。

1. 拉针：Sutter P-2000 激光微电极拉制仪通过二氧化碳激光对硼硅酸盐玻璃管 (3.5"Drummond #3-000-203-G/X 100 Replacement Tubes) 进行加热，用电动滑臂来固定玻璃管并将其拉伸，操作界面可以进行加热和拉伸相关参数的设定：HEAT: 600 °C; FILAMENT: 3; VELOCITY: 15; DELAY: 200; PULL: 200。

注：拉针的各个参数受温度与湿度的影响较大，需根据实验室的环境优化最佳参数。

2. 开针：在 LEICA S6 体视显微镜 4×目镜下用解剖镊子将毛细管拉制而成的针前端夹断，尖端直径约 0.05 mm 最佳 (如图 2 所示)。

注：开针部分直径不易过大，且在注射过程中避免碰触针尖，以免针尖断裂。

图 2. 开针。用解剖镊子将毛细管拉制而成的针前端夹断。

3. 装针

3.1 清洁仪器注射头：首先，拧下黑色盖帽，取出黑色橡胶圈和白色橡胶圈 (如图 3 所示)。随后用 KIMTECH 纸将残留在上面的矿物油擦干净。

图 3. NANOJECT II 仪器注射头内各部件展示图。从左到右依次为黑色盖帽，起密封左右的黑色橡胶圈 A，有大小孔径的白色橡胶圈 B 与黑色橡胶圈 C。

3.2 取一支 1 ml 注射器，吸取专用矿物油，从注射针后部将矿物油灌入注射针，灌满，无气泡。

3.3 首先将黑色橡胶圈 A 套在注射头的金属活塞上，接着将黑色橡胶圈 B 从灌满矿物油的微针后部套上，孔径大的一侧和针末端平齐，随后将白色橡胶圈 B 孔径大的一侧与黑色橡胶圈 B 紧贴，最后将针插入注射头，拧上盖帽。(如图 4 所示)

图 4. 装针示意图. 黑色橡胶圈 A, 有大小孔径的白色橡胶圈 B 与黑色橡胶圈 C 的依次顺序如图所示。

- 3.4 按住控制器的 **empty** 键, 令注射头的金属活塞进入针内可见区域 1~1.5 cm, 从而将矿物油打出一部分, 用 KIMTECH 纸擦净针尖端的油滴。
- 3.5 将针尖端浸入待注射的液体, 按住 **full** 键吸入注射液, 直到注射头的金属活塞刚刚退回机器注射头内。
4. 挑选注射用的果蝇: 果蝇羽化后, 挑选所需的雄性果蝇 60~100 只置于 fly-pad 上, CO₂ 麻醉后, 开始定量显微注射。
5. 果蝇感染: 调节旋钮使针尖端插入果蝇 **intra-thoracic** (如图 5 所示)。注射时针插入的位点为果蝇胸部 **mesopleura** 与 **pteropleura** 之间。插入的深度约 2 mm。按下 **inject** 键一次 (**njection** 的速度设置为 **slow**), 提示音响起, 直到机器停止振动, 一次注射结束。正确注射后, 可以观察到果蝇的口器伸出。每只果蝇注射 50.6 nl 稀释好的病毒稀释液(100 PFU/fly)。病毒稀释的方法如步骤一中 1.2 所述, 用 PBS 梯度稀释, 全程冰上操作。注射 PBS 的果蝇作为空白对照组。每次独立实验至少注射 3 管 (20 只雄果蝇/管), 做为组内平行对照。严格记录注射时间。

注: 不要在注射过程中断电或切断控制器和注射仪的电线连接, 这会对仪器精密度造成损伤。注意观察注射液的存量, 防止将矿物油注射入果蝇体内。

图 5. Nano-injection 注射方法构建 DCV 果蝇感染模型

6. 注射后，小心地将果蝇收回果蝇管中。在果蝇苏醒之前保持果蝇管水平放置，以免麻醉的果蝇被食物粘死，出现死亡率分析中的假阳性。准确记录果蝇感染时间。
7. 果蝇死亡率分析：当果蝇完全苏醒后，将果蝇管直立放置于 25 °C 培养箱中培养。每日对其观察，并计算死亡率。每天同样时间将果蝇换至含新鲜食物的培养管中，并记录死亡数目。最后使用 Kaplan-Meier survival curves 分析死亡率。

注：由于注射需要时间（如果技术熟练，一般每小时可注射 100 只果蝇），而且 DCV 复制非常快，所以每次注射完 20 只果蝇后，在试管上写下准确的注射时间是非常重要的。其次，要严格设置空白对照。最后，果蝇的性别对实验结果影响较大。通常情况下，本课题组会挑取成年雄性果蝇做实验。因为，与雌性果蝇相比，雄性果蝇受体内产生的激素变化影响较小 (Schwenke 和 Lazzaro, 2017)。因此，用雄性果蝇做实验，实验结果稳定，可重复性高。另外，注射 0.5 h 之内死亡果蝇，一般不计入死亡率的统计，以避免可能是由于注射针穿刺所造成的创伤死亡。

8. 感染后果蝇体内 DCV 病毒 PFU 测定。根据本组已发表数据 (Yang 等, 2018)，DCV 感染果蝇后，*dcv* mRNA 水平表达量与果蝇体内病毒 PFU 呈正相关关系。当病毒感染量为 100 PFU/ml 时，通过 Realtime PCR 检测 DCV 感染后 3 d 与 6 d 果蝇体内 *dcv* mRNA 水平表达量 (表 1)，进而可推算出 DCV 感染后 3 d 与 6 d *Ore⁺* 果蝇体内 PFU。
9. Dcr2/RNAi 与 JAK/STAT 抗病毒天然免疫通路的检测。果蝇的抗病毒天然免疫机制主要包括 RNAi 与 Jak-STAT 通路 (Xu 和 Cherry, 2014) 其激活的报告基因分别为 *vago* 基因与 *vir-1* 基因。当病毒感染量为 100 PFU/ml 时，通过 Realtime PCR

检测 DCV 感染后 0 d, 3 d 与 6 d *Ore*^r 果蝇体内 *vago* 与 *vir-1* mRNA 水平表达量 (表 1)。

表 1. 检测 *rp 49*, *dcv*, *vago* 及 *vir-1* 基因表达水平所用到的引物信息

Primer	Sequence
<i>rp49</i>	
Forward	5' AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG3'
Reverse	5' CACCAGGAACTTCTTGAATCCGG3'
<i>dcv</i>	
Forward	5' TCATCGGTATGCACATTGCT3'
Reverse	5' CGCATAACCATGCTCTTCTG3'
<i>vago</i>	
Forward	5' TGCAACTCTGGGAGGATAGC3'
Reverse	5' AATTGCCCTGCGTCAGTTT3'
<i>virus-induced RNA 1 (vir-1)</i>	
Forward	5' GATCCCAATTTTCCCATCAA3'
Reverse	5' GATTACAGCTGGGTGCACAA3'

结果与分析

1. 滴度测定

图 6. 显微镜下观察 S2*细胞 CPE 状态. S2*细胞按每孔 1×10^5 个的数铺在 96 孔板中, 随后加入梯度稀释的 DCV 病毒液 (图 C), 在 25°C 培养 4 d 后, 在加有 DCV 病毒稀释液的细胞孔中可观察到 CPE 表型 (图 A 中, 如白色箭头所示, 培养基中有大量细胞碎片); 没有加入 DCV 病毒液的细胞孔中细胞状态正常 (图 B)。对于 DCV 滴度的计算, 采用 CPE 的方法。用 Reed-Muench 方法计算病毒 TCID_{50} , 计算得病毒滴度: $1 \text{ Unit } \text{TCID}_{50} = 4.29 \times 10^9 (3 \times 10^9 \text{ PFU/ml})$ 。

2. *Wol-free* 检测

图 7. 经三代四环素处理可获得 *Wolbachia-free* 果蝇. 果蝇体内存留的 *Wolbachia* 会导致果蝇对 DCV 不易感. G1, G2 与 G3 分别代表 *Ore^r* flies (Bloomington 5) 被四环素处理 1 代, 2 代与 3 代后的果蝇. 经过三代四环素处理的果蝇基因组中均检测不到 *wol*-16s rRNA 与 *wsp* 特异性序列。

3. *Pastrel* 基因分型

图 8. 梯度 PCR 鉴定 *pst* 基因分析. 引物 512C 与 512T 分别用来检测果蝇成虫中 R 等位基因与 S 等位基因。T_m 梯度分别为 1: 54 °C, 2: 54.7 °C, 3: 55.5 °C, 4: 58 °C, 5: 59.7 °C, 6: 62.2 °C, 7: 63.7 °C, 8: 64 °C。

4. 死亡率分析

图 9. DCV 感染后后果蝇的存活率分析. 与野生型 *Ore^r* 果蝇相比, *Ore^r-wol free* 对 DCV 更易感. 圆圈与方框分别代表 *Ore^r* flies 与 *Ore^r-wol free* 被 DCV 感染后 14 d 内的存活率. 图中 error bars 分别表示 standard error (s.e.); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns, not significant.

5. DCV 感染后果蝇体内 PFU 测定

图 10. DCV 感染的 *Ore^r* 果蝇体内 PFU 测定. 病毒感染量为 100 PFU/ml. 通过 Real-time PCR 检测 DCV 感染后 3 d 与 6 d *Ore^r* 果蝇体内 *dcv* 基因 mRNA 水平表达量. 根据本组已发表数据 (Yang 等, 2018), DCV 感染果蝇后, *dcv* 基因 mRNA 水平表达量与果蝇体内病毒 PFU 呈正相关关系 (B), 进而可推算出 DCV 感染后 3 d 与 6 d *Ore^r* 果蝇体内 PFU.

6. Dcr2/RNAi 与 JAK/STAT 抗病毒天然免疫通路的检测

图 11. DCV 感染的 *Ore^r* 果蝇体内 Dcr2/RNAi 与 JAK/STAT 抗病毒天然免疫通路均被激活。病毒感染量为 100 PFU/ml。通过 Real time PCR 检测 DCV 感染后 0 d 与 3 d *Ore^r* 果蝇体内 Dcr2/RNAi 与 JAK/STAT 抗病毒天然免疫通路报告基因 *vago* 与 *vir-1* mRNA 水平表达量。

溶液配方

1. 四环素溶液 (50 µg/ml)
溶于 70% 的酒精中，终浓度为 50 µg/ml
2. 正常果蝇食物
每 1 L 食物含 77.7 g 玉米粉，32.19 g 酵母粉，10.6 g 琼脂糖，0.726 g 氯化钙，31.62 g 蔗糖，63.3 g 葡萄糖，2 g 山梨酸钾，15 ml 5% C₈H₈O₃ (溶于无水乙醇)
3. 溶液 A
0.2 M Tris-HCl, pH 9.0
0.2 M EDTA
2% SDS

致谢

感谢潘磊实验室全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (31870887, 31570897—潘磊)、(31670909—俞珺璟) 和中国科学院青年创新促进会优秀会员 (潘磊) 的支持。本文实验方案改编自本实验室发表的文章 J. Vis. Exp., doi:10.3791/58845 (2018) 和 J Virol 92(18) (2018)。

作者贡献声明：赵娅娅和俞珺璟完成全部实验和图片采集。赵娅娅，俞珺璟和潘磊撰写文章。

参考文献

1. Bhattacharya, T., Newton, I. L. G. and Hardy, R. W. (2017). [Wolbachia elevates host methyltransferase expression to block an RNA virus early during infection.](#) *PLoS Pathog* 13(6): e1006427.
2. Cao, C., Cogni, R., Barbier, V. and Jiggins, F. M. (2017). [Complex Coding and Regulatory Polymorphisms in a Restriction Factor Determine the Susceptibility of *Drosophila* to Viral Infection.](#) *Genetics* 206(4): 2159-2173.
3. Chrostek, E., Marialva, M. S., Esteves, S. S., Weinert, L. A., Martinez, J., Jiggins, F. M. and Teixeira, L. (2013). [Wolbachia variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis.](#) *PLoS Genet* 9(12): e1003896.
4. Cotarelo, M., Catalan, P., Sanchez-Carrillo, C., Menasalvas, A., Cercenado, E., Tenorio, A. and Bouza, E. (1999). [Cytopathic effect inhibition assay for determining the *in-vitro* susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents.](#) *J Antimicrob Chemother* 44(5): 705-708.
5. Ferguson, N. M., Kien, D. T., Clapham, H., Aguas, R., Trung, V. T., Chau, T. N., Popovici, J., Ryan, P. A., O'Neill, S. L., McGraw, E. A., Long, V. T., Dui le, T., Nguyen, H. L., Chau, N. V., Wills, B. and Simmons, C. P. (2015). [Modeling the impact on virus transmission of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*.](#) *Sci Transl Med* 7(279): 279ra237.
6. Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L. and Johnson, K. N. (2008). [Wolbachia and virus protection in insects.](#) *Science* 322(5902): 702.
7. Magwire, M. M., Fabian, D. K., Schweyen, H., Cao, C., Longdon, B., Bayer, F. and Jiggins, F. M. (2012). [Genome-wide association studies reveal a simple genetic basis of resistance to naturally coevolving viruses in *Drosophila melanogaster*.](#) *PLoS Genet* 8(11): e1003057.
8. Merklings, S. H. and van Rij, R. P. (2015). [Analysis of resistance and tolerance to virus infection in *Drosophila*.](#) *Nat Protoc* 10(7): 1084-1097.
9. Reed, L. J. and Muench, H. (1938) [A simple method of estimating fifty percent endpoints.](#) *American Journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, 1 May 1938, Pages 493-497.
10. Schneider, I. (1972). [Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*.](#) *J Embryol Exp Morphol* 27(2): 353-365.

11. Schwenke, R. A. and Lazzaro, B. P. (2017). [Juvenile hormone suppresses resistance to infection in mated female *Drosophila melanogaster*](#). *Curr Biol* 27(4): 596-601.
12. Teixeira, L., Ferreira, A. and Ashburner, M. (2008). [The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*](#). *PLoS Biol* 6(12): e2.
13. Xu, J. and Cherry, S. (2014). [Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*](#). *Dev Comp Immunol* 42(1): 67-84.
14. Yang, S., Yu, J., Fan, Z., Gong, S. T., Tang, H. and Pan, L. (2018). [Bub1 facilitates virus entry through endocytosis in a model of *Drosophila* pathogenesis](#). *J Virol* 92(18).
15. Yang, S., Zhao, Y. Y., Yu, J. J., Fan, Z. Q., Gong, S. T., Tang, H. and Pan, L. (2018). [Establishment of viral infection and analysis of host-virus interaction in *Drosophila melanogaster*](#). *J Vis Exp*. doi:10.3791/58845.