果蝇穿刺感染

Infection of Adult *Drosophila* by Septic Injury

王磊^{1,2}, 潘磊^{1,*}

¹中国科学院上海巴斯德研究所, 上海; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: panlei@ips.ac.cn

引用格式: 王磊, 潘磊. (2019) 果蝇穿刺感染. *Bio-101* e1010294. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010294.

How to cite: Wang, L. and Pan, L. (2018). Infection of adult *Drosophila* by septic injury. *Bio-101* e1010294. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010294. (in Chinese)

摘要: 天然免疫是宿主抵抗病原侵染的第一条防线。解析天然免疫的调控机制对于维持机体的生理健康和了解“宿主-病原”的共进化具有重要的研究意义。果蝇已被广泛证明是研究天然免疫的理想模式动物, 源于其天然免疫体系完备, 信号通路同高等动物高度保守 (Lemaitre 和 Hoffmann, 2007; Vallet-Gely 等, 2008), 且具有其他模式生物无法比拟的遗传操作优势。在这里, 我们详细介绍一种构建果蝇感染模型的经典方式, 即体表穿刺感染模型。穿刺损伤果蝇外骨骼将致病菌直接引入果蝇体腔, 从而引发机体的系统性免疫应答。该模型也可以很好的模拟高等动物所面临的败血症感染。我们将在此介绍感染后生存率, 病原菌增殖, 天然免疫通路应答等评价该模型体系的经典指标。

关键词: 天然免疫, 果蝇, 穿刺感染

材料与试剂

1. 培养管
2. 钨丝
3. 铁制回形针
4. 96 孔板
5. 0.5 mm 瓷珠
6. 果蝇板
7. 培养板

8. 接种杆
9. 酒精灯
10. 羽化一周龄果蝇
11. 致病菌 (表 1)

表 1. 本实验室常用穿刺感染致病菌及浓度

	<i>E. coli</i>	<i>Ecc15*</i>	<i>P. aeruginosa*</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>M. luteus*</i>	<i>L. monocytogenes*</i>
革兰氏属性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性	阳性
培养条件	LB, 37 °C	LB, 29 °C	LB, 37 °C	LB, 37 °C	LB, 29 °C	BHI, 37 °C
使用浓度 (OD ₆₀₀)	200	200	0.001~0.1	0.1~10	200	0.01~200
株系	DH5α	Ecc15	PAO1	SR11	CIP A270	10403S

**Erwinia carotovora carotovora* 15 (*Ecc15*) 来自于 Dr.Won-jae Lee 实验室 (Seoul National University); *Listeria monocytogenes* (10403S) 和 *S. typhimurium* (SR-11) 均来自于刘志华实验室 (Institute of Biophysics, CAS); *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) 来自于韩家淮实验室 (School of Life Sciences, Xiamen University); *Micrococcus luteus* (CIP A270) 来自于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

12. 果蝇食物
13. 培养基 (LB 和 BHI 培养基)
14. 抗菌肽引物
15. 70%商品化医用酒精
16. 无菌二次水 (DDW)
17. CO₂
18. NaCl
19. KCl
20. Na₂HPO₄
21. KH₂PO₄
22. 5 M KOH 水溶液
23. Triton™ X-100

24. TRIzol 试剂 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen™ TRIzol™, catalog number: 15596026)
25. mRNA 反转录试剂盒 (abm, 5× All-In-One RT MasterMix, catalog number: G486)
26. SYBGreen RT-PCR 染料 (abm, 2× qPCR MasterMix, MasterMix-EL 4× 1.25 ml)
27. 1× PBS 磷酸缓冲液 (见溶液配方)
28. 1× PBST (见溶液配方)

仪器设备

1. 显微镜
2. 高压灭菌锅
3. -80 °C 冰箱
4. 4 °C 冰箱
5. 离心机
6. 涡旋仪 (Vortex)
7. 适配 1.5 ml EP 管的研磨震荡仪 (法国 Bertin, Minilys)
8. 简易电解装置
9. 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems ABI 7500 型定量 PCR 仪)
10. 细菌培养箱(北京陆希科技有限公司, model: DHP9502A)
11. 果蝇恒温恒湿培养箱 (宁波江南仪器厂, HWS 智能型; Percival 公司, 果蝇培养箱)

软件

1. GraphPad prism

实验步骤

一、收集和准备实验用果蝇

1. 果蝇饲养在恒温 (依据实验条件), 恒湿 (60%左右) 和 12 小时光照-12 小时黑暗循环的培养箱中 (Greenspan, 2004)。

2. 收集三天内新羽化果蝇，保证年龄接近，每小管食物随机分配 15~25 只果蝇，每两天换一次新鲜食物。再饲养 3 至 4 天，待年龄到一周可进行感染实验。每个品系每次感染，应至少准备 60 只果蝇。

注：

- 1) 注意果蝇饲养环境的洁净、稳定。实验用果蝇要首先排除微孢子虫，*Wolbachia* 细菌以及 DCV, FHV 等病毒的感染，这些病原的存在会极大干扰实验结果。
- 2) 新出生果蝇羽化五天后性成熟，各器官、系统生理过程运行稳定。并且肠道共生菌趋于稳定（肠道共生菌会影响免疫应答）(Neckameyer 和 Argue, 2013; Pais 等, 2018)。一般我们用雄性果蝇进行感染实验，雄性果蝇生理状态在两周内比较稳定。而雌性果蝇由于交配、进食、产卵等行为会显著影响生理状态，相比雄性免疫应答不稳定。

二、培养和准备感染用细菌

1. 感染前一到两天取出 -80 °C 冻存的菌液，划线涂板，在特定温度的培养箱中培养。长有单克隆的培养板可放置于 4 °C 冰箱，可供一周内感染实验使用。
2. 从培养板中挑取单克隆菌落，接种于含 3~5 ml 培养基的培养管中，置于特定温度的培养箱中培养（静置或摇振取决于目的菌培养条件）。菌液生长至 OD₆₀₀ 值介于 0.6~0.8 时停止培养（通常 3 h 培养即可），而后离心浓缩菌体（一般采用转速 6,500 × g (rcf)，离心时间 3 min）。无菌 1× PBS 缓冲液清洗菌体两遍，最后用无菌 1× PBS 稀释菌体到特定的 OD₆₀₀ 值。本实验室常用致病菌种类及穿刺感染浓度见表 1。另外也可参考文献选择其它致病菌及浓度 (Neyen 等, 2014)。

三、感染用穿刺针的制备

1. 建议采用钨丝制备感染针，钨丝耐高温，耐化学腐蚀，硬度较硬，可长期反复使用。用剪刀截取一段长度约 3 cm，直径约 0.5 mm 的钨丝，将钨丝缕直。组装简易电蚀装置制备钨丝针：将一个铁制回形针弯折成一端成半封闭圆环，一端垂直环平面的提勺状工具；电蚀装置的负极电钳夹住回形针竖直一端，正极电钳夹住钨丝针一端；负极末端半环水平浸没在 5 M KOH 水溶液中，接通电源，正极钨丝另一端垂直浸没在铁环液面中间，开始电解；控制钨针端部浸没的深度和电解时

长，每电解 2 s 取出钨丝针在显微镜下观察钨丝尖电解程度，直至获得尖部直径约在 0.2 mm 的钨丝针，每根钨丝针的制备大概需要 2 到 3 分钟 (如图 1A-1D)。电解方法也可参考姚琲等人 (2003)。

图 1. 穿刺用钨丝针的制备. A. 5 M 氢氧化钾电解液，接种杆，用回形针弯折而成的提勺状半圆形电解环。B. 直流电简易电解装置，正极连接截断的钨丝 (约 3 厘米)，负极连接电解环。C. 在 50 毫升离心管盖中完成电解，电解环浸没于电解液中，钨丝上下垂直频繁浸没电解液，期间在显微镜下观察钨丝尖部尺寸是否满足穿刺需求 (尖部直径约 0.22 毫米)，继而停止电解。D. 制备好的钨丝针固定在接种杆，以备穿刺。

四、穿刺感染

1. 提前准备好穿刺用钨丝针，钨丝针固定到接种杆上，用 70% 酒精擦洗钨丝针，酒精挥发后置于酒精灯外焰上灼烧 5 s 至红色，冷却后可重复上述擦洗一灼烧步骤一到两次，保证钨丝针洁净，避免针尖携带的抗原对感染造成影响。
2. 实验用果蝇在通二氧化碳的果蝇板上麻醉，在显微镜下用毛刷摆正果蝇位置，即侧面向上 (如图 2A-2C)。
3. 浓缩后菌液在 Vortex 上充分混匀，针尖蘸取菌液，在果蝇背部前胸旁侧位置穿刺，针尖需在伤口处停留约 2 秒钟。由于果蝇体腔处于负压状态，扎破的伤口处菌液会被自动吸入到血液中。同时对照组果蝇应用洁净的钨丝针蘸取无菌 1× PBS 穿刺。
4. 感染后果蝇分装到新的小管中，每管 15~25 只，每个品系果蝇每次感染至少两管重复，需至少三次重复感染。将果蝇置于特定温度的培养箱中 (多为 29 °C)，用

于记录死亡率，检测菌载量，和检测天然免疫通路的应答，如下游效应因子抗菌肽 (AMP) 的表达。

注：

- 1) 针尖刺破背部外壳即可，不能刺入太深，以免损伤心脏。
- 2) 浓缩的菌液需放置于冰上，应该尽量缩短浓缩菌液和感染所用时间，最好在 1 小时以内。因为时间过久，菌体浓度及活性会出现显著改变。
- 3) 每穿刺一只果蝇，需重新蘸取菌液。每次针尖所蘸取菌液量应相近，即蘸取时间和在菌液中浸没深度保持一致。每感染 3~5 只果蝇后，用洁净纸擦拭针尖，并在酒精灯上灼烧。因为每次穿刺后都有菌液残留在针尖，针尖积累过多菌液会导致被感染果蝇所接受的初始菌含量不一致。同时需重新 vortex 混匀菌液，以免菌液沉降。
- 4) 穿刺的位置会影响果蝇的抗感染能力。前胸背部感染相对好操作，因为胸外壳较硬且脆，易刺破。而腹部感染则需要更精巧的操作，因为腹部较软，极易贯穿，造成体液外流，且易损伤其他器官如肠道，但肌肉层较薄，更容易将病原菌导入体腔 (Chambers 等, 2014)。

五、感染后生存率统计

感染后的果蝇应该每一天/两天转移到新的小管中。对于致死能力比较低的细菌，可每一到两天记录死亡只数。对于致死能力强的细菌，可每小时到半天记录死亡只数。记录到所需天数后，采用 GraphPad prism 画生存率曲线。

注：针刺半小时内死亡的果蝇，不计入生存率统计。有可能是针扎不当，造成的快速死亡。

六、感染后果蝇 RNA 提取、cDNA 反转录及 Q-PCR 检测

1. 在感染后特定时间点，多检测特定的抗菌肽转录水平以评价天然免疫通路应答。对于 IMD 通路，可选择感染后 0 h, 6 h, 12 h, 和 24 小时时间点检测激活水平。对于 Toll 通路，多选择感染后 0 h, 12 h, 24 h, 和 48 h 时间点检测。每次实验每个时间点随机取 5 只果蝇放入 1.5 ml EP 管中，至少两个重复，加入冰上预冷的 200 μ l TRIzol 试剂，外加 3 倍果蝇体积的瓷珠 (0.5 mm)。置于小型研磨仪 (Minilys,

最大转速，1 min) 充分研磨，研磨后再补加 800 μ l TRIzol 至 1 ml，上下颠倒混匀后立刻冻存于-80 $^{\circ}$ C，以备 RNA 提取。

2. 基于 TRIzol 的 RNA 提取方法参考文献 (参考文献 9)，或选择试剂盒提取 RNA。
3. 可选取 2 μ g RNA 作为模板，总体积 20 μ l 体系进行逆转录反应，获得的 cDNA 产物再补加 180 μ l 无菌水进一步稀释，用于模板做后续 RT-PCR 检测。
4. 对于 96 孔板，取 2 μ l cDNA 稀释液作为模板，检测抗菌肽相对转录水平，所使用引物见表 2。

注：一般 IMD 通路报告基因 *Diptericin* 在系统感染革兰氏阴性菌 6 小时后，转录水平达到最高水平。*Toll* 通路的报告基因 *Drosomycin* 则在革兰氏阳性菌系统感染后约 30 h 转录水平到达最高水平。

表 2. 常用抗菌肽 RT-PCR 引物及序列

RT-PCR primer name	sequence
<i>Rp49</i> -Forward	AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG
<i>Rp49</i> -Reverse	CACCAGGAACCTTCTTGAATCCGG
<i>Diptericin</i> -Forward	GGCTTATCCGATGCCCGACG
<i>Diptericin</i> -Reverse	TCTGTAGGTGTAGGTGCTTCCC
<i>AttacinA</i> -Forward	CACAACTGGCGGAACCTTTGG
<i>AttacinA</i> -Reverse	AAACATCCTTCACTCCGGGC
<i>AttacinD</i> -Forward	AAGGGAGTTTATGGAGCGGTC
<i>AttacinD</i> -Reverse	GCTCTGGAAGAGATTGGCTTG
<i>Cecropin</i> -Forward	ATGAACTTCTACAACATCTTCG
<i>Cecropin</i> -Reverse	GGCAGTTGCGGCGACATTGGCG
<i>Defensin</i> -Forward	TGCAGCATAGCCGCCAGAA
<i>Defensin</i> -Reverse	TTGCAGTAGCCGCCTTTGAACC
<i>Drosomycin</i> -Forward	GCAGATCAAGTACTTGTTGCGCC
<i>Drosomycin</i> -Reverse	CTTCGCACCAGCACTTCAGACTGG
<i>Defensin</i> -Forward	TGCAGCATAGCCGCCAGAA
<i>Defensin</i> -Reverse	TTGCAGTAGCCGCCTTTGAACC
<i>Drosocin</i> -Forward	CGCCTAAAGATGTGTGCATAC
<i>Drosocin</i> -Reverse	CTCATTGTGTCACAATTGATTG
<i>Metchnikowin</i> -Forward	GATGCAACTTAATCTTGGAGCG
<i>Metchnikowin</i> -Reverse	TTAATAAATTGGACCCGGTCTTGGTTGG
熔链温度均为 60 $^{\circ}$ C	

七、菌载量涂板检测 (CFUs)

1. 对于每个时间点，随机选取 5 只果蝇放入 1.5 ml EP 管中，冰上放置。加入 1 ml 预冷 70%酒精，Vortex 震荡 10 s，清洗果蝇表面残留的细菌，重复两次，此过程需快速操作，避免酒精对体腔内细菌杀伤。再用 1 ml 无菌水或 1× PBS 清洗两次，每次 Vortex 震荡 10 s，洗去残留的酒精。清洗完毕，尽可能吸除 EP 管中残留的水或 PBS。
2. 每管加入 200 μ l 无菌 1× PBS，加三倍于果蝇体积的瓷珠 (0.5 mm)，充分研磨匀浆。补加 800 μ l 1× PBS 至 1 ml，10 倍梯度稀释，取 100~200 μ l 稀释液涂板。培养板放置于相应温度的培养箱过夜静置，第二天计数克隆数。在合适稀释倍数下，10 cm 平板上生长的克隆，其数目应在 300~800 之间。

注：

- 1) 避免研磨时间过久，研磨产热可能会失活细菌。
- 2) 新制备的固体培养板，水分较多，可取 100 μ l 涂板。过夜放置的培养板水分减少，可取 200 μ l 涂板。对于细胞外扩增细菌，研磨缓冲液用 1× PBS 即可。对于细胞内扩增细菌，如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和李斯特单胞菌 (*Listeria monocytogenes*)，需在 PBS 中添加 0.1% Triton™ X-100 (PBST) 以便更好的破裂细胞，释放胞内扩增的细菌。每个样品，应至少涂布两个不同浓度梯度的平板，统计平均数。
- 3) CFUs 归一到每只果蝇，采用对数或绝对值的科学记数法作为纵坐标画图，表示感染后特定时间点每只果蝇菌载量。

结果与分析

一、生存率 (survival rate) 曲线绘制

利用公式： $[100 \times (\text{总感染果蝇只数} - \text{各时间点累积死亡只数}) / \text{总感染果蝇只数}] \% = \text{生存率} (\%)$ ，计算每个时间点生存率百分比，采用 Graphpad 软件绘制生存率曲线。对于每组数据含多条重复曲线，具体按如下步骤绘图：Grouped > Enter/Import data (Enter 3 replicates or more) > x 轴输入时间点，y 轴输入生存率，及组别名称 > 选取 Plot summary data 类别下的 Superimposed symbol with connecting line, Plot mean with SEM > 生成曲线图，采用 Multiple *t*-tests 分析对照组和实验组各时间点显著性差异，

如图 2 (D, E), 野生型果蝇 *W¹¹¹⁸* 感染 *E. coli* 或 *S. typhimurium* 后生存率变化。对于每组数据只选取一条代表性曲线, 按如下步骤绘图: survival > Enter/Import data > x 轴输入时间点, y 轴输入相应时间点死亡只数 > 生成 Kaplan-Meier 生存率曲线; 采用 log-rank test 方法比较两组曲线的显著性差异。

二、天然免疫应答检测

果蝇有两条主要的天然免疫应答通路, 分别是多响应革兰氏阴性菌感染的 IMD 通路和响应革兰氏阳性菌和真菌感染的 Toll 通路。而其下游抗菌肽基因的转录表达水平, 可用于衡量这两条天然免疫通路的应答活性, 如: 抗菌肽基因 *Diptericin*、*Drosocin*、*AttacinA*、*Attacin-D* 和 *Cecropin*, 多针对于 IMD 通路的应答, 而抗菌肽基因 *Drosomycin*、和 *Defensin* 多针对于 Toll 通路的应答。对于 IMD pathway, 一过性细菌感染初期, 抗菌肽基因表达迅速升高, 随着体内细菌被逐渐清除, 抗菌肽基因表达逐渐降低至本底水平。但对于一些致病菌造成的持续感染过程, 抗菌肽基因表达会长时间维持在高水平。如图 2F、2G, 野生型果蝇 *W¹¹¹⁸* 在非致死性致病菌 *E. coli* 造成的一过性感染和致死性致病菌 *S. typhimurium* 造成的持续感染过程中, 抗菌肽基因 *Diptericin* 转录水平变化。

三、感染后菌载量评价

感染过程中菌载量变化是评价机体免疫效能的一个重要指标, 可以衡量宿主清除病原菌, 以及病原菌增殖的情况。非致死性致病菌 *E. coli* 感染野生型果蝇后, 会被机体持续清除, 菌载量逐渐降低。而致死性致病菌 *S. typhimurium* 可在宿主细胞内持续增殖和传播, 菌载量持续升高 (图 2H、2I), 机体最终死于菌毒血症。

图 2. 穿刺感染后经典免疫指标的检测. A 图，模式图展示胸和腹部穿刺感染。果蝇侧位摆放，胸部穿刺感染在前胸侧面，此处外壳较脆，钨丝针尖容易刺破。腹部穿刺感染在胸腹节连接处的稍微偏下位置，腹部外壳较柔软，操作相对困难，针尖容易损伤肠道。B、C 和 D 图，对应 A 图，展示胸和腹部穿刺感染，沾有菌液的针尖穿刺位置在白色虚线圈内。E 和 F 图，*E. coli* (OD₆₀₀ = 200) 和 *S. typhimurium* (OD₆₀₀ = 10) 感染果蝇后生存率曲线，三次重复，error bar 以 Mean ± SEM 显示，Multiple *t*-test 统计各时间点显著性差异。G 和 H 图，感染后不同时间点抗菌肽 *Diptericin* 转录水平变化，*E. coli* 属于非致死性致病菌，随着菌逐渐被清除，免疫反应逐渐降低，而 *S. typhimurium* 是致死性致病菌，造成持续感染，免疫反应持续维持在最高水平。I 和 J 图，*E. coli* 和 *S. typhimurium* 感染后全身菌载量 (CFUs) 变化，Error bar 均以 Mean±SEM 显示，采用 nonparametric *t*-test 方法统计两个样品之间显著性差异。

溶液配方

1. 1× PBS 磷酸缓冲液 1 L

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na₂HPO₄

0.24 g KH₂PO₄

用去离子二次水定容至 1 L，用 HCl 和 5 M NaOH 调节 pH 值至 7.4，121 °C 高压灭菌 20 分钟

2. 1× PBST

1× PBS

0.1% Triton™ X-100

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) 和中国科学院青年创新促进会优秀会员 (潘磊) 的资助。

作者贡献声明：王磊完成全部实验和图片采集。王磊，潘磊撰写文章。

参考文献

1. 姚珩, 李春艳, 刘平, 王慧, 杨梅 (2003). [STM 钨针尖电化学加工及其装置的改进](#). 电子显微学报 第 22 卷. (第 3 期): 256-258.
2. Chambers, M. C., Jacobson, E., Khalil, S. and Lazzaro, B. P. (2014). [Thorax injury lowers resistance to infection in *Drosophila melanogaster*](#). *Infect Immun* 82(10): 4380-4389.
3. Greenspan, R. J. (2004). [Fly Pushing: The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics, Second Edition](#). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). [The host defense of *Drosophila melanogaster*](#). *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.
5. Neckameyer, W. S. and Argue, K. J. (2013). [Comparative approaches to the study of physiology: *Drosophila* as a physiological tool](#). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304(3): R177-188.
6. Neyen, C., Bretscher, A. J., Binggeli, O. and Lemaitre, B. (2014). [Methods to study *Drosophila* immunity](#). *Methods* 68(1): 116-128.

7. Pais, I. S., Valente, R. S., Sporniak, M. and Teixeira, L. (2018). [*Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria](#). *PLoS Biol* 16(7): e2005710.
8. Vallet-Gely, I., Lemaitre, B. and Boccard, F. (2008). [Bacterial strategies to overcome insect defences](#). *Nat Rev Microbiol* 6(4): 302-313., 302-313.
9. TRIZOL RNA isolation Protocol.
https://medicine.yale.edu/keck/ycga/microarrays/protocols/TRIZOLRNAIsolation_092107_21453_284_10813_v1.pdf.