果蝇肠道感染模型的建立

Intestinal Infection in *Drosophila* Larvae and Adults

褚珊珊^{1,2}, 赵娅娅^{1,3}, 潘磊^{1,3,*}

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; ³ 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

*通讯作者邮箱: panlei@ips.ac.cn

引用格式: 褚珊珊, 赵娅娅, 潘磊. (2019). 果蝇肠道感染模型的建立. *Bio-101* e1010295. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010295.

How to cite: Chu, S. S., Zhao, Y. Y. and Pan, L. (2018). Intestinal infection in *Drosophila* larvae and adults. *Bio-101* e1010295. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010295. (in Chinese)

摘要: 肠道是机体最大的粘膜免疫层, 也是病原和宿主相互斗争的最主要的场所。其中天然免疫应答是机体抵抗外界病原侵染的第一道防线。口服摄入, 从而导致的胃肠道感染也是生物体最为普遍的病理模型。因此, 建立卓有成效的肠道感染模式生物模型将对充分了解病原菌-宿主互作机制具有重要的意义。果蝇具有同高等动物高度保守的天然免疫通路, 以及其他模式生物无法比拟的遗传学操作优势, 因此赋予了果蝇被广泛应用于天然免疫的机理研究的能力。这里, 我们将详细描述如何在果蝇的成体和幼体肠道中建立病原菌感染模型, 以及相应的评价该模型体系的经典指标。

关键词: 肠道感染, 黑腹果蝇, *Erwinia carotovora carotovora* 15, *Ecc15*

材料与试剂

1. 果蝇饲养管
2. RNase-free EP 管
3. 滤纸
4. 刷子
5. 三角瓶
6. 无菌纱布
7. CO₂ 麻醉板
8. 高活性干酵母

9. 雄性果蝇成虫
10. *Erwinia carotovora carotovora* 15 (Ecc15)
11. 玉米粉
12. 葡萄糖
13. 蔗糖
14. 琼脂粉
15. 蒸馏水
16. 氯化钙
17. 山梨酸钾
18. 对羟基苯甲酸乙酯
19. LB
20. PBS
21. DEPC
22. 0.5 mm 陶瓷研磨珠
23. Trizol
24. 三氯甲烷
25. 异丙醇
26. 乙醇
27. 5× All-In-One RT MasterMix (Abm, catalog number: G490; -20 °C 储存)
28. EvaGreen 2× qPCR MasterMix-Low ROX (Abm, catalog number: MasterMix-LR)
29. 标准果蝇食物 (见溶液配方)
30. 尼可净 (见溶液配方)

仪器设备

1. 光照培养箱
2. 高通量组织研磨机
3. -80 °C 冰箱
4. 离心机
5. 高压灭菌锅
6. 震荡培养箱

7. 酶标仪 (Bio-rad)
8. Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems)
9. NanoDrop 2000 (Thermo Fisher)

软件

1. GraphPad prism

实验步骤

本实验方案以革兰氏阴性的果蝇的非致死菌 *Erwinia carotovora carotovora* 15 (*Ecc15*) 为例，建立果蝇肠道感染模型。该菌种来源于 Dr. Won-jae Lee (Seoul National University) (Ryu 等，2008)。

一、准备感染用的 *Ecc15* 溶液

1. 从-80 °C 中取出保存的 *Ecc15* 菌种，挑取一小块接种于含 5 ml LB 培养液的培养管中，30 °C 200 × g 震荡过夜培养。
2. 蘸取该溶液在 LB 培养平板上三区划线，30 °C 过夜培养。
3. 挑单克隆细菌，接种于含 2 ml LB 培养液的培养管中，30 °C 200 × g 震荡过夜培养，菌液全部接种到含 200 ml LB 培养液的三角瓶中，30 °C 200 × g 震荡培养，培养至 6 h 左右开始监测 OD₆₀₀ 数值，OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 之间时，收集细菌。
注：该时期细菌处于对数生长期，生长分裂旺盛，侵染复制能力强。此时期的菌液才可以用于免疫感染实验。
4. 收集的菌液，4 °C 6,000 × g 离心 10 min，弃去上清。用预冷的无菌 PBS 将细菌重悬，清洗，7500 × g 4 °C 离心 5 min，弃去上清，再重复清洗一次。
5. 细菌重悬于无菌的 5%蔗糖溶液至终浓度 OD₆₀₀ 值为 100。并计算蔗糖溶液的终浓度。
6. 同时使用无菌水将无菌的 5%蔗糖溶液稀释成同上一步（步骤 5）浓度的蔗糖溶液作为喂食溶剂对照。

注：准备菌液及其对照时，需考虑每一个基因型果蝇感染需要三个平行实验。

二、准备实验用果蝇

1. 准备成虫

挑选状态好、平均 3 日龄的雄性果蝇，仅检测生存率至少需要 80 只雄性果蝇成虫，养在普通培养基中。实验前，将果蝇转移到新的不含食物的无菌的空果蝇培养管里，使果蝇脱水饥饿 2 小时。

注：

- 1) 我们一般选用羽化五天左右的果蝇，此时其器官发育完善且生理运行相对稳定，同时肠道共生菌也趋于稳定（肠道共生菌会影响免疫应答）(Neckameyer 和 Argue, 2013; Pais 等, 2018)。
- 2) 我们一般只选择雄性果蝇进行感染实验。因为雌性果蝇的交配和产卵等行为会显著影响其生理状态，从而导致免疫应答不如雄性稳定。
- 3) 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. 准备幼虫

挑选活动能力好，体型均等的二龄末期或三龄初期幼虫，至少需要准备 180 条幼虫，实验前饲养在普通培养基中。

注：果蝇幼虫公母较难区分，在本实验中对果蝇幼虫的性别条件可以适当放宽。

三、准备无菌滤纸片

准备若干大小正好可以完全覆盖饲养管底部食物的滤纸片，高压灭菌。

四、果蝇成虫肠道感染

1. 将双层滤纸片塞入装有食物的饲养管中，覆盖食物，吸取 200 μ l 5%蔗糖重悬的菌液，均匀滴加在滤纸片上，等滤纸片吸干菌液后，再吸取 200 μ l 5%蔗糖重悬的菌液，二次均匀滴加在滤纸片上，静置至无明显液体析出。对于非含菌溶液的对照组，重复上述步骤。
2. 将已经饥饿脱水 2 小时的成虫果蝇先用 CO₂ 麻醉，每挑选 20 只，放入一个感染管或对照饲养管中。将饲养管横放，用刷子先将果蝇轻轻刷到管壁上，等所有果蝇完全苏醒后，方可再将饲养管慢慢竖放，置于 29 °C 培养箱中培养。对于一过性感染，

可于两天后将果蝇转移至含有正常食物的饲养管中，置于 29 °C 饲养，以后每 2 天，便将果蝇转移至正常食物的饲养管中；对于持续性感染，以后可每两天将果蝇转移至含新鲜菌液滤纸的饲养管中。

注：

- 1) 毒力小的病原感染可以每天或每两天统计一次果蝇的死亡只数。毒力强的病原感染建议每半天观察一次。
- 2) 果蝇肠道感染 *Ecc15* 时，需要置于 29 °C 中饲养，30 °C 是该细菌最佳增殖温度，但果蝇不能长期置于超过 30 °C 的环境中，会致死。
- 3) 每次感染，对于同一种基因型果蝇的同样处理，至少需要三管作为平行实验，至少需要三次独立重复。

五、果蝇幼虫肠道感染

1. 称量 4 g 果蝇普通食物，在饲养管中捣碎，加入 1 ml 步骤一（准备感染用的 *Ecc15* 溶液）中制备的 OD₆₀₀ 值为 100 的蔗糖菌液，搅拌使菌液和食物均匀混合，至无明显液体析出。将步骤二（准备实验用果蝇）中准备的三龄幼虫置于无菌水中轻轻搅拌清洗，去掉食物残渣。停止搅拌后，幼虫会沉集在容器底部，弃去上清，重复清洗 2~3 次。将容器倒扣在无菌纱布上，过滤掉水份。用小刷子轻轻挑选活动能力好，体型匀称的二龄末期或三龄初期幼虫，置于混有菌液的饲养管中进行喂食感染。每隔 10 min，观察饲养管，将爬到壁上的幼虫刷下去，重复三次。半小时后，若还有幼虫趴在饲养管管壁上，将其弃去。对照组，同样重复操作。每次感染，对于同一种基因型果蝇的同样处理，至少需要三管作为平行实验，至少需要三次独立重复。

注：幼虫感染一般不可超过 24 h，否则将进入变态期。

2. 可在相应感染时间点，收集幼虫按照上述步骤清洗，在冰浴的无菌 PBS 中解剖肠道等组织。

六、成虫生存率检测

从将果蝇成虫放入感染管中开始计时感染时间，感染后的果蝇成虫两天后转移到含新鲜培养基的饲养管中。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 软件统计生存率并做曲线。计算方法: $[100 \times (\text{总感染果蝇只数} - \text{各时间点累积死亡只数}) / \text{总感染果蝇只数}] \% = \text{生存率} (\%)$ (Yang 等, 2018)。

七、果蝇天然免疫应答基因的检测

果蝇的天然免疫通路 IMD 通路是肠道中抵御革兰氏阴性菌的感染主要的免疫通路之一, 同源哺乳动物的 NF- κ B/TNFR 通路, 调控下游抗菌肽 Antimicrobial Peptides (AMPs) 的表达, 这些抗菌肽的表达水平反之可以用于检测 IMD 通路的活性 (Lemaitre 和 Hoffmann, 2007)。常用于检测的 AMPs 有: *Diptericin/Cecropin/Attacin*。可在相应感染时间点, 随机解剖 30 条成虫或幼虫的肠道作为一组提取全 RNA, 反转录成 cDNA, 荧光定量 PCR 检测相对表达量 (He 等, 2017)。

1. TRizol 法提取 RNA

在组织中加 200 μ l 无菌 PBS 和少量无菌 0.5 mm 陶瓷研磨珠, 用高通量组织研磨机 60 Hz 研磨 60 s。在研磨液中, 加入 1 ml Trizol, 放在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 解冻, 加 200 μ l 氯仿, 剧烈摇晃 15 s, 室温孵育 5 min 直至水相有机相分开。4 $^{\circ}\text{C}$ 13,000 $\times g$ 离心 15 min。收集 400 μ l 上清, 转移到新 EP 管中, 加入 400 μ l 异丙醇混合, 轻轻上下混匀样品约 20 次, 室温静置 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 13,000 $\times g$ 离心 10 min, 白色 RNA 沉淀在管底部可见。弃去上清, 加 1 ml 70%乙醇, 上下颠倒清洗 RNA。4 $^{\circ}\text{C}$ 13,000 $\times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 干燥 RNA 5~10 min, 加 50 μ l DEPC, 混匀。测 RNA 浓度。

2. 逆转录 PCR

取 2 μ g RNA 作为模板逆转录成双链 cDNA, 以总体积 20 μ l 体系进行反转录反应。

反应体系: 20 μ l

5 $\times$ All-In-One RT MasterMix	4 μ l
RNA	X μ l (视浓度而定, 本实验要求 2 μ g)
DEPC 水	(20 - 4 - X) μ l

逆转录 PCR 反应条件:

25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min

42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min

85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min

4 °C 停止

反应完后可进行稀释，20 µl 体系加 80 µl 水，用于后续 Q-PCR 检测。

3. Q-PCR

如检测 *Diptericin*，选择内参基因 RP49 (果蝇的核糖体 RNA) 做相对定量，所使用引物信息参见表 1。

反应体系：20 µl

2× qPCR MasterMix	10 µl
ddw	6 µl
模板	2 µl
引物	2 µl

表 1. 所使用的引物信息

RT-PCR 引物名称	序列
Rp49-Forward	AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG
Rp49-Reverse	CACCAGGAACTTCTTGAATCCGG
Diptericin-Forward	GGCTTATCCGATGCCCGACG
Diptericin-Reverse	TCTGTAGGTGTAGGTGCTTCCC
AttacinA-Forward	CACAACTGGCGGAACTTTGG
AttacinA-Reverse	AAACATCCTTCACTCCGGGC
AttacinD-Forward	AAGGGAGTTTATGGAGCGGTC
AttacinD-Reverse	GCTCTGGAAGAGATTGGCTTG
Cecropin-Forward	ATGAACTTCTACAACATCTTCG
Cecropin-Reverse	GGCAGTTGCGGCGACATTGGCG
Drosocin-Forward	CGCCTAAAGATGTGTGCATAC
Drosocin-Reverse	CTCATTGTGTCACAATTGATTG

八、果蝇中病原菌载量的检测

在相应的感染时间点随机选取 15 只果蝇成虫或幼虫作为一组，用 75%乙醇润洗果蝇 2 次，无菌水润洗 2 次。在冰浴的无菌 PBS 或 LB 培养基中，解剖出果蝇肠道，加 200 µl 无菌 PBS 或 LB 和少量无菌 0.5 mm 陶瓷研磨珠，震荡研磨果蝇肠道。将研磨得到的混合液梯度稀释，多选择 10 倍、100 倍、1,000 倍稀释。取稀释后的溶液 100 µl 均匀涂

布在含相应抗生素的 LB 平板上，涂布三个平板作为三次平行对照，置于 30 °C 培养箱培养。约 16 h 后，计数板子上的菌落，根据公式计算 CFU。

CFU/果蝇计算公式：

10 倍稀释：三个平板菌落平均数 × 20/15

100 倍稀释：三个平板菌落平均数 × 200/15

1,000 倍稀释：三个平板菌落平均数 × 2,000/15

感染某时间点 CFU/果蝇 = (CFU/果蝇_{10 倍稀释} + CFU/果蝇_{100 倍稀释} + CFU/果蝇_{1,000 倍稀释})/3

结果与分析

一、果蝇成虫肠道感染结果分析

1. 生存率的统计

采用公式：[100 × (总感染果蝇只数 - 各时间点累积死亡只数)/总感染果蝇只数] % = 生存率 (%)，计算每个时间点生存率百分比，可采用 GraphPad 软件，Grouped → Enter/Import data (Enter 3 replicates or more) → 输入数据 → 采用 Plot summary data 类别下的 Superimposed symbol with connecting line, Plot mean with SEM。采用 Multiple *t*-tests 分析对照组和感染组生存率曲线图各时间点显著性差异。Survival → Enter/Import data → 输入数据 → 生成 Kaplan-Meier 生存率曲线，采用 log-rank test 方法分析对照组和实验组生存率曲线的显著性差异。因为 *Ecc15* 是果蝇肠道的非致死菌，所以感染野生型果蝇 *w¹¹¹⁸*，两者在统计时间段内对照组和感染组果蝇在感染后生存率没有显著差异 (图 1)。

图 1. 果蝇成虫肠道感染后生存率分析. 与阴性对照组相比, *Ecc15* 感染组生存率没有显著性差异。蓝色方框与绿色圆圈分别代表阴性对照组和 *Ecc15* 感染组感染 10 天内的存活率。误差 (error bar) 均以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 显示, 三次独立重复, $n = 60$, 生成 Kaplan-Meier 生存率曲线, 采用 log-rank test 方法统计两组生存率曲线之间显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns (not significant, 不显著)。

2. 天然免疫通路的应答检测

果蝇有两条主要的天然免疫应答通路—IMD 通路和 Toll 通路, 其中 IMD 通路多响应革兰氏阴性菌感染, Toll 通路多响应革兰氏阳性菌和真菌感染。本实验中检测 IMD 通路下游的抗菌肽基因 *Diptericin* 的转录水平, 可用于衡量 IMD 天然免疫通路的应答活性, 以内参基因 RP49 (果蝇的核糖体 RNA) 做相对定量。可采用 GraphPad 软件, Grouped → Enter/Import data (Enter 3 replicates or more) → 输入数据 → 采用 Plot summary data 类别下的 Interleaved bars, Plot mean with SEM。采用 one-way ANOVA 分析对照组和实验组感染后 *Diptericin* 转录水平的显著性差异: 在统计时间段内对照组和感染组果蝇在感染后 *Diptericin* 转录水平差异显著 (图 2)。

图 2. 果蝇成虫肠道感染后不同时间点抗菌肽 *Diptericin* 转录水平变化. 以内参基因 RP49 (果蝇的核糖体 RNA) 做相对定量, 与阴性对照组相比, *Ecc15* 感染组 *Diptericin* 转录水平有显著性差异. 阴性对照组在上述 3、6、12、24、48 h 这几个时间点内 *Diptericin* 转录水平无明显变化, *Ecc15* 感染组 *Diptericin* 转录水平在 3~24 h 内呈现上升趋势, 24~48 h 内出现下降趋势. *Ecc15* 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. 误差 (error bar) 均以 Mean $\pm$ SEM 显示, 三次独立重复, 随机解剖成虫 n = 30 个中肠, 采用 one-way ANOVA 方法统计每个时间点两组样品之间显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns (not significant, 不显著)。

3. 病原菌肠道内的增殖情况

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. 本实验中, *Ecc15* 在野生型果蝇中是一过性感染, 会在体内逐渐被清除, 菌载量逐渐降低. 采用上述计算 CFU/果蝇公式, 可计算出不同时间点平均每只果蝇肠道内的菌载量. 可采用 GraphPad 软件, Grouped $\rightarrow$ Enter/Import data (Enter 3 replicates or more) $\rightarrow$ 输入数据 $\rightarrow$ 采用 Plot summary data 类别下的 Interleaved bars, Plot mean with SEM. 采用 Multiple *t*-tests 分析不同时间点果蝇肠道内病原菌载量的差异性: 在 3 h 时, 果蝇肠道内 *Ecc15* 菌载量最高, 随后被机体快速清除. 3 h 时的菌载量与其他时刻差异显著 (图 3)。

图 3. 果蝇成虫感染后肠道内 *ECC15* 的增殖变化. 在 3、6、12、24 h 等不同时间点, 肠道中 *Ecc15* 数量逐渐降低, 直至完全清除. *Ecc15* 属于非致死性致病菌, 在一过性感染中, 随时间变化, 菌逐渐被清除. 误差 (error bar) 均以 Mean $\pm$ SEM 显示, 三次独立重复, $n = 15$, 采用 Multiple t-tests 方法统计样品之间显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns (not significant, 不显著)。

二、果蝇幼虫肠道感染结果分析 (图 4)

果蝇幼虫肠道天然免疫通路的应答检测。

图 4. 果蝇幼虫肠道感染 3 h 后抗菌肽 *Diptericin* 转录水平变化. 以内参基因 RP49 (果蝇的核糖体 RNA) 做相对定量, 与阴性对照组相比, *Ecc15* 感染组 *Diptericin* 转录水平有显著性差异. *Ecc15* 感染组 *Diptericin* 转录水平显著高于阴性对照组. 误差 (error

bar) 均以 Mean $\pm$ SEM 显示, 三次独立重复, $n = 30$, 采用 Student's *t*-test 方法统计两组样品之间显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns (not significant, 不显著)。

溶液配方

1. 标准果蝇食物

蒸馏水	1 L
琼脂	10.6 g
酵母	32.19 g
氯化钙	0.726 g
蔗糖	31.62 g
葡萄糖	57.6 g
玉米粉	77.7 g
山梨酸钾	2 g
尼可净	15 ml

2. 尼可净

500 ml 95%以上乙醇
100 g 对羟基苯甲酸乙酯
室温保存

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) 的支持。文中内容主要对实验室 Nature Microbiology 2: 17056 (2017) 文章, 进行了详细阐述。

作者贡献声明: 褚珊珊完成大部分实验和图片采集, 其中幼虫感染部分的实验和图片由赵娅娅提供。褚珊珊, 潘磊撰写文章。

参考文献

1. He, X., Yu, J., Wang, M., Cheng, Y., Han, Y., Yang, S., Shi, G., Sun, L., Fang, Y., Gong, S. T., Wang, Z., Fu, Y. X., Pan, L. and Tang, H. (2017). [Bap180/Baf180 is required to maintain homeostasis of intestinal innate immune response in *Drosophila* and mice.](#) *Nat Microbiol* 2: 17056.
2. Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). [The host defense of *Drosophila melanogaster*.](#) *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.
3. 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.
4. 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.
5. Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, H. Y., Bai, J. Y., Nam, Y. D., Bae, J. W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E. M. and Lee, W. J. (2008). [Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*.](#) *Science* 319(5864): 777-782.
6. 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).