果蝇无菌培养

Axenic Fly Cultures

邓娟, 刘南*

中国科学院生物与化学交叉研究中心, 上海

*通讯作者邮箱: liunan@sioc.ac.cn

引用格式: 邓娟, 刘南. (2019). 果蝇无菌培养. *Bio-101* e1010296. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010296.

How to cite: Deng, J. and Liu, N. (2019). Axenic fly cultures. *Bio-101* e1010296. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010296. (in Chinese)

摘要: 主要介绍如何收集果蝇胚胎, 并对胚胎进行漂洗灭菌, 然后置于含抗生素的果蝇食物上进行无菌培养, 以获得无菌果蝇, 用于需要排除细菌干扰的实验。

关键词: 果蝇, 无菌, 培养

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 果蝇培养瓶 (Genesee Scientific, catalog number: 32-130)
3. Kimwipes 纸巾 (Kimberly-Clark Worldwide, Inc., catalog number: 34155)
4. 果蝇胚胎收集笼 (Genesee Scientific, catalog number: 59-101)
5. 100 μ m 细胞滤网筛 (Corning Incorporated-Life Sciences, catalog number: 352360)
6. 博格利诺勾线笔
7. 50 只雄果蝇和 50 只雌果蝇
8. PCR 引物 (真细菌的通用引物 27F 和 1492R)
27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'
9. 高糖型马利活性干酵母 (英联马利(北京)食品销售有限公司)
10. 84 消毒液 (江苏爱特福 84 股份有限公司)
11. Ampicillin sodium (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A610028)

12. Tetracyclinehydrochloride (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A600504)
13. Rifamycin (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A600808)
14. PCR 试剂 (上海翊圣生物科技有限公司, catalog number: 10102ES08)
15. LB 肉汤培养基 (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A507002)
16. Agar A (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A600010)
17. 蔗糖 (上海实验试剂有限公司)
18. 麦芽糖 (上海实验试剂有限公司)
19. 苯甲酸钠 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 30164817)
20. 对羟基苯甲酸甲酯 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 30119426)
21. 丙酸 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 81011918)
22. 95%乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 10009164)
23. 琼脂粉 (生工生物工程(上海)股份有限公司, catalog number: A505255)
24. 玉米粉 (上海仕林生物科技有限公司)
25. 黄豆粉 (上海仕林生物科技有限公司)
26. 食物平板 (见溶液配方)
27. 酵母泥 (见溶液配方)
28. 苹果汁板 (见溶液配方)
29. 固体平板 (见溶液配方)
30. 抗生素食物 (见溶液配方)

仪器设备

1. 果蝇培养箱 (Percival Scientific, Inc., model: DR-41VL)
2. 离心机 (Eppendorf)
3. 生物安全柜 (苏州净化, catalog number: SW-CJ-1D)
4. PCR 仪 (BIO-RAD, model: T100™ Thermal Cycler)
5. 电饭锅 (上海元山电器工业有限公司, model: YS-RC20B08S)
6. 电泳槽 (BIO-RAD, catalog number: 170-4469)
7. 电泳电源 (BIO-RAD, catalog number: 164-5052)

8. 凝胶成像仪 (Proteinsimple, model: SA-1000 [red])
9. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂, model: LDZH-200KBS)

实验步骤

一、果蝇无菌培养

1. 果蝇培养条件: 温度 25 °C; 湿度 60%, 光照时间段为早上 7 点至晚上 7 点。准备 4 个含有正常食物的果蝇培养瓶, 每个培养瓶里各放 50 只雄果蝇和 50 只雌果蝇。
2. 3 天后, 倒掉果蝇成虫, 每个培养瓶放一张 kimwipes 纸巾, 增加蛹依附的空间, 以收到更多的成虫。
3. 第 10 天开始收集成虫, 共收集两天, 并全部集中放到果蝇胚胎收集笼中 (约 1,200 只), 继续培养两天。

注:

- 1) 食物平板在上, 减少果蝇成虫因密集而损失。收集卵时, 苹果汁板在下, 以便于短时间内收集大量的卵。
- 2) 果蝇胚胎收集笼中放入 2 张 kimwipes 纸巾可以保持环境干燥。
4. 果蝇胚胎收集笼中培养的第三天, 在食物平板上抹适量酵母, 更换干净的果蝇胚胎收集笼和 kimwipes 纸巾。
5. 果蝇胚胎收集笼中培养的第四天开始预产卵, 将果蝇转移至一个干净的果蝇胚胎收集笼中, 换上抹有酵母泥的苹果汁板。
6. 每间隔 2 小时更换一个苹果汁板, 将卵用 100 μ m 的细胞滤网筛收集起来。
7. 用慢流速的自来水冲洗 1 分钟, 避免直接对着卵操作, 用干纸巾吸干水分。
8. 50%的 84 消毒液漂洗 2 分钟。
9. 重复步骤 7 一次。
10. 在生物安全柜中, 70%的乙醇漂洗 2 分钟。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 无菌水漂洗 2 分钟。
13. 重复步骤 12 一次。
14. 用干净的博格利诺勾线笔将适量的卵分装进抗生素食物中。

注: 抗生素食物预先用镊子捣碎, 方便搁置卵。

15. 成虫出来后转移至抗生素食物管中，每间隔 2~3 天更换新的食物。

二、无菌果蝇验证 (Chen 等, 2014)

1. 以成虫果蝇匀浆为模板，PCR 扩增 16s rRNA (Weisburg 等, 1991)。
2. 将正常培养果蝇和无菌处理果蝇分别收集 10 只至 1.5 ml 的离心管中，均用无菌水洗三遍，再转移至固体平板上，直接用涂板的玻璃棒碾碎涂匀，37 °C 倒置培养 48 h，看是否会长菌。如图 1 所示，正常果蝇匀浆涂板 48 h 后，长出两个菌落 (红色方框所示)，而无菌处理的果蝇匀浆涂板 48 h 后则没有发现菌落。

图 1. 果蝇匀浆后涂板培养

溶液配方

1. 果蝇正常食物

蔗糖 320 g

麦芽糖 339.2 g

高糖型马利活性干酵母 200 g

琼脂粉 48 g

黄豆粉 73.44 g

玉米粉 534.6 g

双蒸水 8.9 L

先用 1 L 双蒸水预混为匀浆，7.9 L 双蒸水用电饭锅煮沸后缓慢倒入匀浆，煮 20 分钟，冷却至 70 °C，加溶于 20 ml 95%乙醇的对羟基苯甲酸甲酯 2 g，苯甲酸钠 8 g，丙酸 55 ml，搅匀

分装至 10 cm 平板 (20 ml 每平板)

分装至果蝇培养瓶 (30 ml 每培养瓶)

2. 酵母泥

5 g 高糖型马利活性干酵母溶于 8 ml 双蒸水，混匀

3. 苹果汁板

200 ml 双蒸水

100 ml 苹果汁

6 g 琼脂

微波炉煮沸，分装至 10 cm 平板

4. 固体平板

2.5 g LB 肉汤培养基

3.0 g Agar A

溶于 100 ml 双蒸水，高温灭菌，分装至 10 cm 平板

5. 抗生素食物

1) 果蝇管用紫外照射 18 小时

2) 用 50% 乙醇配制含有 5mg/ml ampicillin sodium , 500 µg/ml tetracyclinehydrochloride, 2 mg/ml rifamycin 的抗生素储存液，再取 5 ml 加入 500 ml 正常食物中，搅匀后分装

注：

a. 食物的温度一般在 55 °C 时加入抗生素，避免温度影响抗生素。

b. 制备好的抗生素食物建议避光保存。

3) 对照组食物加入等量的 50%乙醇

参考文献

1. Chen, H.Y., Zheng, X. B., Zheng, Y. X. (2014). [Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia.](#) *Cell* 159: 829-843.

2. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). [16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study](#). *J Bacteriol* 173: 697-703.