果蝇卵巢细胞培养即时影像分析系统

Live Imaging of Collective Cell Migration in the *Drosophila* Ovary

王珏文^{1, #}, 吴榛惟^{1, #}, 张玉泉², 张纯纯^{1, *}

¹ 生物科技与产业科学系, 国立成功大学, 台南, 台湾; ² 生物医学研究所, 国立中山大学, 高雄, 台湾

*通讯作者邮箱: ccjang@mail.ncku.edu.tw

#共同第一作者

引用格式: 王珏文, 吴榛惟, 张玉泉, 张纯纯. (2019). 果蝇卵巢细胞培养即时影像分析系统. *Bio-101* e1010297. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010297.

How to cite: Wang, C. W., Wu, J. W., Chang, Y. C. and Jang, A. C. (2019). Live imaging of collective cell migration in the *Drosophila* ovary. *Bio-101* e1010297. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010297. (in Chinese)

摘要: 本实验流程叙述如何由雌性果蝇腹腔取出完整的卵巢, 并进一步解剖出其卵管 (ovarioles), 再经由体外培养 (*ex vivo*) 的方式使卵室 (egg chambers) 维持基本功能, 并透过光学显微镜进行即时影像分析。此流程着重于分析第九至十期的卵室发育, 此阶段的卵室, 前端的卵泡细胞 (follicle cells) 会有 4~8 颗细胞组成一群组 (cluster), 且开始往卵母细胞 (oocyte) 的边境 (border) 方向迁移, 因此我们亦称这群会移动的细胞为边境细胞 (border cells)。此流程能维持卵室在体外培养时间长达 8 小时, 以即时观察边境细胞迁移的状态。亦可观察不同基因型卵室的即时发育过程, 并通过生物感应器 (biosensors) 同步观察讯号传递分子的变化, 此流程建立亦有助于测试药物对正常或癌化细胞迁移的影响。

关键词: 即时影像, 边境细胞, 体外培养, 卵巢发育

材料与试剂

1. μ -Dish 35 mm, low (ibidi GmbH, catalog number: 80136)
2. ADVANTEC NO.20 pH 试纸 (Advantec®, catalog number: 07010110)
3. 凹陷载玻片
4. 培养管
5. 干酵母菌颗粒
6. 处女果蝇 (雌果蝇)

7. 雄果蝇
8. 无菌双蒸水 (ddH₂O)
9. Insulin (Beef), United States Pharmacopeia (USP) (Sigma-Aldrich, catalog number: 1342208)
10. Schneider's Drosophila Medium (S2 培养液) (Thermo Fisher Scientific, Gibco, catalog number: 80136)
11. Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, Gibco, catalog number: 10082147)
12. 体外培养液 (见溶液配方)
13. 果蝇萃取液 (见溶液配方)

仪器设备

1. Dumostar 精密手术镊子 (Dumont, catalog number: 0209-5-PO)
2. 离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge 5424)
3. Leica EZ4 体视显微镜 (Leica, model: EZ4)
4. Zeiss Observer D1 microscopy (Zeiss, model: Observer D1)

软件

1. AxioVision SE64Rel.4.8.2 software

实验步骤

一、准备雌果蝇以解剖卵巢样本

1. 将欲做分析的处女果蝇 (female virgin) 与数只雄果蝇放置于新鲜的食物培养管中，并加入 2~4 颗干酵母菌颗粒，然后将含有果蝇的管子放在 18 °C 两天，并注意每天更换新食物培养管，待其卵巢成熟。
2. 两天后将果蝇换到新的食物管中，并重复步骤 1，加入 2~4 颗的干酵母菌颗粒，再将此管放在 25 °C，12 至 14 个小时。

注:

- 1) 一定要收集处女果蝇，且每天要将雌果蝇换到新的含干酵母菌的培养管中以确保其卵巢正常发育。否则雌果蝇的卵巢可能发育不良。

- 2) 放置 25 °C 培养箱不能超过 14 小时，否则会造成老的卵室过多，而没有适当发育阶段的卵室可供分析。

二、解剖雌果蝇卵巢以游离其卵管 (ovariable) 或卵室

1. 利用二氧化碳气体 (CO₂) 麻醉 2 到 3 只欲做分析的雌果蝇。
2. 在凹陷载玻片中加入 150 µl 体外培养液 (见溶液配方)，并置于解剖显微镜下。
3. 利用一只镊子轻轻的将一只雌果蝇夹起移动到体外培养液中，并将果蝇翻转使背部贴在载玻片上。用另一只镊子夹住腹部表皮层 (图 1A 和视频 1) 向外剥，拉扯出一对白色不透明卵巢 (图 1B 和视频 1) (Prasad 等, 2007)。重复步骤 3 将每只雌果蝇的卵巢剥出收集至体外培养液中。

视频 1. 从母果蝇的腹部取出卵巢

4. 在体外培养液中，用一只镊子夹住卵巢的根部 [靠近发育晚期的卵室所在位置 (图 1C 左半部和视频 2)]，另外一只镊子夹住卵巢前缘尖端 [此处包含干细胞和早期的卵室 (图 1C 右半部和视频 2)]，并且将卵管向外拉出 (图 1D 和视频 2)，重复此步骤直到将所有的卵管皆游离出来。
5. 小心地移除晚期卵室 (大于发育阶段 10)，若有些晚期的卵室仍附着于欲观察阶段 8~9 的卵室上(图 1D 和视频 2)，在此步骤要极小心，用一支镊子夹住最大的卵室一端，向外拉，拉断发育阶段 10 之前的卵室与较老卵室之间的连接，尽量避免碰触所要观察的卵室。

注：过多成熟的卵室会消耗体外培养液的养分，所以卵室无法长时间在体外培养液生长。因此在解剖卵室时需要将发育阶段 10 或是更老的卵室移除，才不会影响待观察卵室的生长。同时此培养液的养分通常仅足够培养 1~2 只雌果蝇解剖后的卵室，一次解剖太多只果蝇反而造成相反的效果。

图 1. 解剖雌果蝇卵巢以游离其卵管或卵室

视频 2. 游离雌果蝇的卵室

三、置放卵室于培养皿

1. 准备 ibidi μ -Dish，用于放置样本，如图 2 所示，并且利用无菌的二次水沾湿棉花围绕于培养皿周围 (图 2 Top view) (Chang 等, 2018)，防止体外培养液在影像拍摄过程中水分的散失。
2. 吸取解剖后卵室包含体外培养液约 100 μ l 放置于上述培养皿中，并再加入 50 μ l 体外培养液到培养皿中 (图 2)。

图 2. 培养皿中卵室放置的示意图

四、显微即时影像撷取设定

1. 将培养皿放在显微镜下，先以低倍率物镜找到欲观察的卵室 (图 3A-3B)，移到视野下。避免选择形状异常，外围卵泡细胞排列不规则或有明显破损的样本 (图 3C-3D)。

图 3. 显微镜下正常卵室 (A-B) 以及性状异常 (C-D) 的样例

- 以 20 倍物镜观察拍摄，调整焦距后，透过 AxioVision SE64Rel.4.8.2 software 侦测适当的曝光程度及时间，控制每间隔 3 分钟撷取一次影像 (如图 4，步骤 1~4)。

图 4. 显微即时影像撷取软件设定步骤 1~4

- 在即时影像撷取期间，每隔 30 分钟请注意细胞是否失焦，可于 AxioVision SE64Rel.4.8.2 software 中按暂停 (pause)，重新对焦 (refocus)，再继续拍摄 (如图 5，步骤 5~9)。

注：

- 光毒性 (photo-toxicity): 过长的曝光时间或更短的时间间隔以撷取影像会对卵室产生光毒性 (photo-toxicity)，影响边界细胞迁移甚至整个卵室发育 (图 3)，曝光时间和时间间隔的设定须随所使用的显微镜与影像撷取设备有所调整。
- 卵室是否正常发育: 包含边境细胞是否正常移动，卵母细胞 (oocyte) 是否生长，卵室外围的滤泡细胞是否随卵室成长，这些现象代表体外培养条件是否成功 (视频 3)。

- 3) 拍摄过程卵室有位移的现象: *ibidi μ -Dish* 仅能重复使用 1 次, 培养皿上有助于卵室附着的物质, 在重复使用及清洗下将毁损, 造成细胞无法附着, 拍摄时卵室会有位移的现象。所以建议重复使用以一次为限。

图 5. 显微即时影像撷取软件设定步骤 5~9. 步骤 9 (a)欲重新调整曝光时间以及重新对焦请按“Pause”做调整 (b)调整完后按“Continue”继续拍摄。

视频 3. 卵室细胞即时摄影

溶液配方

1. 体外培养液 (总体积 1 ml)

48% Schneider's Drosophila Medium (S2 培养液)

50% Fetal Bovine Serum

200 µg/ml Insulin (溶于 0.1 N HCl)

20 µl 雌果蝇萃取液 (见下列详述制备程序)

体外培养液需新鲜配制, 配完后, 以试纸测量 pH 值, 必须在 6.8~7.0 之间

2. 雌果蝇萃取液

先将 10 只雌果蝇利用酵母菌糊喂食培养于 29 °C 14 小时后, 将 10 只雌果蝇以 CO₂

迷昏, 置入 1.5 ml Eppendorf 管中, 并加入 100 µl S2 培养液, 磨碎。之后在 4 °C

以 20,000 × g 离心 2 分钟, 并吸取上清液至新的 Eppendorf 管即完成

致谢

1. 科技部计划: MOST 107-2311-B-006-002-MY3;

2. 教育部顶大计划: The Headquarters of University Advancement at the National Cheng Kung University granted by the Ministry of Education, Taiwan.

参考文献

1. Chang, Y. C., Wu, J. W., Hsieh, Y. C., Huang, T. H., Liao, Z. M., Huang, Y. S., Mondo, J. A., Montell, D. and Jang, A. C. (2018). [Rap1 negatively regulates the hippo pathway to polarize directional protrusions in collective cell migration](#). *Cell Rep* 22(8): 2160-2175.
2. Prasad, M., Jang, A. C., Starz-Gaiano, M., Melani, M. and Montell, D. J. (2007). [A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging](#). *Nat Protoc* 2(10): 2467-2473.