基于单片机控制的果蝇睡眠剥夺方法

Drosophila Sleep Deprivation System Based on Single Chip Control

金熙，韩俊海*

生命科学研究院，东南大学，南京市，江苏

*通讯作者邮箱: junhaihan@seu.edu.cn

引用格式: 金熙，韩俊海. (2019). 基于单片机控制的果蝇睡眠剥夺方法. *Bio-101* e1010298. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010298.

How to cite: Jin, X. and Han, J. H. (2019). *Drosophila* sleep deprivation system based on single chip control. *Bio-101* e1010298. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010298. (in Chinese)

摘要: 睡眠是普遍存在的基本生命活动，受节律和稳态系统共同调控。果蝇具有睡眠样行为。通过睡眠剥夺系统，可以评估果蝇睡眠稳态系统的调控能力。本系统由睡眠检测板、人工气候箱、混合器、微型计算机和单片机控制器等构成。在检测果蝇睡眠的同时，利用混合器强大的震荡能力，对检测板中的果蝇施加机械振动，剥夺果蝇睡眠。混合器的时域参数，通过单片机和电磁继电器组合控制，在一定程度上实现了可编程与自动化控制。最后得到的睡眠检测数据，可利用专业软件进行分析。

关键词: 睡眠剥夺，混合仪，单片机

材料与试剂

1. 果蝇饲养瓶 (19.5 cm² × 10 cm 无色玻璃)
2. 果蝇睡眠检测用管 (12.5 mm² × 6.5 cm 无色玻璃)
3. 烧杯
4. 皮筋
5. 玻璃培养皿 (或者塑料皿)
6. 毛笔
7. 带孔塑料塞 (或棉花塞)
8. 果蝇，如: *w¹¹¹⁸* (FlyBase ID: FBst0005905)
9. 红糖 (甘汁园纯正红糖)

10. 丙酸 (国药, 沪试, catalog number: 81011918)
11. 琼脂粉 (BIOSHARP JAPAN)
12. 睡眠监测期间果蝇食物 (见溶液配方)

仪器设备

1. 烘箱
2. 光照培养箱 (55 cm × 55 cm × 150 cm, 宁波海曙赛福科技有限公司)
3. 体视显微镜 (Nikon SMZ745)
4. CO₂ 麻醉板 (Flystuff Flypad Frame, catalog number: 59-118)
5. 果蝇行为监测系统 (DAM2 Trikinetics, Waltham, MA, USA)
6. 多管漩涡混合器 (UMV-2, 北京优晟联合科技有限公司, 购于阿里巴巴平台)
7. 单路继电器模块 (天猫商城, telesky 旗舰店)
8. 单片机控制四路继电器模块 (淘宝商城, 海森豪电子网络营销部)
9. 直流电源 (DC12V 10A, 天猫商城, NVVV 君临专卖店)

软件

1. 数据收集软件 DAMSystem

实验步骤

一、睡眠剥夺系统搭建

1. 改装混合器

市场上购买的混合器, 普遍具有较好的震荡效果, 但是控制面板相对简单, 无法实现时域或者频域控制。为解决这一问题, 需要对混合器进行改装。

- 1.1 将混合器拆开, 找到启动震荡的微动开关 (形状如图 1A, 位于图 1B 的 Start/Stop 按键下方)。从微动开关的任意两个对侧针脚, 用锡焊焊接两根导线, 两根导线另一端均引出到混合器之外 (图 1B)。
- 1.2 将混合器重新安装完好, 通电后检查混合器是否可以正常工作。特别注意, 引出的导线可以直接控制混合器的启动, 方为成功。在混合器通电的情况下, 两根导线对接一次, 混合器启动, 再对接一次, 混合器停止工作。故将引出导线

命名为 Control line1 和 Control line2 (图 1B)。

图 1. 微动开关与 Control lines

2. 安放混合器

2.1 混合器震动产生巨大动能，故将其放入独立培养箱中。

2.2 混合器下部铺设海绵和垫片达到缓震效果 (图 2A 和 2B)。

2.3 混合器的震荡转速设置为 1,200~1,500 rpm 为宜，可以根据实际情况进行调整。

2.4 Control lines 用胶带固定，防止导线抖动导致接触不良。Control lines 引出到培养箱之外，保证 Control lines 具有一定的长度 (> 20 cm)。

图 2. 混合器放置图

3. 单片机编程

由于作者知识结构限制，在此仅做简要介绍，请有兴趣的读者自行学习单片机的设计和使用原理。

图 3 所示的四路继电器单片机以及编码服务，购买于淘宝网店“海森豪电子网络营销部”，商品简要介绍见附录 1，网址：

<https://ly889.taobao.com/index.htm?spm=2013.1.w5002-4171188017.2.5613196bxiaUzi>

大致流程如下：

- 3.1 图 3A 单片机使用 KeilC51Vcngr 编译器，需购买和安装该软件。
- 3.2 在编译器中编写代码，实现控制功能：当单片机接收到触发信号后，在 170 s 的时间区间内，随机选择一个时间点，闭合电磁继电器 10 s 后断开。
- 3.3 使用 STC-ISP 单片机下载编程烧录软件，将编写代码，通过 STC 下载器烧录至单片机中。

图 3. 单片机模块和继电器模块实物图

4. 单片机与继电器联合控制模块搭建

增加继电器模块，方便震动间隔和震动时间的调节。使用 telesky 品牌一路继电器模块 (图 3B)。telesky 继电器模块使用说明见附录 2。

- 4.1 按照图 4 连接单片机和继电器模块，注意接口不要连错。

图 4. 导线连接图

4.2 参照附录中 telesky 品牌一路继电器模块使用说明，设置参数，表 1 供参考。

表 1. 继电器参数设置

继电器模块编号	程序编号	参数		
		CL	OP	LOP
1	P5.3	195s	2s	∞
2	P1.1	-	10s	-
3	P-2	12s	1s	-

4.3 按信号控制顺序，设计介绍控制原理如下 (图 5):

- 1) 1 号继电器模块控制震荡事件的时间区间长度，如表 1 和图 5 所示，时间区间长度为 $CL1 + OP1 = 195\text{ s} + 2\text{ s} = 197\text{ s}$ ，设置循环数 LOP1 为无限循环。每个循环的第 196 s，1 号继电器模块闭合模块上的继电器，将高电平信号传输至单片机。
- 2) 单片机收到高电平信号后被触发，在 170 s 内，随机选择一个时间点闭合电磁继电器 10 s。单片机在收到高电平信号 3 min 之后恢复待机状态，可

以接受下一次触发信号。单片机的电磁继电器闭合后，将高电平信号同时传输至 2 号和 3 号继电器模块。

- 3) 2 号继电器模块控制振荡事件的开始，在接收到来自单片机的高电平信号后被触发，通过闭合 2 号模块上的继电器，闭合 Control line1 和 Control line2 一次，启动震荡事件。2 号模块上的继电器闭合 OP2 = 10s 之后断开，2 号继电器模块进入待机状态。
- 4) 3 号继电器模块控制震荡事件的持续时间，在接收到来自单片机的高电平信号后被触发，触发后，计时 CL3 = 12s，计时结束后，通过闭合 3 号模块上的继电器，闭合 Control line1 和 Control line2 一次，停止震荡事件。闭合时间 OP3 = 1s 后，继电器断开，3 号继电器模块进入待机状态。

*注：CL1 和 OP1 控制时间区间长度，CL3 控制震荡时间，按照控制逻辑，可以自行调节各参数，图表所示，是经过验证有效的一种设置方式。需要注意，当 CL1 + OP1 小于 3 min 时，会出现逻辑错误。如果实验需要 CL1 + OP1 小于 3 min，则可以通过修改单片机代码实现。若实验需要 CL1 + OP1 大于 3 min，则 170 s + CL3 之后的部分必然不会有震荡，导致随机性降低，但亦可以通过修改单片机代码，更改单片机选取随机时间的区间长度，根据实际操作经验，可控制必然非震荡时间 < (CL1+OP1) * 10%。需要注意，CL3 < OP2，也会导致逻辑错误。*

图 5. 控制原理图

二、果蝇睡眠剥夺

1. 准备待测果蝇

使用标准果蝇食物，在饲养瓶中饲养果蝇（温度：25 °C，湿度：50%，光照：12 h 光照/12 h 黑暗）；监测果蝇年龄应在 3~8 天。

2. 准备监测用玻璃管

2.1 新的玻璃管壁残留游离碱，玻璃管置于烧杯在双蒸水中加入适量丙酸，煮沸 5~10 min；用双蒸水清洗玻璃管两次，在双蒸水中煮沸 5 min；用双蒸水清洗玻璃管一次，在双蒸水中煮沸 5 min；用双蒸水清洗玻璃管一次。

2.2 用皮筋捆扎玻璃管，置于洁净的玻璃培养皿（或者塑料皿）中，双蒸水清洗玻璃管 4 min，置于烘箱烘干。

2.3 使用饮用水，配制终浓度为 5%红糖和 1.5%琼脂的食物溶液，配制时使用微波加热煮沸 5 min 以上，间歇搅拌，待冷却至 60 °C 左右，每 100 ml 食物加入 0.6 ml 丙酸。

2.4 于洁净的玻璃培养皿 (或者塑料皿, 皿深 1.5 cm)中, 倒满配制好的食物, 迅速平稳放置捆扎好的玻璃管, 待食物冷却凝固。

2.5 从烧杯中取出监测管, 擦净监测管外壁残余食物, 用塑料塞封住食物端。

3. 装配果蝇

3.1 用二氧化碳麻醉果蝇。

注: 由于二氧化碳麻醉会对果蝇产生不利影响, 应尽量避免麻醉时间超过 5 min。

3.2 用毛笔将果蝇移入监测管中 (一根监测管一只果蝇)。

3.3 将装入果蝇的监测管插入监测板中, 并用带孔塑料塞 (或棉花塞) 封住非食物端。

注: 尽量将同一基因型同一性别的果蝇装在同一块监测板中, 并准确记录果蝇基因型及其对应监测板号码和监测管位置。

3.4 待监测板上果蝇装配完成后, 尽量使监测管中部 (无食物部分) 对准监测板上红外线发射/接收处, 并用橡皮筋固定监测管, 固定方法可参考图 6A 和图 6B。

图 6. 玻璃管捆扎方法

3.5 将监测板放入预先设置好温度、湿度和时间参数的培养箱中, 并用数据线 (美式标准) 将其与数据收集系统相连。 (例如 8:00 a.m.开始, 12 h 光照/12 h 黑暗, 25 °C, 湿度 60%)

3.6 在电脑上打开数据收集软件 DAMSystem, 设置收集数据间隔为 1 min 并确认连接好的监测板已开始收集数据。

4. 果蝇睡眠剥夺

- 4.1 预先设置好睡眠剥夺培养箱的温度、湿度和时间等参数。
- 4.2 根据实验需求，选择合适的时间点，将检测板放入混合仪中固定 (图 7)，并用数据线 (美式标准) 将其与数据收集系统相连，使睡眠剥夺时，可以同时检测果蝇的活动情况。

图 7. 检测板放置图

- 4.3 先接通混合仪电源，再接通单片机和继电器控制模块电源，睡眠剥夺实验即可开始。(例如 8:00 a.m.开始，12 h 光照/12 h 黑暗的环境下，进行整夜睡眠剥夺。先进行两天的 12 h 光照/12 h 黑暗检测，在第三天 20:00 p.m.将检测板放入混合仪中固定，启动震荡系统后，于第四天 8:00 a.m.结束震荡，将检测板放回培养箱中，连接数据收集系统，继续检测果蝇的活动情况。)
5. 果蝇睡眠剥夺数据分析
DAMSystem 生成的数据为 txt 格式文件，可以被多种分析软件读取。参见网址：www.trikinetics.com/或本书中“高通量分析果蝇睡眠的实验方法”。本章节作者使用 Matlab 和 Excel 宏命令处理，可以联系作者通讯地址获取。

溶液配方

1. 睡眠监测期间果蝇食物
琼脂粉 4.5 g
蔗糖 15 g
丙酸 1.85 ml

双蒸水 300 ml

致谢

感谢天猫商城 **telesky** 旗舰店、淘宝商城海森豪电子网络营销部，他们同意无偿公开产品部分技术说明，方便读者使用与参考。感谢童华威师兄在系统建立之初给予的帮助和指导。感谢国家自然科学基金项目 (31471031) 的支持。