果蝇脂肪组织耗氧率测定

Determination of Oxygen Consumption Rate of Adipose Tissue in *Drosophila*

丁隆，黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所，北京

*通讯作者邮箱: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式：丁隆，黄勋. (2019). 果蝇脂肪组织耗氧率测定. *Bio-101* e1010299. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010299.

How to cite: Ding, L. and Huang, X. (2019). Determination of oxygen consumption rate of adipose tissue in *Drosophila*. *Bio-101* e1010299. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010299. (in Chinese)

摘要：脂肪组织作为能量调节的重要组织，其氧耗速率可以间接反映代谢状态。本实验利用药物处理结合呼吸追踪指示脂肪组织的线粒体代谢状态 (Ding 等, 2018)。我们反复试验发现，果蝇幼虫脂肪组织对解偶联剂 FCCP 几乎没有响应，因此将检测程序简化为一步处理，只检测“基础呼吸水平”和“非线粒体呼吸水平”。

关键词：耗氧率，果蝇，脂肪组织，线粒体，Seahorse

材料与试剂

1. 果蝇幼虫
2. Schneider's Medium (Gibco, catalog number: 10902-088)
3. 丙酮酸钠
4. NaOH
5. Antimycin A (Sigma)
6. Rotenone (Sigma)
7. Assay Medium (AM) (见溶液配方)
8. Antimycin A/Rotenone 混合溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)
2. 胰岛板 (Seahorse Bioscience)

3. 探针板 (Seahorse Bioscience)
4. 水化板 (Seahorse Bioscience)
5. CO₂ 培养箱

实验步骤

1. 实验前将探针板扣于水化板 (如图 1, 每孔含 500 μ l 校准液), 置于预处理工作站 37 $^{\circ}$ C 无 CO₂ 培养箱中水化孵育过夜。

图 1. 探针板水化图示. 上部所示为 24 孔探针板, 下部所示为探针板扣于水化板后的完整结构。

2. 实验当天, 在 Assay Medium (AM) (溶液配方 1) 中解剖幼虫 (L3) 脂肪组织, 将解剖出来的组织置于胰岛板样孔 (盛有 500 μ l AM), 用迷你网筛将组织固定在样孔底部。建议每孔盛放不少于 3 只幼虫的组织。由于成虫脂肪组织解剖难度太大, 从解剖收集样品到上机步骤间耗时过长, 这样可能会影响组织活度, 因此不建议用成虫脂肪组织进行该实验。
3. 用 AM 配制 Antimycin A/Rotenone 混合溶液 (溶液配方 2)。以每 56 μ l/孔将混合溶液加入加药孔中, 保证最终每孔给药浓度为 12 μ M Antimycin A 和 3 μ M Rotenone。
4. 将探针板置于盛有样品的胰岛板之上, 进 Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer 进行呼吸监测, 全程在室温进行, 整体上机监测时长不宜超过 120 分钟。
5. 呼吸监测完毕后将胰岛板取出, 每个样孔里的组织独立回收进行 Bradford 蛋白含量测定。最终的相对耗氧率用呼吸指数除以该样品所含蛋白量表示。其中, 在加药

前所得曲线为“基础呼吸水平”，加药后所得稳定曲线值为“非线粒体呼吸水平”。

溶液配方

1. Assay Medium

Schneider's Medium 加入 2 mM 丙酮酸钠配制，用 NaOH 调 pH 至 6.5~6.8

2. Antimycin A/Rotenone 混合溶液

949 μ l AM

48 μ l 2.5 mM Antimycin A

3 μ l 10 mM Rotenone

参考文献

1. Ding, L., Yang, X., Tian, H., Liang, J., Zhang, F., Wang, G., Wang, Y., Ding, M., Shui, G. and Huang, X. (2018). [Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism](#). *EMBO J* 37(17).