果蝇血细胞流式分析及敲除方法

The *Drosophila* Hemocytes Ablation Method and Flow Detection Assay

俞珺璟¹, 潘磊^{2,*}

¹细胞分析技术平台, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海; ²中国科学院上海巴斯德研究所, 上海

*通讯作者邮箱: panlei@ips.ac.cn

引用格式: 俞珺璟, 潘磊. (2019). 果蝇血细胞流式分析及敲除方法. *Bio-101* e1010322. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010322.

How to cite: Yu, J. J. and Pan, L. (2019). The *Drosophila* Hemocytes Ablation Method and Flow Detection Assay. *Bio-101* e1010322. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010322. (in Chinese)

摘要:果蝇作为经典的模式动物, 拥有其他生物无法比拟的遗传学操作优势。除此之外, 伴随着生物学技术的发展, 如何将现代生物学技术和传统的遗传操作相结合, 可能是果蝇这种模式生物迎来新发展的契机。这里我们以果蝇血液系统为例, 结合血细胞特异性表达的 UAS-GAL4 遗传系统, 描述如何利用流式细胞术分析果蝇的外周血。

关键词:果蝇, 血细胞, 流式细胞术

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 40 μ m 滤膜 (Falcon, catalog number: 352340)
3. 5 ml 流式管 (Falcon, catalog number: 352008)
4. 35 mm 培养皿 (Falcon, catalog number: 353001)
5. 三龄幼虫 (Third instar wandering larvae)
6. 果蝇: *he-gal4*, *UAS-GFP* (Bloomington 8700), *UAS-reaper* (DGRC 108-447)
7. DAPI (Sigma-Aldrich, catalog number: D9542)
8. Na_2HPO_4
9. NaCl
10. KCl
11. KH_2PO_4

12. Protease inhibitors cocktail (Roche, catalog number: REF04693116001)
13. PBS (见溶液配方)
14. 解剖液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 体视镜 (Leica, S6)
2. 解剖镊 (FST by Dumont Biology SWITZERLAND, #5)
3. 流式细胞分析仪 (BD LSRFortessa)

实验步骤

1. 收集 *he-gal4*, *UAS-GFP* 纯合子的处女蝇, 与 *UAS-reaper* 纯合子或者对照组果蝇 *w¹¹¹⁸* 交配。

注: 父母本果蝇必须是纯合子, 后续检测子代血细胞是采用三龄幼虫, 无 marker 可供筛选。

2. 收取子代三龄幼虫 50 个用于血细胞的检测, 基因型分别为: 对照组 *+/+*, *he-gal4*, *UAS-GFP/+*, 血细胞敲除组 *UAS-reaper/+*, *he-gal4*, *UAS-GFP/+*。

注: 收集三龄幼虫是指已经爬到饲养管管壁上的幼虫, 不能年龄太小 (血液系统还没发育成熟), 也不能年龄太大 (如果处于 *larva-pupa transition* 时期的话, 体腔内的脂肪细胞会干扰流式分析), 如图 1 所示:

图 1. 解剖用三龄幼虫

3. 将收集的果蝇放在 35 mm 的培养皿中，加入 2 ml 冰浴的 PBS 进行清洗，用枪头吸取废液后再次清洗，总计 6 次，目的是将幼虫体表的食物清洗干净，避免在流式检测中产生过多的背景信号。
4. 清洗干净后的幼虫至于冰浴的解剖皿中，加入 200 μ l 解剖液，用解剖镊轻轻撕开幼虫表皮，可见体腔中液体的流出，将 20 个幼虫解剖完毕后，吸取收集解剖皿中的液体至 1.5 ml 离心管中，800 $\times$ g 离心 3 分钟，弃上清，用 200 μ l 解剖液重悬血细胞。
5. 用 BD LSRFortessa 流式细胞分析仪检测果蝇血细胞以及表达凋亡基因后血细胞敲除情况。

注：上机前所有样品均过 40 μ m 的细胞滤膜。上机前以 1:2,000 比例每个样品中加入 DAPI 用于区分死活细胞，并将样品转移到流式管中进行上机检测。因所有的血细胞都用 GFP 进行了特异性的标记，因此上机选用的 panel 如下：DAPI：405 激发，450/50 发射；GFP：488 激发，530/30 发射。

结果与分析

果蝇的血液系统包含三种细胞：plasmatocytes, crystal cells 和 lamellocytes。其中在成熟的三龄幼虫血液体系中，plasmatocytes 占比达 90~95%，主要行使着吞噬的功能已达到去除死细胞以及外源病原菌的作用 (Lemaitre 和 Hoffmann, 2007)。因此，果蝇的血细胞类似于哺乳动物的巨噬细胞。除了吞噬功能以外，在免疫刺激后血细胞也会产生抗菌肽，起到系统免疫的作用。在我们的实验中，我们使用血细胞特异性表达的 UAS-GAL4 系统，利用 *he-gal4* 在血细胞中特异性表达凋亡基因 *reaper*，通过流式细胞术进行检测，这将是较为直观的检测果蝇血细胞的方法之一 (Yang 等, 2019)。

首先，通过前向 (FSC) 和侧向 (SSC)，圈出果蝇血细胞的范围 (图 2)。再根据我们采用的血细胞特异性表达 GFP 绿色荧光蛋白的表达水平检测果蝇的血细胞情况 (图 3A)。同时在血细胞中表达凋亡基因 *reaper*，可以特异性地敲除血细胞 (图 3B)。我们可以利用该技术手段有效地检测果蝇中血细胞的含量。在血细胞中特异性表达凋亡基因后 DAPI 阳性的细胞也随之增高，血细胞数量减少。

图 2. 通过前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 圈出果蝇血细胞的范围

图 3. 在血细胞中特异性表达凋亡基因 **reaper** 后，可有效敲除血细胞

溶液配方

1. PBS

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

溶于 1 L ddH₂O 中

调 pH 值为 7.2~7.4

灭菌

4 °C 保存

2. 解剖液

Protease inhibitors cocktail (Roche) 1 片溶于 1 ml 无菌 ddH₂O 中

放置于-20 °C 保存，此为 50× 母液

在需要解剖的时候，将 50× 母液溶于 PBS 中，制备成含有 1× Protease inhibitors cocktail PBS 缓冲液。例如：980 μl PBS + 20 μl PI，混合成 1 ml 的解剖液

致谢

感谢潘磊实验室以及中科院生化细胞所细胞分析技术平台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)、(31670909-俞璟璟)和中国科学院青年创新促进会优秀会员 (潘磊) 的支持。本文实验方案改编自本实验室发表文章 (Yang 等, 2019)。

参考文献

1. Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). [The host defense of *Drosophila melanogaster*](#). *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.
2. Yang, S., Zhao, Y., Yu, J., Fan, Z., Gong, S., Tang, H. and Pan, L. (2019). [Sugar alcohols of polyol pathway serve as alarmins to mediate the local-systemic innate immune communication](#). *Cell Host Microbe* 26 (2):240-251.e8.