

产卵用果蝇准备

Preparation of the Flies

徐龙梅[#], 沈妍[#], 吴薇^{*}

果蝇资源与技术平台, 分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院, 上海

*通讯作者邮箱: wuwei@sibcb.ac.cn

[#]Contributed equally to this work

引用格式: 徐龙梅, 沈妍, 吴薇. (2023). 产卵用果蝇准备. *Bio-101* e1010975. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010975.

How to cite: Xu, L. M., Shen, Y. and Wu, W. (2023). Preparation of the Flies. *Bio-101* e1010975. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010975. (in Chinese)

摘要: 产卵用果蝇准备是所有以果蝇卵为实验材料的基础, 包括果蝇胚胎显微注射、胚胎 DNA 及 RNA 提取、胚胎期实验观察、利用胚胎进行药物筛选和毒理实验等。本文系统讲述产卵用果蝇的准备方法, 为各类以果蝇卵为实验材料的实验提供果蝇培养指南。

关键词: 果蝇培养, 果蝇杂交, 果蝇产卵

材料与试剂

1. 标签纸 3M (3M 中国有限公司, 3M, 货号:244)
2. 废果蝇收集瓶 (自制, 见图 1)
3. 分蝇笔 (自制, 见图 2)
4. 无尘纸 (金佰利 (中国) 有限公司, Kimtech, 货号:34155)
5. 果蝇培养管 (海门市爱科特实验器材经营部)
6. 果蝇培养管塞 (海门市爱科特实验器材经营部)
7. 果蝇培养管置放盘 (海门市爱科特实验器材经营部)
8. 果蝇培养瓶 (海门市爱科特实验器材经营部)
9. 果蝇培养瓶塞 (海门市爱科特实验器材经营部)
10. 果蝇培养瓶置放盘 (海门市爱科特实验器材经营部)
11. 玉米粉 (黑龙江北纯农产品开发有限公司, 北纯)

12. 大豆粉（黑龙江北纯农产品开发有限公司，北纯）
13. 蔗糖（白砂糖）（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号:10021463）
14. 麦芽糖（上海畅硕生物科技有限公司，畅硕）
15. 高活性干酵母（高糖型）（英联马利（北京）食品销售有限公司，梅山）
16. 琼脂粉（上海益启生物科技有限公司，Sigma，货号:A1296-1KG）
17. 对羟基苯甲酸甲酯（也称尼泊金甲酯）（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：30119416）
18. 苯甲酸钠（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：30164817）
19. 丙酸（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：81011918）
20. 无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：10009218）

仪器设备

1. CO₂ 钢瓶（上海纵远化工有限公司）
2. CO₂ 麻醉台（海门市优嘉实验器材经营部）
3. 可倾式夹层电加热油锅（温州正发减速机械厂，100L）
4. 培养基分装器（海门市优嘉实验器材经营部）
5. 恒温恒湿培养箱（宁波江南仪器厂，型号：HWS-500）
6. 电热恒温鼓风干燥箱（上海齐欣科学仪器有限公司，型号：DGG-9240A）
7. 体视显微镜（Olympus 生物显微镜公司，型号：Olympus SZ61）
8. 海尔电冰柜（海尔集团，海尔，型号：BC/BD-220SE）

实验步骤

一、果蝇培养基配制

1. 果蝇培养基原料种类：玉米粉，大豆粉，蔗糖（白砂糖），麦芽糖，高活性干酵母（高糖型），琼脂粉，防腐剂（对羟基苯甲酸甲酯也称尼泊金甲酯、苯甲酸钠、丙酸等），所有原料均需妥善保管，有条件都 4 °C 冷藏。
2. 果蝇培养基配方：名称：玉米粉果蝇培养基，成分如下表，防腐剂特殊实验可不加。

玉米粉果蝇培养基（总体积 1L）	
成分名称	质量（克/g）
玉米粉	66.825
大豆粉	9.18
蔗糖（白砂糖）	40
麦芽糖	42.4（用 125 mL 水化开后加入）
酵母	25
琼脂粉	6
防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯也称尼泊金甲酯)	0.25（用 2.5 mL 95%乙醇溶解后加入）
防腐剂（苯甲酸钠）	1
防腐剂（丙酸）	6.875 mL（温度降至 60℃-70℃加入）

3. 大量培养基配制方法：煮沸法（60 L）

- 先在可倾式夹层电加热油锅中加 15L（总量的 1/4）的水，边搅拌边加热。
- 按配方称取玉米粉、大豆粉、蔗糖、麦芽糖、琼脂粉等原材料用冷水搅拌均匀加入锅中。
- 按配方称取干酵母粉用 25 °C 到 30 °C 温水混匀活化 15 min 后加入锅中。
- 加水到总体积为 60L，边搅拌边加热，煮沸后保持沸腾状态 20 分钟，关火降温。
- 培养基温度降到 60℃-70℃时添加防腐剂，搅拌均匀。
- 用培养基分装器分装。常规杂交实验培养基量为培养容器体积的 1/5，保种实验培养基量为培养容器体积的 3/10。
- 分装好后用透气袋包装放在阴凉通风处降温冷凝，散发水汽 12-16h。
- 晾好后换成不透气保鲜袋包装保鲜，4℃冷藏。
- 在 2-3 周内用完。

二、果蝇鉴定

只有鉴定正确的果蝇才能用于扩繁收卵。

1. 明确基因型
2. 根据基因型在体视显微镜下观察其本身特征和平衡子（balancers）
3. PCR 检测突变基因

三、果蝇培养

对于胚胎收集用果蝇，我们需要在尽可能短的时间内收集到足够数量的果蝇用于实验，且必须保证质量。果蝇的成熟度对产卵来说非常重要，要严格控制温湿度，并用标签纸标记好基因型和日期。产卵率低的果蝇品系需要准备更大的量。胚胎期、幼虫期及成虫期有致死的果蝇一般难以获得大量果蝇，导致不能在短期内（30 min）收集到足够的卵，不适合用于显微注射用胚胎收集。

正常用于胚胎收集的果蝇品系仅一种，采用以下培养方法（3.1-3.5）。

1. 将果蝇转入果蝇管，在 25 °C 和 60%相对湿度下培养。若果蝇较多可以直接放在果蝇瓶培养。每个果蝇管 15-20 只，果蝇瓶 50-80 只。
2. 培养 2 d 后将果蝇转到新管（瓶），纯种（单基因型）果蝇正常不经麻醉直接更换培养基。轻扣亲代老管将果蝇收集到底部，迅速拔掉瓶塞，将装培养基新管（瓶）口对口倒置于老瓶上，翻转，轻扣老管（瓶）将果蝇转到新管（瓶）中，快速塞好塞子。
3. 转管（瓶）2-3 次后将管（瓶）中亲代老果蝇清空。
4. 出 F1 代成虫后重复步骤 1-3，继续扩繁一代，就能得到足够用于产卵的果蝇。
5. 收集羽化 48h 的果蝇约 1500-2000 只，分装于 6 个果蝇瓶内备用。

有些显微注射实验中，需要使用两个果蝇品系杂交后产的卵。例如 **attp** 果蝇品系和 **phic31** 果蝇品系，**attp** 有很多个不同位点的果蝇品系，而与之配对的 **phic31** 果蝇品系仅一个。就扩繁 **attp** 果蝇选取雄蝇，扩繁双倍的 **phic31** 果蝇选取处女蝇，使用前两天按 1: 2 比例混合，接近 1: 1 更好。

6. 按步骤 3.1-3.4 分别将用于选取雄蝇品系和用于选取处女蝇品系扩繁到合适数量，选取雄蝇品系 3-4 个大瓶，选取处女蝇品系 6-8 个大瓶。
7. 选取羽化 48 h 内雄蝇 750-1000 只。理论上杂交所需的雄蝇可以随时收集，但它们在 3 天或老一点时与处女蝇交配最有效，大于 10-15 d 的雄蝇没有交配能力了。

8. 选取处女蝇 750-1000 只。理论上 25 °C 条件下，新羽化 8 小时内雌蝇不会与雄蝇交配，都可以视为处女蝇。但由于人工控温的多变性和不均衡性，采用这个方法会误判。最精确的方法是查看胎粪，在处女蝇透明腹部能看到黑点，这就是明显胎粪。用 CO₂ 麻醉果蝇，然后置于 CO₂ 麻醉台上认真挑选。挑选后置放 48 h，看有无幼虫发育，若没有幼虫在培养基中蠕动，才能保证你的果蝇是处女蝇。处女蝇挑选在早晨和之后的 8 小时内比较容易得到。早晨是大多数蛹羽化成成虫的时候（培养箱按昼夜规律照明），这是昼夜规律决定。低温条件使果蝇发育显著减慢，为了能在早晨收集更多处女蝇，在头一天收集完后，将果蝇置于 18 °C 过夜。对于很多杂交，为了控制非处女蝇的出现，可以使用“处女标记”——雌蝇带有的纯合隐性突变标记，在杂交后变为杂合体。如果子代带有这一标记，它们就不是处女蝇的后代。尽管果蝇羽化成成虫性别比例为 1: 1，但每天收集的果蝇并不一定如此。雌蝇比雄蝇发育快，故在最初出生的新蝇中雌蝇比例高，所以在羽化早期能得到更多处女蝇。根据果蝇生活史，一般周五开始做杂交，子代将在 10 天后也就是下周一羽化。这样可以比较轻松在 3-4 d 收集足够的处女蝇和雄蝇。
9. 将选取的雄蝇和处女蝇在注射前两天混合交配。

自制实验用具制备方法

1. 废果蝇收集瓶制备：漏斗，500 mL 塑料瓶，75%酒精
2. 在 500 mL 塑料瓶中加入 75%酒精 100 mL，将漏斗架于瓶口，成品见图 1。



图 1. 废果蝇收集瓶.

3. 分蝇笔制备：一次性移液管，3M 标签纸，鸭右翅硬杆毛

将鸭右翅硬杆毛插入一次性移液管，用 3M 标签纸缠绕封住，成品见图 2。



图 2. 分蝇笔.

致谢

感谢中华人民共和国科学技术部 2021YFA0805800 和中国科学院的支持。

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心公共技术中心果蝇资源与技术平台的工作和经费支持。

参考文献

1. 吴薇. (2018). 果蝇实验室筹建和规范化管理研究. 安徽农学通报, 27 (18) : 147-148.
2. Ralph J. (1997). Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.