

果蝇胚胎显微注射

The Microinjection of *Drosophila*'s Embryos

邵素娟[#], 谭霜霜[#], 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: 邵素娟, 谭霜霜, 沈妍, 吴薇. (2022). 果蝇胚胎显微注射. *Bio-101* e1010976. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010976.

How to cite: Shao, M. J., Tan, S. S., Shen, Y. and Wu, W. (2022). The Microinjection of *Drosophila*'s Embryos. *Bio-101* e1010976. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010976. (in Chinese)

摘要: 果蝇胚胎显微注射,是在高倍倒置显微镜下,利用显微操作器(Micromanipulator),控制显微注射针在显微镜视野内移动,将外源 DNA、RNA、染料、药物等注射到果蝇胚胎中的一种技术。本文系统讲述果蝇胚胎显微注射的方法和注意事项。

关键词: 果蝇, 胚胎, 显微注射

材料与试剂

1. 显微注射用果蝇 (中国科学院分子细胞科学卓越创新中心果蝇资源与技术平台提供)
2. 果蝇胚胎收集笼 (Genesee Scientific, Genesee Scientific 科技公司, Genesee# 59-101)
3. 胚胎收集器 (Corning 公司, FALCON, REF352350, 70 μ m, Nylon)
4. 84 消毒液 (江苏爱特福 84 股份有限公司, 爱特福) 遮光布
5. 载玻片 (SAIL BRAND (帆船牌), cataog number: 7105)
6. 双面胶 (3M 中国有限公司, Scotch, Cat.665)
7. 无尘纸 (金佰利 (中国) 有限公司, Kimtech, 货号: 34155)
8. 手术剪 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 生工, F519231-0001)
9. 滚轮

10. 计时器

11. 毛细管（FHC，30-30-0, Borosil 1.0mmx0.75mm ID）

12. 装针盘（自制，见图 1）



图 1. 装针盘.

13. 排卵笔（自制，见图 2）

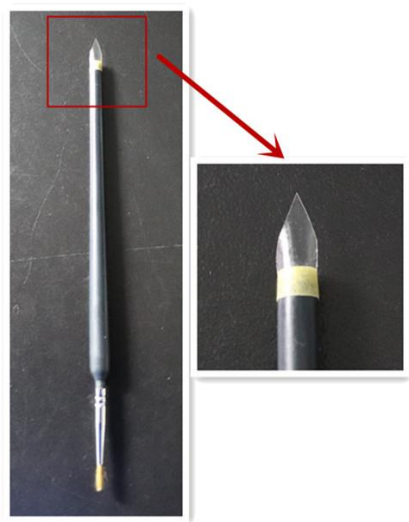


图 2. 排卵笔.

14. 矿物油（Sigma Halocarbon oil 27 H8773-100ML，Sigma Halocarbon oil 700 H8898-100ML）

15. 双蒸水

16. 培养基板（见溶液配方）

17. 葡萄汁板（见溶液配方）
18. 玉米粉（黑龙江北纯农产品开发有限公司，北纯）
19. 大豆粉（黑龙江北纯农产品开发有限公司，北纯）
20. 蔗糖（白砂糖）（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号:10021463）
21. 麦芽糖（上海畅硕生物科技有限公司，畅硕）
22. 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）
23. 琼脂粉（上海益启生物科技有限公司，Sigma，货号:A1296-1KG）
24. 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）
25. 苯甲酸钠（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：30164817）
26. 丙酸（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：81011918）
27. 无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，沪试，货号：10009218）
28. 葡萄汁（味全食品工业股份有限公司，味全）
29. 90 cm 培养皿：（上海泰坦科技股份有限公司，Titan/泰坦，货号：02036583）

仪器设备

1. 微量加样器（艾本德中国有限公司，Eppendorf，2027-08）
2. 移液器（艾本德中国有限公司，Eppendorf 或法国吉尔森公司，Gilson）
3. 昆虫解剖针（塑料柄）：（泰州市思齐教学仪器有限公司，思齐，JPZZ，长 14.5 cm，针尖直径 0.1 mm）
4. 恒温恒湿培养箱（宁波江南仪器厂，HWS-500）
5. 体视显微镜（Olympus 生物显微镜公司，Olympus，SZ61）
6. 微波炉（广东格兰仕微波生活电器制造有限公司，格兰仕，P70F23P-G5(S0)）
7. 拉针仪（Sutter，美国 sutter 公司，P-97）
8. 磨针仪（日本成茂公司，Narishige EG-401）
9. 煅针仪（日本成茂公司，Narishige MF-830）
10. 倒置相差显微镜（Nikon 生物显微镜公司，Nikon，型号：TS-100）
11. 显微操作臂（日本成茂公司，Narishige MN-151 14075）
12. 油压泵（日本成茂公司，Narishige IM-9B）

实验步骤

实验步骤（见图 3）

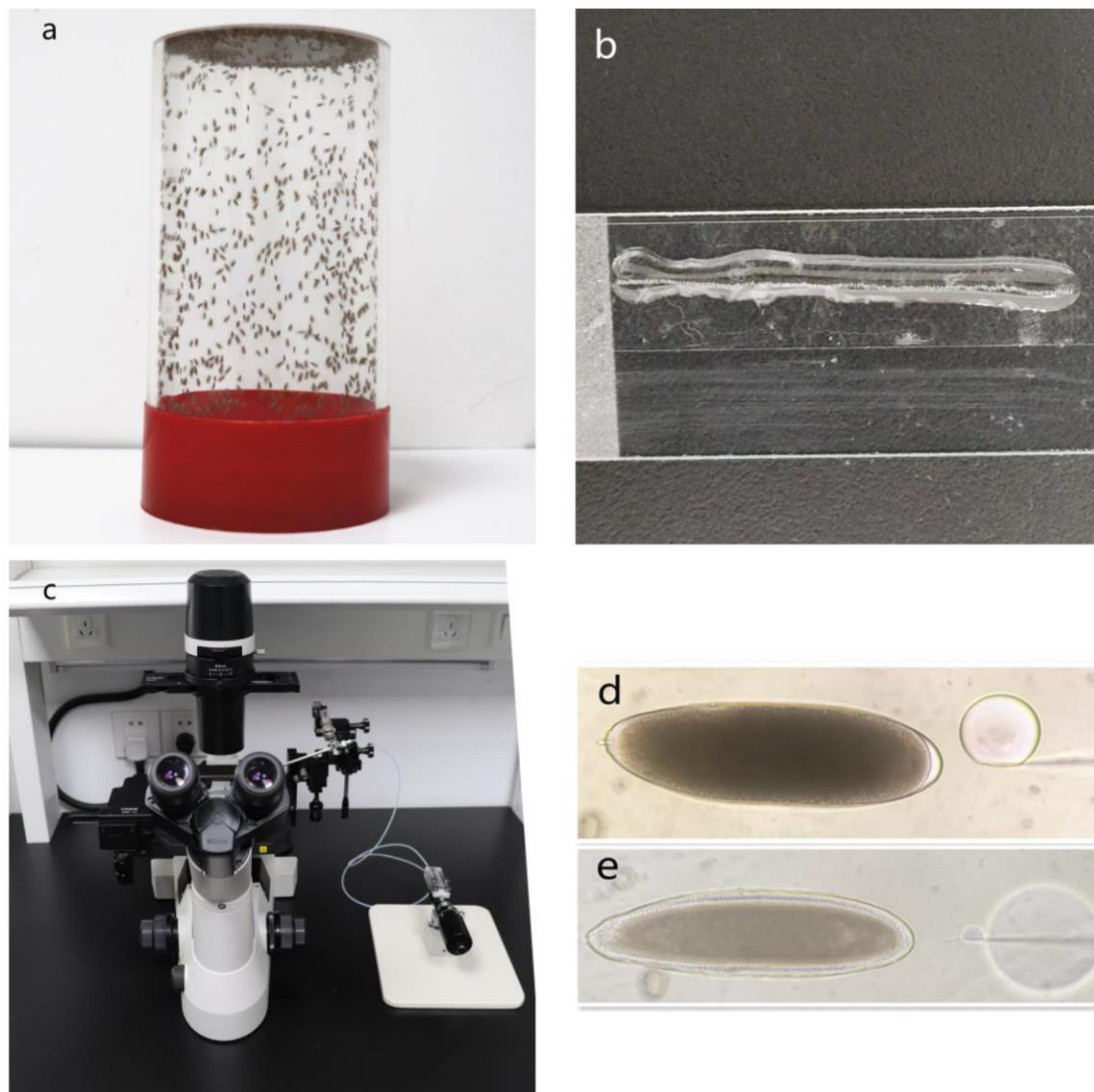


图 3. 显微注射过程（a）产卵；（b）排卵；（c）注射；（d）未分化卵；（e）分化卵

一、注射用样品准备

将需要注射的 DNA、RNA、染料、药物等 14,000 rcf, 4 °C, 离心 20 min, 取上层液体备用。

二、注射针准备

1. 拉针。使用 sutter P-97 拉针仪，设置参数：HEAT:527 °C；PULL: 100；VELOCITY:71；TIME:200。

2. 磨针。使用磨针仪，将拉好的针装在磨针仪的固定臂上，设置角度为 30 度，在湿润的砂盘上磨 1 分钟，将针尖磨开口。
3. 煅针。将磨好的针装在煅针仪上，加热熔化针尖周边的毛刺。煅针后将针放在装针盘中备用。
4. 上样。用加样器吸取 2 μ L 样品装入注射针中。针尖朝下，垂直静置备用。

三、排卵

1. 为使受精卵发育减缓，显微注射操作都在 18 °C 低温条件下进行。
2. 排卵载玻片准备：将载玻片横向放置，左侧写背景果蝇名称，将双面胶粘贴于载玻片上侧，用滚轮压平后备用。
3. 排卵笔准备：剪小块双面胶粘贴于毛笔的无毛端，剪成楔形，固定备用(见图 2)。
4. 排卵：将用 84 消毒液脱壳后的胚胎轻轻刷在载玻片双面胶的下方（方法详见《Bio101 果蝇胚胎收集和脱壳处理》），均匀分布。在显微镜下用无尘纸将水吸干，开始排卵，用计时器计时。
5. 在显微镜下，用排卵笔将胚胎均匀排列于双面胶中间，排成一行。选优质胚胎，排卵时，胚胎后端朝上，竖直排列，胚胎之间间隔 1/8 胚胎宽。注意卵的干湿度，时间一般控制在 15 分钟左右，排完后适当干燥，滴上矿物油备用。

四、注射

1. 装针。油压装置装满油后，加大油压，直至显微操作臂内油连续流出，确保操作臂中没有空气。将油压往回调，油退回到操作臂的 2/3 处，将上好样的针装入操作臂中。将 x,y,z 轴分别调节到 0 位。将显微镜物镜倍数调至 20x，将针尖对准显微镜物镜的中心，然后调节三个方向轴，确定针的位置，针与水平面之间的角度在 30 度到 45 度之间最佳。将显微镜物镜调至 4x，在目镜观察下调节三轴位置，将针尖调整到视野的正中间位置，针尖往上调 1cm。把排好胚胎的载玻片放在载物台上（胚胎后端朝向针），在显微镜下将载玻片的右侧边线调清晰，将载玻片向左退出中心位置，缓慢将针往下调，直至同时看清载玻片和注射针为止。调节物镜至 20 倍，在目镜观测下调节 xy 轴，直至看清针尖和载玻片。抬高注射针，将第一个胚胎移动到视野中心，缓慢下调注射针，直至同时看清显微注射针和胚胎。准备注射。

2. 注射。加大油压，直至看到注射针中有注射液流出，移动载玻片，使针扎入胚胎尾端 1/4 处，停留片刻，看到注射液流入胚胎中，能明显看到细胞质稀释。迅速退出胚胎。完成第一个胚胎的注射。重复以上操作，直至注射完载玻片上所有胚胎。针退出时如果胚胎流出大量细胞质，说明流速太快，需要调小油压，直到不流出细胞质为止。为提高显微注射成功率，注射时选取未分化胚胎（见图 3d），已分化胚胎（见图 3e）或畸形胚胎或前端朝右的胚胎需要将其戳破致死，减少后续阳性筛选工作量。

五、注射后的处理

显微注射后，将胚胎平放在装有不见明水的湿盒中（见图 4），于 18 °C 条件下培养 36 h 后，胚胎发育成幼虫（见图 5），将幼虫转移到粉碎的培养基中，25 °C 培养。每个培养基指管中放入 70-90 条幼虫为佳。



图 4 注射后胚胎培养



图 5 注射后胚胎出幼虫

注意事项

1. 背景果蝇中雌雄果蝇的数量比维持在 1: 1 左右。
2. 果汁板使用前从低温取出放置至室温方可使用。
3. 排卵时，严格控制胚胎的干燥时间。干燥时间过短，胚胎太湿，注射时会爆裂，死亡率升高；干燥时间过长，胚胎太干，注射后死亡率也会升高。
4. 不同的拉针仪和毛细管性能不同，需要根据实际情况摸索，设置合理参数。
5. 注射后胚胎培养温度控制在 18°C 左右，温度偏高不利于伤口愈合，温度偏低胚胎发

育太慢，死亡率升高。

6. 控制每管培养基中幼虫数量。幼虫太少，液化差，羽化率降低；幼虫太多，液化太好，培养基过湿，羽化率也会降低。

溶液配方

1. 果蝇培养基板配制：

- a. 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。
- b. 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 125mL 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 2.5mL 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）

c. 小量培养基配制方法：煮沸法（500 mL）

- 1) 按配方称取玉米粉、大豆粉、蔗糖、麦芽糖、酵母、琼脂粉放到烧杯中，加水至 500 mL，搅拌混匀，放入微波炉加热。
- 2) 中间需要搅拌混匀 2-3 次，防止玉米粉等糊底，彻底煮沸后反复沸腾 2-3 次。
- 3) 培养基温度降到 60℃-70℃时添加防腐剂，搅拌均匀。

- 4) 用培养皿分装，15mL/皿。
- 5) 盖好盖子，待冷却凝固后 4℃冷藏备用。
- 6) 在 2-3 周内用完。

2. 葡萄汁板配制

水 150 mL，葡萄汁 150 mL，蔗糖 4.8 g，琼脂粉 6.8 g。

- a. 先在烧杯里加 150 mL 水，加入 6.8 g 琼脂粉，放微波炉加热。
- b. 煮沸后搅拌均匀，再煮沸，重复 3 次
- c. 加入蔗糖煮沸
- d. 加入 150 mL 葡萄汁，煮沸
- e. 用培养皿分装，15 mL/皿
- f. 盖好盖子，待冷却凝固后 4℃冷藏备用
- g. 尽量在两周内用完

3. 矿物油配制

用试管先量取适量 Sigma Halocarbon oil 700，然后加入等体积 Sigma Halocarbon oil 27，彻底混匀后备用。

自制实验用具制备方法

1. 装针盘制备：电泳盘，滤纸，双面胶

将滤纸剪成和电泳盘直径一致的圆形，在 1/3 处折叠成 1 cm 高度的山脊，间隔 0.5cm 剪成尖底漏斗状，用双面胶将滤纸固定于电泳盘上，成品见图 1。

2. 排卵笔制备：毛笔，双面胶

剪小块双面胶粘贴于毛笔的无毛端，剪成楔形，成品见图 2。

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. (2016). [果蝇显微注射系统优化的研究](#). 生物技术世界, 6: 11-12.
2. Christian Dahmann. (2008). [Drosophila Methods and Protocols](#). Humana Press.