

实验用果蝇的饲养及管理

Guidance for *Drosophila* Culture and Management

王霞^{1,2}, 沈达¹, 乔欢欢¹, 孙锦¹, 徐荣刚¹, 刘清飞³, 倪建泉^{1,4,*}

¹清华大学医学院, 北京; ²北京大学生命科学学院, 北京; ³清华大学药学院, 北京; ⁴同济大学青岛高等研究院, 青岛

*通讯作者邮箱: nijq@mail.tsinghua.edu.cn

引用格式: 王霞, 沈达, 乔欢欢, 孙锦, 徐荣刚, 刘清飞, 倪建泉. (2019). 实验用果蝇的饲养及管理. *Bio-101* e1010250. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010250.

How to cite: Wang, X., Shen, D., Qiao, H. H., Sun, J., Xu, R. G., Liu, Q. F. and Ni, J. Q. (2019). Guidance for *Drosophila* culture and management. *Bio-101* e1010250. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010250. (in Chinese)

摘要: 本文介绍了实验用果蝇的日常饲养方法, 以及品系保存及管理方法。

背景: 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是生物医学研究领域使用最广泛的模式动物之一。在遗传学、发育生物学、神经生物学等方面的许多重要突破都是首先在果蝇中发现, 然后再应用到其他物种的。标准的饲养条件是保证实验可靠性、重复性的必要条件。本文结合清华大学果蝇中心建立十年来果蝇饲养和大规模果蝇资源平台运行的经验, 介绍了实验用果蝇的日常饲养及管理的基本方法和一些注意事项。

关键词: 果蝇, 日常饲养, 遗传杂交, 批量管理

材料与试剂

1. 10 × 10 格托盘 (济南佳硕)
2. 5 × 5 格托盘 (济南佳硕)
3. 一次性培养皿 (海门市中泰实验器材厂)
4. 纱布
5. 乳胶海绵塞 (两种规格, 定制, 济南佳硕)
6. 羽毛
7. 记号笔
8. 小块软垫 (如鼠标垫)

9. 二氧化碳 (北京环宇京辉京城气体)
10. 水
11. 玉米面 (济南佳硕)
12. 白砂糖 (广西凤糖生化, 一级)
13. 红糖 (广西凤糖生化, 一级)
14. 琼脂 (北京科百奥, 强度 > 1,300 g/cm²)
15. 高活性干酵母粉 (安琪, 500 g)
16. 抗生素 (Methylparaben) (AMRESCO, catalog number: 1285C131)
17. 丙酸 (上海沪试)
18. 无水乙醇 (上海沪试)
19. 糖浆 (山东东虎, 不含添加剂)
20. 葡萄汁 (食品用, 不含添加剂)
21. 碘伏 (医用)
22. 石蜡油 (国药集团)
23. 抗生素母液 (见溶液配方)
24. 果蝇培养基 (见溶液配方)
25. 废弃果蝇处理液 (见溶液配方)
26. 显微注射卵收集培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 果蝇管 (海门市中泰实验器材厂)
2. 果蝇瓶 (海门市中泰实验器材厂)
3. 注射用果蝇培养瓶 (定制)
4. 量筒
5. 玻璃棒
6. 大烧杯 (5 L)
7. 镊子或剪刀夹
8. 锥形瓶
9. 二氧化碳钢瓶 (北京环宇京辉京城气体)

10. 二氧化碳管道
11. 通气板
12. 二氧化碳枪
13. 电饭锅 (三角牌, model: 19.0 L)
14. 10 × 10 食物分装器 (定制)
15. 5 × 5 食物分装器 (定制)
16. 恒温恒湿培养箱 (宁波莱福, models: PQX-450A-3H, PQX-800A-3H)
17. 高压灭菌锅 (三洋, model: MLS-3780)
18. 冷藏柜 (三洋, model: MPR-1411)
19. 冷冻柜 (海尔, model: BC/BD-319HB)
20. 体视显微镜 (Olympus, model: SZX10)
21. 加湿器 (亚都, model: YC-D205)
22. 除湿机 (川京, model: XH-56L)
23. 微波炉
24. 热空气消毒箱 (上海博迅, model: GR-420)
25. -80 °C 冰箱
26. 水浴锅

软件

1. Filemaker
2. Microsoft Office

实验步骤

一、日常果蝇饲养与操作

1. 果蝇引种与检疫

- 1.1 实验用果蝇品系可从世界上各个大型果蝇中心 (如 清华大学果蝇中心、美国 BDSC、日本 NIG、奥地利 VDRC 等) 订购, 也可来自其他兄弟实验室。需保证遗传背景清楚、基因型明确、无微生物污染 (螨虫、细菌、霉菌等)。收到新品系后, 首先检查其生长状况, 包括成虫是否健康活跃、是否有幼虫爬出等;

然后在显微镜下仔细观察其表型是否与基因型相吻合，必要时可提取果蝇基因组，结合 PCR 及 DNA 测序进一步确认。

1.2 螨虫是果蝇最大的天敌。由于大多数感染果蝇的螨虫的生命周期比果蝇稍长(平均约3周)，故可将新引进的果蝇频繁转移至新鲜培养基，以彻底排除螨虫污染。

1.3 具体地，可遵循下述方法将新品系进行检疫后再放入已有品系进行常规饲养：

- 1) 新品系成虫 (F0) 放置在检疫专用区域，避免与现有品系混杂。
- 2) 每天更换3~4次新鲜培养基 (更换培养基时，将新培养管与旧管对接，轻磕使果蝇掉落)，连续更换3天。
- 3) 静置数天，待其子代 (F1) 孵化后，杀死F0代果蝇。
- 4) 对F1代重复上述步骤 1) ~ 3) 操作，得到F2代果蝇。
- 5) 在步骤 2) ~ 4) 期间，定期在体视显微镜下检查果蝇管中是否有螨虫：

螨虫比果蝇小很多 (成体果蝇体长约2~3 mm，成体螨虫体长约130 μm)，常活动在果蝇羽化后的空蛹周围，将卵成串产在果蝇蛹壁上。如在任何步骤发现螨虫，则严格挑选新羽化的不携带螨虫的个体进行保种并重新进行上述步骤1) ~ 5) 排查。此外，-80 °C过夜处理或高压蒸汽灭菌已污染的所有果蝇管、管塞及托盘，并用无水乙醇擦洗检疫区仪器设备。彻底排除螨虫污染后，方可将F2代果蝇入库保存。检疫使用过的果蝇管和管塞要单独处理，通过-80 °C过夜冷冻或高压蒸汽灭菌彻底杀灭可能存在的螨虫及其孢子。

2. 果蝇培养基的配制

2.1 清华大学果蝇中心采用玉米面为主要成分的固体培养基，使用指形果蝇管或锥形果蝇瓶分装 (清华果蝇中心专利，图 1A-1B)。管/瓶口塞以防螨型乳胶海绵塞 (清华果蝇中心专利)，既保证透气性，又具有保湿、防螨虫、防细菌的功能。

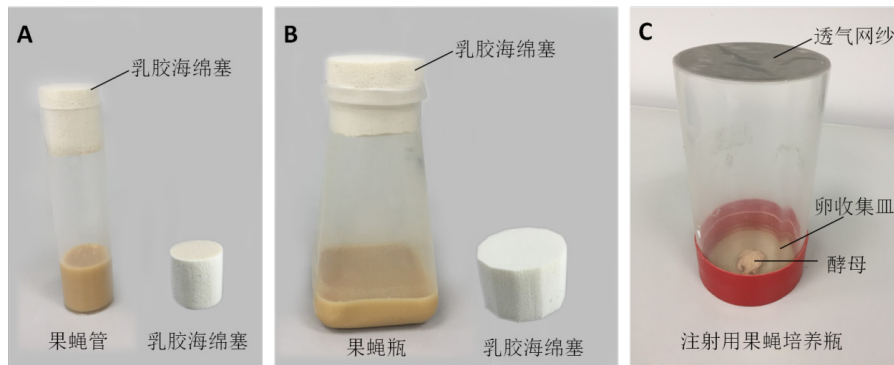


图 1. 果蝇饲养装置. A-B. 日常果蝇饲养用果蝇管与果蝇瓶，底部装有玉米培养基，管/瓶口塞以乳胶海绵塞。C. 收集显微注射用卵的果蝇培养瓶。下部为涂有湿酵母的卵收集皿，吸引果蝇产卵；上部为透气网纱，保证透气性。

2.2 培养基的配制方法

- 1) 向电饭锅中加入5 L水，插电加热。
- 2) 依次称量以下试剂，放入加有5 L冷水的大烧杯中，搅拌混匀。

酵母粉 245 g

玉米面 500 g

琼脂粉 100 g

白砂糖 72.5 g

红糖 300 g

注：必须在加热前将琼脂糖溶于冷水中，以防止结块。加热煮沸酵母粉会杀死酵母菌，但可提供酵母生长必需的蛋白质和维生素，利于培养过程中果蝇体表自然携带的酵母的生长 (贾永红, 2007)。

- 3) 待步骤 2) 混匀后倒入锅中，开启煮饭模式，不断搅拌。
- 4) 沸腾后继续搅拌，持续煮20 min，关火。
- 5) 自然冷却5~6 min，加入40 ml丙酸，搅拌混匀。
- 6) 继续冷却20 min (等待冷却的时间可以将果蝇管或果蝇瓶插放到托盘上)，待培养基冷却至55~60 °C时，加入抗生素母液 (见配方溶液) 175 ml，搅拌混匀。
- 7) 将培养基转入培养基分装器 (图2)，控制流量操纵杆使食物流入下方果蝇管或果蝇瓶中，达到2.5~3 cm高度即可停止。

- 8) 更换新的装有果蝇管的托盘，重复步骤7)，直至培养基分装完毕。
- 9) 将分装好的培养基平放在干净实验台上，以两层纱布覆盖，防止果蝇飞入。
- 10) 室温放置过夜，待管壁干燥后塞紧乳胶海绵塞，再放入4 °C冷藏柜，可保存一周。

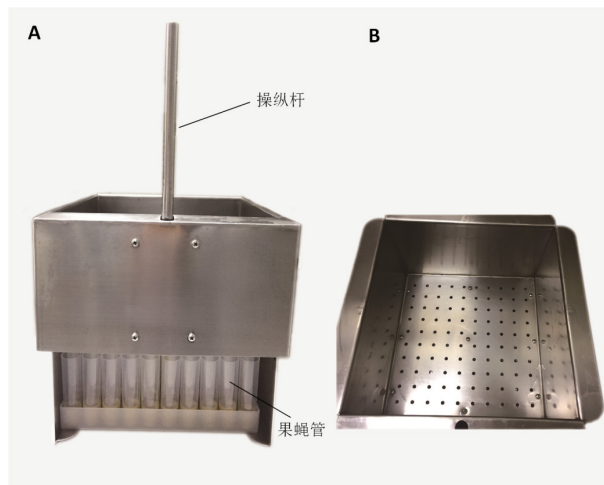


图 2. 果蝇培养基分装器. A. 分装器正面. B. 分装器俯视图。

3. 果蝇遗传学操作

3.1 基础操作

- 1) 打开体视显微镜，将光源调节至合适的亮度。
- 2) 将装有需要进行遗传学操作果蝇的果蝇管或果蝇瓶倒置倾斜握住，打开二氧化碳，将二氧化碳枪头伸入管/瓶中，轻按二氧化碳枪充入二氧化碳。
- 3) 片刻后，果蝇因麻醉而掉落，轻磕果蝇管/瓶以避免其沾到管/瓶底或管/瓶壁，取出海绵塞，将果蝇倒在通气板上。
- 4) 调节显微镜放大倍数及焦距，直至能看清果蝇。
- 5) 使用柔软的羽毛轻扫果蝇，在显微镜下进行处女蝇挑选、表型观察、杂交所需果蝇的准备等操作。
- 6) 最后，向新的培养管/瓶底部撒少许干酵母粉，将挑选出的处女蝇、所需表型果蝇或所需杂交所需果蝇扫入新的培养管/瓶，用记号笔做好标记，置于适合的培养条件下进行饲养。

3.2 处女蝇的挑选

数量足够、质量有保障的处女蝇是果蝇杂交的必要条件，因此处女蝇挑选是果蝇实验室一项十分重要的日常工作。

- 1) 将需要使用的工具果蝇饲养于果蝇瓶中，3~4 天后观察产卵及孵化情况，杀死老果蝇。
- 2) 待果蝇开始孵化时，倒出果蝇瓶内所有果蝇，挑选出体色苍白、幼嫩，腹部透明且有黑点 (肠道残留的粪便) 的雌果蝇，装入撒有少许干酵母的果蝇管，标记好基因型、处女蝇符号和挑选日期备用。

注：由于清晨果蝇孵化较集中，因此最好上午 8 点就开始处女蝇挑选。

- 3) 由于孵化后 8 小时内的雌蝇不会交配，因此可在第一次挑选后 8 小时内进行第二次挑选，直接将孵化的雌蝇装入新的果蝇管即可。
- 4) 每天挑选 3 次，挑选足够数量后，放置 2~3 天，用于遗传学杂交。

3.3 果蝇遗传学操作的一些技巧和注意事项

- 1) 果蝇遗传学操作宜少量、分批进行，每次操作尽量迅速，以缩短果蝇麻醉时间，减少对果蝇的伤害。开展行为学实验的果蝇，避免在实验前 24 h 内进行麻醉。
- 2) 挑选出的处女蝇一般在新鲜培养基中保存 2~3 天再进行杂交，一则因果蝇羽化后两天之后卵巢发育成熟，产卵量才逐渐增加；二则可以通过观察保存期培养基中是否有幼虫爬出，进一步确定雌性是否为处女蝇。用于杂交的雄蝇最好是羽化后 3~15 天的，因为刚羽化的雄蝇生殖系统没有发育成熟，而过老的雄蝇交配能力会下降。
- 3) 为了建立健康的种群，杂交时需要控制亲代果蝇的数量。使用果蝇管杂交时，每管可放雌雄果蝇各 5~8 只；使用果蝇瓶杂交时，每瓶可放雌雄果蝇各 15~20 只。若果蝇繁殖力较弱，可适当增加初始果蝇数量。
- 4) 杂交果蝇需准确标记雌、雄亲代的基因型，以及杂交时间。在靠近表面的培养基开始松动时，表明已有较多的幼虫，可将亲代进行转管或杀死；最晚也要在子代羽化之前倒出老果蝇，以防子代与亲代混淆。
- 5) 进行复杂的杂交实验时 (如基因型整合)，所需表型的果蝇往往只占子代总数的小部分，并且可能由于携带多种基因突变、转基因和平衡子等，生活

力和繁殖力较弱；故在杂交之初，就要使用足够多的果蝇，可杂交多管或几天后倒入新管，也可饲养在果蝇瓶中，以保证有足够的子代用于后续实验。

- 6) 在进行特定表型挑选时，需全面考虑基因型以及基因间相互作用。例如，构建转基因RNAi品系时，经常利用attP/attB系统，将携带*vermillion* (或*white*)的转基因载体定点整合到*vermillion* (或*white*)纯合突变的背景果蝇基因组上。*vermillion*和*white*是控制眼睛颜色的隐性基因，*vermillion*纯合突变的背景果蝇是朱砂眼 (浅红色)，*white*纯合突变的背景果蝇是白眼。转基因载体成功插入后，由于补回了*vermillion* (或*white*)基因，因此果蝇眼睛呈现野生型果蝇的深红色，可利用眼睛颜色准确挑选出转基因RNAi品系。再例如，将X染色体为*white*^{-/-}的雌果蝇与*vermillion*/Y的雄果蝇杂交，子代雄蝇由于带*white*的X染色体，所以都是白眼；而雌蝇中，*vermillion*和*white*都是杂合，果蝇眼睛呈现深红色。而如果是在*vermillion*和*white*基因都为纯合突变的情况下，由于*white*对*vermillion*是上位基因，所以*vermillion*的表型不能表现出来。

4. 实验用果蝇的饲养

4.1 果蝇可在10~30 °C温度范围内存活，25 °C为最适宜的饲养温度。因此，除了特殊需要，一般实验用果蝇都放置于恒温恒湿培养箱，采用25 °C、60%湿度、12 h光照/12 h黑暗的饲养条件，达到成活率高、产卵多、传代快的效果。果蝇管可放置5~20只果蝇，果蝇瓶可放置10~50只果蝇，过多或过少都不利于果蝇生长。对于重要基因突变、多基因突变和平衡子等较弱的品系，可适当增加1~2倍量的果蝇。成虫放置3~5天后，观察幼虫爬出情况，避免产卵过多，必要时可转管培养或将老果蝇处死。要随时注意观察果蝇生长状况，若培养基出现裂缝，可滴加适量灭菌水。若幼虫过多，导致培养基过稀，可放入少量无菌卫生纸。

4.2 利用 Gal4/UAS 系统驱动目的基因 RNAi 或过表达时，有时为了获得更高的表达效率，可放置于 29 °C 培养。

4.3 利用 FLP/FRT 系统诱导嵌合体的方法：

- 1) 将果蝇 (幼虫或成虫) 驱赶到果蝇管最底部 (幼虫可使用镊子逐一夹出放

入新的果蝇管，成虫可轻磕果蝇管使其掉落)，然后将海绵塞下压，使食物顶部与海绵塞之间仅保留 2 cm 左右高度的空隙。

- 2) 放入水浴锅，使水尽量没过大部分果蝇管。
- 3) 37 °C 热激 45 min~1 h。
- 4) 取出果蝇管，使用镊子或剪刀夹出海绵塞，使其与管口平齐。
- 5) 转入 25 °C 或 29 °C 继续培养。
- 6) 对于较难产生克隆的系统 (如利用 FLP/FRT 系统进行突变体克隆诱导，或针对卵巢生殖干细胞进行克隆诱导)，可每间隔 8 h 热激一次，多次热激可提高产生克隆的效率。

4.4 显微注射用果蝇饲养

- 1) 向干酵母粉中加少许无菌水，搅拌混匀成糊状，涂到装有显微注射卵收集培养基的一次性培养皿底部。
- 2) 将培养皿卡到注射用果蝇培养瓶底部。
- 3) 收集刚孵化的注射用背景果蝇，每个注射用果蝇培养瓶收集 > 100 只。
- 4) 避光放置于 25 °C、60%湿度环境下，每天更换 2 次新鲜培养皿。
- 5) 饲养 3~4 天后，可视产卵情况安排显微注射。

5. 废弃果蝇处理

5.1 遗传学操作废弃果蝇处理

按照配方配制废弃果蝇处理液 (清华果蝇中心专利)，混匀后分装至塑料瓶中，放置于实验台上。打开塑料瓶盖，将遗传学操作后废弃的果蝇倒入瓶中，可利用处理液将果蝇杀死并进行灭菌处理。使用后需盖紧瓶盖防止打翻。待塑料瓶中积攒较多果蝇后，集中进行填埋处理。

5.2 果蝇管/果蝇瓶中废弃果蝇处理

实验结束后，将装有废弃果蝇的果蝇管和果蝇瓶集中放置在托盘上，放入 -20 °C 冷冻柜，冷冻过夜，即可将所有果蝇 (包括各个发育时期的果蝇) 全部冻死。乳胶海绵塞可以取下来回收利用。随后，冷冻处理后的果蝇管可通过高温高压灭菌进一步处理 (王霞等, 2016)，或直接作为普通实验耗材处理。乳胶海绵塞和果蝇瓶经过清洗和热空气消毒箱消毒，可重复利用。

6. 逃逸果蝇的捕杀

在果蝇培养基更换和遗传学操作中，难免有果蝇逃逸。为了最大程度避免污染，应在第一时间利用电蚊拍、吸尘器等进行捕杀。对于实验室内散在的果蝇，可利用下述自制容器进行诱捕：向装有培养基的果蝇瓶底部加少量水或醋，瓶口放置一个漏斗（可用纸制作），再用胶条封住瓶口与漏斗间的缝隙（若无缝隙可忽略此步骤）。该容器制作方便，可吸引果蝇飞入，而不能原路飞出，容易粘死到水中。

二、果蝇品系保存及管理

1. 果蝇品系保存设施及条件

为了延长果蝇世代交替的时间，减少培养基更换频率，可将果蝇品系保存在 18 °C 培养箱或恒温恒湿房间（较大规模）。恒温恒湿房间可通过新风换气系统、空调、加湿器、除湿机配合使用实现。每株品系需备份两份，最好将两个备份的生长时期调整到相差半个世代，便于使用和培养基更换。18 °C 条件下，需每月更换一次新鲜培养基。每 3 个月更换一次托盘，并进行清洗和消毒。

2. 更换培养基

果蝇品系的保存依赖定期更换培养基，进行持续培养。纯种品系可不经麻醉直接更换培养基，方法如下：

- 2.1 挑选培养基较厚的果蝇管，提前从冷藏柜中取出，放置于室温，待冷凝水汽消失后可用于转管。
- 2.2 在实验台上放置一小块软垫（如鼠标垫），轻磕果蝇管，使果蝇掉落到底部（避免粘到培养基上）。
- 2.3 迅速拔掉旧管的海绵塞，将新管倒扣在旧管上，管口对接。
- 2.4 在软垫上轻磕几下，使大部分果蝇掉落到新管中（避免旧管中的死果蝇和培养基掉落到新管中）。
- 2.5 迅速塞好新管和旧管的海绵塞，避免果蝇飞出。
- 2.6 新管放入品系保存的托盘上，旧管放入废弃果蝇托盘上。

注：整个过程需谨慎操作，防止果蝇飞出；万一飞出，要立即捕杀，防止污染。

3. 品系资源数据管理

为了方便查询和使用，需对实验室保存的果蝇品系进行信息管理。将每一株果蝇

进行编号，将编号、基因型、来源、插入位点、库中放置位置等信息逐一登记在 Excel 表或 Filemaker 文件中，并将相关信息标记在品系管壁上，便于查找。若果蝇有死亡或丢失，及时更新记录。

4. 定期检查及复壮

培养在低温下的果蝇，随着时间推移和多次转管，果蝇品系可能会发生生活力、繁殖力下降，性状退化等变化。故一方面要对果蝇品系进行定期检查，预防微生物污染、果蝇交叉污染等问题。一旦出现可疑果蝇，立即将其移出果蝇库，进行隔离和鉴定，确定无误后再放回果蝇库。另一方面，使用前最好对果蝇品系进行复壮，具体方法为：挑选发育良好、个体较大且具有典型的品系表型特征的雌雄果蝇单只交配繁殖。其后代生活力、繁殖力强，3 代以上保持品系经典表型且不出现性状分离的果蝇可保存，作为实验用果蝇。

溶液配方

1. 抗生素母液

将 50 g 抗生素溶于 500 ml 无水乙醇中，混匀溶解，室温放置备用

2. 果蝇培养基

序号	试剂	质量/体积
1	酵母粉	245 g
2	玉米面	500 g
3	琼脂粉	100 g
4	白砂糖	72.5 g
5	红糖	300 g
6	丙酸	40 ml
7	抗生素母液	175 ml
8	水	10 L

3. 废弃果蝇处理液

序号	试剂	体积
1	碘伏	500 ml
2	无水乙醇	200 ml
3	石蜡油	至 2 L

4. 显微注射卵收集培养基

序号	试剂	质量/体积
1	琼脂	35 g
2	糖浆	50 ml
3	葡萄汁	50 ml
4	丙酸	4 ml
5	水	至 1.5 L

- 1) 将除丙酸外的所有试剂加入玻璃锥形瓶，搅拌混匀。然后放入微波炉，高火加热 3 min
- 2) 冷却 1 min，再次加热 3 min
- 3) 沸腾后稍微冷却，再次加热至沸腾
- 4) 重复步骤 (3) 3~5 次
- 5) 冷却 10 min，加入丙酸
- 6) 倒入一次性 10 cm 培养皿，每个培养皿倒至 1 cm 左右厚度
- 7) 冷却凝固后，盖上培养皿盖
- 8) 摞起来放置于 4 °C 冷藏柜中，可保存 2 周

致谢

感谢自然科学基金委面上项目 (31872818)、科技部重点研发计划 (2016YFE0113700) 对清华果蝇中心的支持。

参考文献

1. 贾永红. (2007). [实验果蝇的一些饲养技巧和注意事项](#). *生物学通报* 42 (7): 55-56.

2. 王霞, 乔欢欢, 潘丽霞, 任兴杰, 孙锦, 徐荣刚, 刘鲁萍, 贺争鸣, 倪建泉. (2016). [果蝇新品系开发与种质资源保存](#). *实验动物科学* 3: 4-12.