

从需求出发积极创新：一款新型果蝇胚胎孵育仪的诞生

邵素娟¹, 吴薇^{1*}

(1. 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, 上海 200031)

摘要: 果蝇胚胎显微注射是果蝇基因编辑的关键限速步骤, 显微注射后的果蝇胚胎孵育环境更是非常重要, 直接关系后续是否能够孵育出足够多的幼虫, 完成实验。果蝇胚胎呈长椭圆形, 大小仅约为 $0.2\text{ mm} \times 0.45\text{ mm}$, 注射时将胚胎整齐排列于载玻片上, 体积很小, 对空间需求比较小; 注射用果蝇胚胎是去除外壳的, 需覆盖矿物油保湿, 这要求放置平面严格水平, 否则矿物油外溢, 胚胎会干死; 注射后胚胎孵育需在 18°C 低温条件下培养, 由于注射用果蝇胚胎是去除外壳的, 非常脆弱, 所以注射后胚胎对温度特别敏感, 需精准控温。目前市面上没有合适的孵育仪, 不严格的孵育条件导致了显微注射后的果蝇胚胎由于胚胎放置面不水平、温度不稳定等因素而孵育率降低, 用房间或常规培养箱孵育也会造成空间、能源的浪费。同时, 由于温度不稳定引起幼虫孵出时间变化不定, 工作人员需要不定时查看胚胎孵育状态, 及时处理, 否则会导致幼虫孵出后没有及时转入培养基而饥饿致死, 影响实验, 也降低工作效率。为了解决这些问题, 我们利用金属浴控温原理, 设计了一款小巧的新型果蝇胚胎孵育仪, 成功应用于显微注射后的果蝇胚胎孵育, 严格水平, 精准控温, 节省空间, 达到了很好的效果。这一创新也能为其他需要小范围精准控温的孵育实验提供仪器设计指导, 有极大的推广价值。

关键词: 孵育仪; 果蝇; 胚胎发育; 显微注射

An innovation for request: An incubator for injected *drosophila* embryos

Sujuan Shao¹, Wei Wu¹

(1. Core Facility of *Drosophila* Resource and Technology, Centre for excellence in molecular cell science, CAS, Shanghai, 200031, China)

Abstract: Microinjection is critical for gene editing. It is very important to keep the injected embryos under certain environment, for it makes sure that the embryos will develop into adults. Embryo's size is about $0.2\text{ mm} \times 0.45\text{ mm}$, and the slide size is about $2\text{ cm} \times 7\text{ cm}$ (W*L). It is a waste of space if we use incubation room or biochemical incubator. Before injection, the shell-removed embryos were arranged in a line on a slide. They were covered with mineral oil

which keeps them wet and provides them nutrition. If the slide is not horizontal, the oil will leak out and the embryos will dry to death. The shell-removed embryos are fragile and sensitive to the temperature. There are no proper incubator available from market. Unstable circumstances such as temperature and location lead to low incubation rate. On the other side, the operators should check the larvae repeatedly to make sure they won't starve to death, risk of delay is high and operators are exhausted. To resolve these issues, we invented a new *Drosophila* embryo incubator. It relies on the metal-temperature-control theory, and now can be applied in incubating embryos. Its temperature is controllable, and it is horizontal and small. It is potentially applicable for other small insect incubation, which also needs temperature to be precisely-controlled.

Keywords: Incubator; *Drosophila melanogaster*; Embryo development; Microinjection

1 果蝇胚胎孵育仪研制背景、目的和意义

果蝇胚胎显微注射，是果蝇基因编辑的关键限速步骤，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。完整的果蝇胚胎显微注射过程包括注射用样品准备，注射针准备，排卵，注射和注射后处理 5 个步骤，注射后处理包括显微注射后胚胎孵育和显微注射后幼虫转移两个方面^[1]。果蝇胚胎孵育环境非常重要，直接关系到后续是否能够孵育出足够多的幼虫，完成实验，所以合适的胚胎孵育仪是显微注射实验能否成功的重要仪器之一。

果蝇胚胎呈长椭圆形，大小仅约为 0.2 mm×0.45 mm，注射时将胚胎整齐排列于载玻片上，体积很小，对空间需求比较小。

显微注射用果蝇胚胎是用 84 消毒液漂洗去除外壳的，非常脆弱易失水^[3]，需覆盖矿物油保湿，这就要求放置平面严格水平，防止矿物油溢出导致胚胎干死。

果蝇胚胎孵育正常是在 18℃ 低温条件下完成的，低温利于伤口愈合。显微注射用果蝇胚胎是用 84 消毒液漂洗去除了外壳的，保护外壳缺失导致注射后胚胎对温度特别敏感，精准控温是孵育成功的必备条件。

目前市面上没有合适的孵育仪，通常显微注射后的胚胎放置于湿盒中，置于实验桌面上，调节空调温度，使室温保持在 18℃，一般 36 小时左右发育成幼虫^[1,2]。由于显微注射间的温度是由空调控制的，受到外界环境的影响很大，非常不稳定，这就导致其温度总是很难

精准控制在 18℃。此外，为了几盒胚胎，需要将整个房间或生化培养箱长期控制在低温下，造成能源的浪费。

注射后胚胎也可以放置于培养箱孵育，市面上有各种培养箱，如细菌培养箱，果蝇培养箱，生化培养箱等，然而这些培养箱均不是非常适合果蝇胚胎的孵育。它们普遍存在两个问题，一是培养箱为了排水方便等原因，底座和隔板等都是稍微倾斜的，很难调成严格水平，孵育时载玻片上的矿物油就很容易溢出导致胚胎干死。二是市售最小体积的生化培养箱(50L)对胚胎孵育来说体积也是大很多的，也会造成空间、能源浪费。

不严格的孵育条件导致了显微注射后的果蝇胚胎由于胚胎放置面不水平、温度不稳定等因素而孵育率降低。同时，由于温度不稳定引起幼虫孵出时间变化不定，工作人员需要不时查看胚胎孵育状态，及时处理，否则会导致幼虫孵出后没有及时转入培养基而饥饿致死，影响实验，也降低工作效率。

为了解决这些问题，我们利用金属浴控温原理，设计了一款小巧的新型果蝇胚胎孵育仪，成功应用于显微注射后的果蝇胚胎孵育，严格水平，精准控温，并且节省了空间，达到了很好的效果。这一创新也能为其他需要小范围精准控温的孵育实验提供仪器设计指导，有极大的推广价值。

2 果蝇胚胎孵育仪研制流程

如图 1 所示，成品孵育仪由金属浴控温底座、带盖控温箱体、置物架和温度探测器四部分组成。

2.1 金属浴控温模块定制

定制一款温度控制范围在 0℃-100℃的金属浴控温模块底座，尺寸为 20cm*27cm*18cm。如图 1-①所示。

2.2 控温箱体定制

定制一个带盖无底的长方体有机塑料盒，尺寸为 14cm*14cm*8cm（长*宽*高），将其嵌套在控温模块上。如图 1-②所示。

2.3 载玻片置物架定制

定制放置载玻片的不锈钢架，其尺寸匹配载玻片大小，为 7cm*2.5cm*8.5cm（长*宽*高），从上到下分隔为 9 层，每层间隔 0.8cm，每个隔层上都可以放置一片载玻片。用水平仪测量每一层钢架的水平度，确保绝对水平。孵育仪控温箱体可以放置 3 个置物架，共计可放置 27 片载玻片，如图 1-③所示。空置物架见图 2，摆放好载玻片的置物架见图 3。

2.4 温度探测器定制

在塑料盒左下方距底边 1cm 高处打一半径为 5mm 的圆孔，将温度计的探头放入盒内，生料带密封孔。温度计置于孵育仪边，实时监控孵育仪内温度。如图 1-④所示。

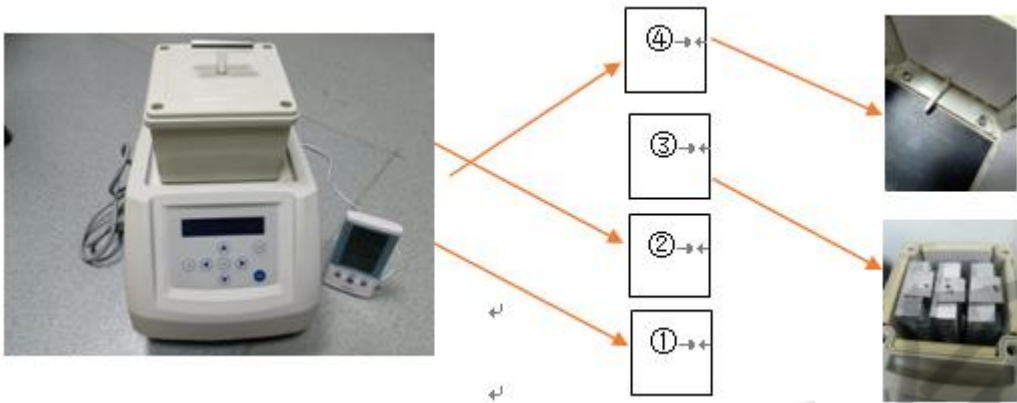


图 1 蝇胚胎孵育仪

注：①控温底座；②带盖控温箱体；③置物架；④温度探测器（内部有探头，外部有显示屏幕）



图 2 置物架图 3 摆放好载玻片的置物架

3 蝇胚胎孵育仪调试

3.1 育仪温度调试

首先开启孵育仪，设置孵育仪的控温模块温度，将孵育仪内的实际温度控制在 18℃-19℃ 之间。经调试，当孵育仪温度设置为 14℃ 时，温度计显示温度符合需求。也就是说，孵育仪设置的温度远远低于实际温度，因此在使用时必须提前调试。

3.2 胎孵育率比较

我们比较最常用的定点插入转基因系统用两种遗传背景果蝇 $y[1] \text{ M}\{\text{vas-int.Dm}\}\text{ZH-2A w}[*]; \text{P}\{\text{CaryP}\}\text{attP40} \text{ (attP-25C6)}$ 和 $y[1] \text{ M}\{\text{vas-int.Dm}\}\text{ZH-2A w}[*]; \text{P}\{\text{CaryP}\}\text{attP2} \text{ (attP-68A4)}$ 在 18℃ 培养室和新型孵育仪中的胚胎孵育率。将注射过显微注射缓冲液 (injection buffer) 的果蝇胚胎 (200 个) 放置于孵育仪内的钢架上，开启孵育仪孵育。同时，另外一份注射过显微注射缓冲液 (injection buffer) 的果蝇胚胎 (200 个) 放置在 18℃ 培养室孵育。36 小时后，胚胎逐步发育成幼虫，统计幼虫数目，计算胚胎孵育率。attP-25C6 注

射后胚胎孵育率由 41%提升至 59%,attP-68A4 注射后的胚胎孵育率由 34.5%提升至 47.5%,详细结果见表 1。

表 1 同品系胚胎在不同孵育环境中的孵育率比较

果蝇品系	attP-25C6		attP-68A4
	孵育仪	59%（118 条幼虫）	47.5%（95 条幼虫）
孵育环境	18℃培养室	41%（82 条幼虫）	34.5%（69 条幼虫）

4 讨论和结论

经过一年多时间的调试使用，不管四季温度变幻，果蝇胚胎孵育仪温度都比较稳定，能为平台显微注射提供了稳定的孵育效率，节省了空间人力，提升了工作效率。

但孵育仪还存在一些需要改进的地方。1) 开机时风扇制冷噪音较大；2) 无法精准控制湿度，为避免空气湿度过低影响胚胎孵育，现在的解决方法是孵育的同时在箱体放置湿润的医用棉球；3) 孵育仪内部空间较小，每次将模块放入孵育仪中时必须很小心，否则容易倾斜，导致漏油；4) 放置载玻片的模块没有载玻片的保护措施，导致载玻片较容易滑落；5) 该仪器体积小，每次放置的胚胎数量不够多，一次最多只能放置 27 块载玻片，不能满足大量孵育需求。

果蝇胚胎孵育仪的出现填补了果蝇胚胎孵育仪器的空白。日后我们会根据实验需求，对其进行升级改造，使它能够更加符合果蝇胚胎孵育的需求，进一步拓展其在其他小型昆虫胚胎发育领域的应用。

参考文献:

[1]邵素娟，谭霜霜，沈妍，吴薇*(2023).果蝇胚胎显微注射（The Microinjection of Drosophila’s Embryos）[D]. Bio-protocol 《实验动物胚胎操作实验手册》. DOI: 10.21769/BioProtoc.1010976 Published: February 20, 2023

[2]徐龙梅，沈妍，吴薇*(2023).产卵用果蝇准备（ Preparation of the Flies）[D]. Bio-protocol 《实验动物胚胎操作实验手册》. DOI: 10.21769/BioProtoc.1010975 Published: February 20, 2023

[3]沈妍，徐龙梅，吴薇*(2023). 果蝇胚胎收集和脱壳处理（Collection and Hulling treatment of Drosophila’s embryos）[D]. Bio-protocol 《实验动物胚胎操作实验手册》. DOI: 10.21769/BioProtoc.1010977 Published: February 20, 2023

[4]柴春利, 鲁成.从形态学不同到基因水平差异: 家蚕与果蝇早期胚胎发育比较[J].遗传 2006,28(9): 1173~1179 DOI:10.16288/j.ycz.2006.09.022

[5]CHAI Chun-Li, LU Cheng. Comparison of Early Embryogenesis Between Silkworm and *Drosophila* from both Morphology and Gene Content Level[J]. HEREDITAS, 2006,28(9): 1173~1179 DOI:10.16288/j.ycz.2006.09.022

中国仪器信息网