

低温麻醉技术在果蝇遗传学实验教学中的应用

刘艳, 孟令军, 逯家辉, 侯阿澧, 孟庆繁, 滕利荣, 周杰*

(吉林大学生命科学学院, 长春 130021)

摘要: 在生物学实验教学中有诸多经典实验, 实验成功率高, 便于培养学生基本操作技能。然而随着科学技术发展, 这些经典实验逐渐暴露其安全隐患及欠缺环境友好性等问题, 提高生物学实验教学安全及增进实验的环境友好性已成为实验教学的重要任务。通过低温麻醉代替乙醚麻醉进行遗传学实验教学中的果蝇麻醉, 介绍生物学实验教学安全性及环境友好性改革的初步探索。

关键词: 生物学实验; 教学改革; 安全性; 果蝇; 遗传学

Application of chill anesthesia on *Drosophila* to genetics experiment teaching

LIU Yan, MENG Lingjun, LU Jiahui, HOU Ali, MENG Qingfan, TENG Lirong, ZHOU Jie*

(School of Life Sciences, JiLin University, Changchun 130021, China)

Abstract: In biological experiment course, there are many classic experimentations, through which students can get high success rate, and students' basic operation skills of biological experiment will be increased. However, with the development of science and technology, these classic experimentations gradually expose the potential safety problems and lack of environmental friendliness. Therefore, it has become an important task of the experiment teaching to improve the safety and to promote environmentally friendly experiment. In genetics experiment, by using chill instead of ether to make *Drosophila melanogaster* anesthesia, we has introduced preliminary exploration on the safety and environmental friendly reform of biological experiment teaching.

Key Words: biological experiments; teaching reform; safety; *Drosophila*; genetics

目前, 承接生物实验教学的实验室较化学实验室具有更高的安全隐患, 探索以更安全的实验操作代替存在安全隐患的实验操作, 以安全的用量、可监控的实验试剂代替有安全隐患并难以进行监控的实验试剂; 做好对传统的、经典的实验理论及技术的讲述与传承, 并基于新的科学技术对其进行改造与革新; 兼顾实验教学中的传承与创新, 服务于生物实验教学安全化改造与革新, 这一点已经成为实验教学与科研人员的共识^[1]。

吉林大学国家级生物实验教学示范中心(以下简称中心)在本科实验教学探索中, 提出要对诸如

乙醚、苯酚、二苯胺等能够造成环境污染和人体伤害的实验试剂与相关实验操作进行改革, 使用安全的实验方法及实验试剂进行替代, 以提高本科实验教学和科研工作的安全性, 以此为前提, 我们进行了初步尝试: (1)生物化学实验中, 在DNA浓度测定过程中, 用紫外光谱法代替二苯胺显色法; (2)酶学实验中, 用常温比色方法替代需要沸水浴的DNS定糖方法; (3)细胞生物学实验中, 用浮漂热台蜡盒包埋方法替代原有的室温直接包埋方法^[2]; (4)用低温环境代替传统的乙醚用于果蝇麻醉^[3]。本文着重阐述低温麻醉在实验教学中

收稿日期: 2015-07-10

基金项目: 2014吉林大学大学生创新创业训练计划(2014B34084)

*通信作者: E-mail: jzhou@jlu.edu.cn

的应用。

1 现有果蝇麻醉方法存在的问题

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是重要的遗传学研究模式生物,在遗传学实验教学及科研中具有重要的地位,在与果蝇相关的遗传学教学及科研实验操作过程中,不可避免要涉及果蝇麻醉,现有的麻醉方法包括乙醚、二氧化碳、氯仿、乙醇、乙酸乙酯等^[4],其中乙醚和二氧化碳麻醉应用范围最广^[5-10]。乙醚麻醉以其廉价、操作便捷,广泛使用于国内果蝇相关实验教学中^[6-10]。

以果蝇为实验材料的教学科研工作,除研究亲本果蝇的行为外,还涉及果蝇的传代及繁殖能力,这就对果蝇麻醉时长、生理机能恢复等提出了要求。乙醚麻醉出现较早,随着科技的发展,人们对麻醉的本质认知也在逐渐加深。Van Dijken等^[11]指出在乙醚麻醉后超过400 h,果蝇正常活动仍受抑制,Barron^[12]指出二氧化碳麻醉对果蝇尤其是黑腹果蝇的交配行为有明显影响,Gibert等^[13]发现低温麻醉可以有效避免二氧化碳或者乙醚对果蝇造成的伤害,这种情况下采用低温技术对果蝇进行麻醉成为一种选择,部分实验室利用冰箱冷藏室(0℃~8℃)麻醉果蝇,而Macalpine等^[14]指出长时间冷暴露会导致果蝇后代减少,子代个体较小,性别比例失调,这种情况下对果蝇的低温麻醉进行进一步探索就显得尤为重要。我们从麻醉时间、麻醉率、果蝇回到室温后的苏醒时间、苏醒率、24 h生存率、繁殖能力、寿命及攀爬指数等角度探索了-30℃至0℃之间低温环境对果蝇麻醉效应及麻醉后影响,筛选出较好的果蝇麻醉条件^[3]。

2 低温——适合生物实验教学的果蝇麻醉方法

果蝇是温带、亚热带物种,具有低温昏迷的特性。国际上在果蝇低温生物学性质研究中已经取得了一系列研究成果及共识:(1)在适当低温操作下果蝇可进入昏迷状态,并在环境温度升高后恢复运动能力^[15];(2)短时间内,一定温度的低温环境中,果蝇能保持其生理机能,其表观性状及交配繁殖能力不受影响^[16];(3)在大学生创新项目(2014B34084)研究进行过程中,以氯化钙冰盐浴制备低温环境,具体实验操作参考张雪兰等的方法^[3],实验前将培养瓶中的果蝇转移到麻醉瓶中,轻敲瓶壁使全部果

蝇落在麻醉瓶底部,迅速将麻醉瓶置于不同温度的冰盐浴中,冰盐混合物以低于瓶口3~4 cm为宜,果蝇全部麻醉后,转至置于冰上的表面皿中,进行后续观察与操作,结果发现经程序低温操作可以快速麻醉果蝇,避免了长时间麻醉对果蝇造成的一系列不良影响^[14],麻醉后的果蝇恢复后具有与经乙醚麻醉恢复后的果蝇相当的运动、学习和记忆能力,但是冰盐浴控温不准确、温度波动较大,因此我们设计制作了适用于果蝇低温麻醉操作的教学设备,该设备已经申请了实用新型专利^[17]并获得授权,以上述工作及相应研究成果为基础的国家发明专利正在审理中^[18]。基于上述专利的仪器设备已经生产,并投入到实验教学和科学研究中,实现在实验室内对果蝇进行程序性低温麻醉和观测。

在实验教学改革中采用上述设备实现程序性低温,用于本科生果蝇麻醉及性状观测相关实验教学,与传统的乙醚麻醉法相比这种方式的优点在于:(1)避免具有潜在安全隐患的麻醉试剂——乙醚的使用;(2)整个实验过程中不向环境中排放有毒气体,营造绿色环保实验室;(3)-10℃对于实验操作者而言不存在冻伤可能性,充分保证实验操作者的安全;(4)低温麻醉后,将麻醉果蝇置于冰上平皿中,其麻醉状态维持时间>10 min,可进行大样本数实验现象观察,并保证实验技能不足的本科学学生有足够时间进行实验现象观察和后续实验操作;(5)实验装置简单,不需进行大的仪器设备改造和投入,满足任何层次实验教学及科研工作的需求。三种麻醉方法在实验过程中具体应用对比见表1。

在遗传学实验教学过程中,由于本科生实验经验不足,观测记录果蝇性状和挑处女蝇过程需要较长时间,经常出现挑取果蝇数目不够的情况下,果蝇已经苏醒的问题,为取得较好的实验结果,学生往往对果蝇进行多次乙醚麻醉,以便观测果蝇性状和处女蝇挑选,极大的增加了试剂用量监管的难度,增加了实验的安全隐患。采用低温麻醉方法后,降低生物实验室果蝇麻醉相关操作的安全隐患,学生可更好的观察果蝇的相关性状,在提高实验成功率的基础上缩短了实验时间,学生可以利用富裕出来的时间进行更多的观测及其它实验技能的训练,调动了学生的实验积极性,为学生进行更多的研究型实验打下良好基础。

表1 三种麻醉方法具体实验应用对比

		乙醚麻醉	CO ₂ 麻醉 ^[4]	低温麻醉
监管	实验室环境要求	通风良好	通风良好**	无
	实验课程开设时间限制	5~9月	无	无
	试剂使用监管	难度高	难度高	不需监管
操作	实验整体完成时间 [*]	90 min	***	30 min
	一次麻醉操作耗时	2~3 min	6~8 min	<1 min
	麻醉状态持续时间	2~6 min	6~8 min	>10 min
	麻醉剂消耗量	200 μL/次	60 mL/次	无
	是否需要多次麻醉	是	是	否
	试剂安全性	易燃、易爆、II类易制毒*	保障气瓶安全存放	安全无毒,非管制
安全	环境友好性	乙醚气体排放、残余乙醚液体处理	空气中CO ₂ 导致温室效应	环境友好
	对实验人员潜在伤害	头晕、恶心	头痛、乏力、呼吸困难	无

^{*}仅以40人同时进行实验操作为例

*乙醚属于II类易制毒药品,受公安部管制^[19];

**在使用CO₂过程中,不仅需要保证环境通风,而且需要随时监控CO₂浓度;

***实验整体完成时间与实验人数及CO₂麻醉设备数相关。

3 营造更加健康实验环境, 杜绝安全隐患

在生物学实验教学中,由于其实验对象及实验所用方法和试剂对人类同样具有作用能力和危害,在生物学实验教学过程中除对学生进行相关知识的讲授,实验技能的培训外,还要进行实验道德的强化。随着科技的进步与社会的发展,师生共同参与,探索与时俱进和区域化为特色的实验改革,探求具有安全性、稳定性与重复性的“绿色环保”实验进行知识传承,是每个生物学实验教学与研究人员的责任与使命。

参 考 文 献

- [1] 武晓峰, 闻星火. 高校实验室安全工作的分析与思考. 实验室研究与探索, 2012, 31: 81-84
- [2] 周杰, 刘艳, 张桂荣, 等. 石蜡切片技术改进及细胞生物学实验的统筹. 实验室研究与探索, 2014, 33: 167-170
- [3] 张雪兰, 王亚文, 周杰, 等. 冰盐浴低温处理对果蝇麻醉效应探索. 生物学通报, 2015, 50: 50-51
- [4] 王璐, 辛芳, 许乐乐, 等. 5种麻醉方法对果蝇麻醉效应的探究. 生物学通报, 2012, 5: 51-55
- [5] Verspoor RL, Heys C, Price TA. Dyeing insects for behavioral assays: the mating behavior of anesthetized *Drosophila*. J Vis Exp, 2015: e52645-e52645
- [6] 牛炳韬, 孙英莉. 遗传学实验教程. 兰州大学出版社, 兰州, 2014, 1-6
- [7] 边才苗. 遗传学实验教程. 浙江大学出版社, 杭州, 2014, 51-54
- [8] 杨大翔. 遗传学实验(第一版). 科学出版社, 北京, 2004, 1-10
- [9] 滕利荣, 孟庆繁. 生物学基础实验教程(第三版). 科学出版社, 北京, 2008, 38-40
- [10] 刘祖洞, 江绍慧. 遗传学实验(第二版). 高等教育出版社, 北京, 1979, 14-18
- [11] van Dijken FR, van Sambeek MJPW, Scharloo W Influence of anaesthesia by carbon dioxide and ether on locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. Experientia, 1977, 33: 1360-1361
- [12] Barron, A. Anaesthetising *Drosophila*. for behavioural studies. Journal of Insect Physiology, 2000, 46: 439-442
- [13] Gibert P, Moreteau B, Pétavy G, et al. Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. Evolution, 2001, 55: 1063-1068
- [14] Macalpine JL, Marshall KE, Sinclair BJ. The effects of CO₂ and chronic cold exposure on fecundity of female *Drosophila melanogaster*. J Insect Physiol, 2011, 57: 35-37
- [15] Chiang HC, Benoit D, Maki J. Tolerance of adult *Drosophila melanogaster* to sub-freezing temperatures. Can Entomol, 1962, 94: 722-727
- [16] Ohtsu T, Kimura MT, Hori SH. Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. J Comp Physiol B., 1992, 162: 203-208
- [17] 周杰, 张雪兰, 刘艳, 等. 一种果蝇麻醉装置. 中国, 授权号ZL201420320714.6. 2014
- [18] 周杰, 张雪兰, 刘艳, 等. 一种对果蝇实施低温麻醉的方法. 中国, 申请号 201410267683.7.
- [19] 易制毒化学品购销和运输管理办法, 中华人民共和国公安部令第87号, 2006年10月1日起实施。