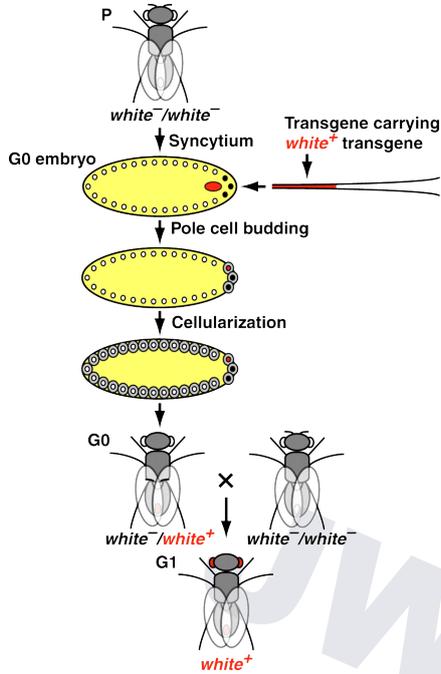


转基因果蝇的遗传学筛选与建系

使用w118果蝇打随机插入:



注射质粒到合胞体胚胎尾部的极细胞（未来发育为生殖细胞）中, 在该细胞中发生基因编辑事件, 由该胚胎生长出的果蝇称作G0, G0代果蝇不具有转基因特性, 仅其生殖细胞中具有外源基因。因为质粒上含有橙眼基因, 注射的野生型果蝇为白眼, 可以使用眼色对其子代进行纯化、建系

G0

♂ w118 injected × ♀ ♀ w118
或
♀ ♀ w118 injected × ♂ ♂ w118

↓ 筛选橙眼雄性

F1

♂ $\frac{+}{Y}; \frac{\text{Gene}}{+}; \frac{+}{+}$ (插入#2)

♂ $\frac{+}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{Gene}}{+}$ (插入#3) × ♀ ♀ $\frac{\text{IF}}{\text{cyo}}; \frac{\text{MKRS}}{\text{TM6B}}$

♂ $\frac{\text{Gene}}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$ (插入X)

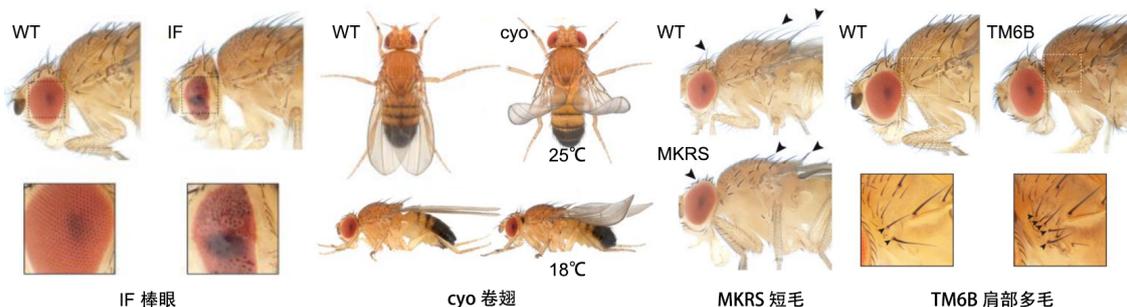
1. 收到公司返回的G0代果蝇后, 选择橙眼雄性与多只野生型雌性杂交, 得到F1 (实在筛选不出时可以考虑使用雌蝇多对多杂交保系)

! 雌蝇中存在染色体重组现象, 而雄蝇中完全没有重组现象, 因而在Balance前需要尽可能挑选雄蝇作为遗传学工具。另外, 雄蝇不用收处女蝇, 操作也比较便捷

2. 在F1代果蝇中挑选橙眼雄性果蝇, 与Balancer果蝇($\frac{\text{IF}}{\text{cyo}}; \frac{\text{MKRS}}{\text{TM6B}}$)杂交, 得到F2代果蝇

Balancer果蝇的基因型为 $\frac{\text{IF}}{\text{cyo}}; \frac{\text{MKRS}}{\text{TM6B}}$ 或 $\frac{\text{FM7a}}{Y}$, 其中

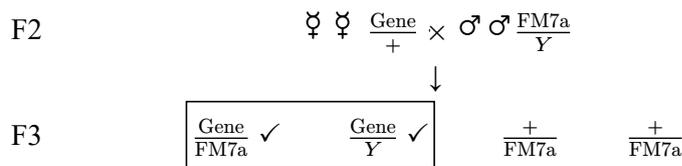
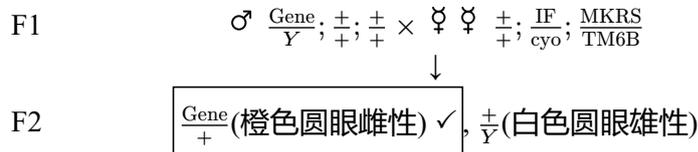
- IF为2号染色体Balancer, FM7a为X染色体Balancer, 带有显性表型为棒眼(*If* 或 *B*), 纯合致死
- cyo为2号Balancer染色体, 携带显性Marker基因表型为卷翅(*Cy*), 纯合致死
- MKRS为3号Balancer染色体, 携带显性Marker基因表型为短毛(*Sb*), 纯合致死
- TM6B为3号Balancer染色体, 携带显性Marker基因表型为肩部多根毛(*Hu*), 一些TM6B variants还会伴随着短体(*Tb*), 纯合致死



3. 在F2代果蝇中, 可以根据表型观察几种情况

- 如果雌蝇均是橙眼, 雄蝇均是白眼说明Gene插在了X染色体上, 筛选橙色圆眼雌性果蝇与X染色体的Balancer($\frac{FM7a}{Y}$)杂交得到F3, 在F3代果蝇中筛选橙眼果蝇自交, 即可完成建系

! 在F1代杂交中引入的2、3号染色体Balancer可以不用在意, 在随后杂交或传代中会因纯合致死而丢失

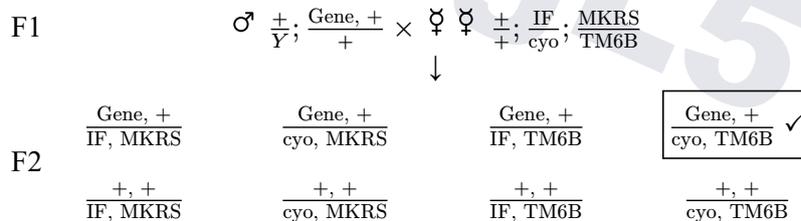


- 若仅仅雄蝇为橙眼, 则说明Gene插入Y染色体, 因为X和Y染色体间不会重组, 这种情况不需要额外引入Balancer染色体建系

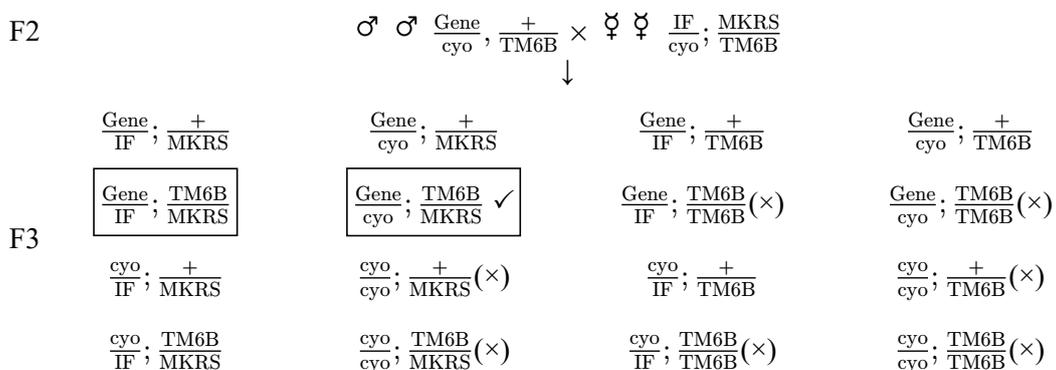
! 但通常情况下, 除了少数工具酶外, 很少会筛选Y染色体果蝇, 其会损失雌蝇表型

- 如果雌蝇和雄蝇都有橙眼, 说明Gene插在了2号或3号染色体上, 此时收橙眼、卷翅、肩部多毛的雄性果蝇与Balancer果蝇($\frac{IF; MKRS}{cyo; TM6B}$)多对多杂交, 得到F3果蝇, 通过F3代果蝇的表型, 可以知道Gene具体在2号还是3号染色体上

! 这里是使用cyo或TM6B作为平衡染色体 (IF或MKRS不完全重排, 不能完全防止重组)



⊗ 插入2号染色体情况:



可见, 当基因插入在2号染色体上时, 观察到在橙眼果蝇中可以伴随着棒眼或卷翅, 且可以同时观察到短毛和肩部多毛。在这种情况下, 在F3中筛选橙眼、卷翅、短毛、肩部多毛

的品系自交即可建系(卷翅基因在随后自交后可能会丢,但同时短毛和肩部多毛会稳定存在,作为2号染色体插入的标识)

⊙ 插入3号染色体情况:

F2	♂ ♂ $\frac{+}{cyo}, \frac{Gene}{TM6B}$		×	♀ ♀ $\frac{IF}{cyo}, \frac{MKRS}{TM6B}$
	↓			
	$\frac{+}{IF}, \frac{Gene}{MKRS}$	$\frac{+}{cyo}, \frac{Gene}{MKRS}$		$\frac{+}{IF}, \frac{Gene}{TM6B}$
	$\frac{+}{IF}, \frac{TM6B}{MKRS}$	$\frac{+}{cyo}, \frac{TM6B}{MKRS}$		$\frac{+}{cyo}, \frac{Gene}{TM6B}$
F3	$\frac{cyo}{IF}, \frac{Gene}{MKRS}$	$\frac{cyo}{cyo}, \frac{Gene}{MKRS}$ (×)		$\frac{+}{IF}, \frac{TM6B}{TM6B}$ (×)
	$\frac{cyo}{IF}, \frac{Gene}{MKRS}$	$\frac{cyo}{cyo}, \frac{Gene}{MKRS}$ (×)	✓	$\frac{+}{cyo}, \frac{TM6B}{TM6B}$ (×)
	$\frac{cyo}{IF}, \frac{TM6B}{MKRS}$	$\frac{cyo}{cyo}, \frac{TM6B}{MKRS}$ (×)		$\frac{cyo}{cyo}, \frac{Gene}{TM6B}$ (×)
	$\frac{cyo}{IF}, \frac{Gene}{MKRS}$	$\frac{cyo}{cyo}, \frac{TM6B}{MKRS}$ (×)		$\frac{cyo}{cyo}, \frac{TM6B}{TM6B}$ (×)

可见,当基因插入在3号染色体上时,观察到在橙眼果蝇中可以伴随着短毛或肩部多毛表型,并且可以同时观察到棒眼和卷翅。在这种情况下,在F3中筛选橙眼、棒眼、卷翅、肩部多毛的品系自交即可建系(肩部多毛的表型在随后自交后可能会丢,但同时棒眼和卷翅会稳定存在,作为3号染色体插入的标识)

- 果蝇4号染色体很小(仅其他染色体的 $\frac{1}{5}$ 长),通常不会插入到4号染色体上
- 4. 在F3代筛选到目标果蝇后,自交可得到F4, F4及其自交系即为稳定果蝇品系,在确保后代生长状态良好后,可安排进stock正常保系传代

使用浅红眼果蝇打定点插入:

