果蝇凋亡检测—Caspase-3 抗体染色法及 TUNEL 法

Detection of Apoptotic Cells in *Drosophila* by Anti-Caspase-3 Antibody-based Staining and TUNEL Assay

张松灵^{1, #}, 路春霖^{1, #}, 秘晓林^{1, 2, *}

¹基础医学院, 大连医科大学, 大连, 辽宁省; ²肿瘤干细胞研究院, 大连医科大学, 大连, 辽宁省

*通讯作者邮箱: bixl@dmu.edu.cn

#共同第一作者

引用格式: 张松灵, 路春霖, 秘晓林. (2019). 果蝇凋亡检测方法—Caspase-3 抗体染色法及 TUNEL 法. *Bio-101* e1010268. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010268.

How to cite: Zhang, S. L., Lu, C. L. and Bi, X. L. (2019). Detection of apoptotic cells in *Drosophila* by anti-Caspase-3 antibody-based staining and TUNEL assay. *Bio-101* e1010268. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010268. (in Chinese)

摘要: 细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞在基因控制下有序死亡的方式。本文介绍了两种检测果蝇细胞凋亡的方法。第一种方法使用抗 Caspase-3 抗体, 采用免疫荧光染色方法检测果蝇三期幼虫翅膀成虫盘中的凋亡。第二种方法是使用 TUNEL 法 (脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法) 鉴定 DNA 的断链。TUNEL 法可以半定量 DNA 损伤, 与免疫荧光染色方法相比, TUNEL 染色阳性的凋亡细胞更容易检测和鉴定。本章将依次对上述方法进行介绍。

关键词: 凋亡, Caspase-3, TUNEL, 果蝇

方法 1: 抗 Caspase-3 抗体染色检测果蝇幼虫翅膀成虫盘中的凋亡细胞

摘要: Caspase-3 是 Caspase 家族的一员, 作为效应 Caspase 在细胞凋亡中发挥作用。果蝇 DrICE 是 Caspase-3 的同源基因, 序列和功能高度保守。由于该保守特性, 虽然抗 Caspase-3 抗体并非来自果蝇, 诸多研究证实它可以用于检测果蝇中的凋亡现象, 并已成为检测果蝇凋亡的经典手段之一 (Liu 等, 2012; Fogarty 和 Bergmann, 2014)。目前已有商业化的抗 Caspase-3 抗体, 为检测提供了方便。

关键词: 凋亡, 果蝇翅膀成虫盘, 抗 Caspase-3 抗体

材料与试剂

1. 标准级显微镜载玻片(25 × 75mm, 厚度 1 mm ± 0.2 mm)
2. 盖玻片(22 × 22 mm)
3. 1.5 ml 离心管
4. 移液枪头
5. 果蝇三期幼虫
6. 1× PBS
7. Cleaved Caspase-3 (D175) Rabbit Antibody (Cell Signaling, catalog number: 9661L) (4 °C 保存)
8. Alexa Fluor(anti-rabbit) 488 (Cell Signaling, catalog number: 4412S) (4 °C 保存)
9. Alexa Fluor(anti-rabbit) 555 (Cell Signaling, catalog number: 4413S) (4 °C 保存)
10. 抗荧光淬灭剂 (Beyotime, catalog number: P0128-2) (-20 °C 保存)
11. 指甲油
12. 甲醛 (Sigma, catalog number: F8775)
13. Tween-20
14. BSA
15. 羊血清或马血清
16. 0.3% PBST (见溶液配方)
17. 固定液 (3.7%多聚甲醛) (见溶液配方)
18. 封闭液 (见溶液配方)

注：抗体用封闭液进行稀释。

仪器设备

1. 移液枪
2. 解剖镊
3. 解剖皿
4. 解剖镜 (奥林帕斯, model: SZ51-SET)
5. 转移脱色摇床 (奥豪斯, model: TS-8)
6. 正置荧光显微镜 (蔡司, model: Imager Z2)

实验步骤

1. 收集活跃的果蝇三期幼虫，使用辐照或羟基脲 (Hydroxyurea, HU) 处理实验组果蝇，诱导产生 DNA 损伤。将实验组果蝇和对照组果蝇幼虫放置于捣碎的食物中，25 °C 培养 4 h。
2. 挑取实验组和对照组果蝇幼虫各 15 只，用冷的 PBS 清洗虫体，放置到冷 PBS 中待解剖。对果蝇进行初步解剖：将虫体从中后部截断，用镊子抵住幼虫头部，用另一把镊子将虫体翻转套在抵住幼虫的镊子上，清除脂肪、肠道等组织，将成虫盘连同皮层放置于冰浴的含 1 ml PBS 的 1.5 ml 离心管中。

注：解剖后的组织可以在室温下放置 20 分钟，或在冰上放置不超过 1 小时。

3. 吸去上清，加入 800 μ l 3.7% 甲醛，放置于摇床上，室温慢速固定 20 rpm $\times$ 25 min。
4. 吸去上清，加入 800 μ l PBS，放置于摇床上，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 5 min，清洗 3 遍。
5. 加入 800 μ l 封闭液，室温封闭 1 h。
6. 吸去上清，加入 100 μ l 1:200 稀释的抗 Caspase-3 抗体，4 °C 孵育过夜。
7. 回收抗体。加入 800 μ l 封闭液，放置于摇床上，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 15 min。
8. 吸去上清，加入 200 μ l 1:400 稀释的 Alexa Fluor(anti-rabbit) 488 (绿色荧光) 或者 555 (红色荧光) 标记的二抗，放置于摇床上，室温避光孵育 20 rpm $\times$ 2 h。
9. 吸去二抗，加入 800 μ l 0.3% PBST，放置于摇床上，室温避光慢速清洗 20 rpm $\times$ 15 min，清洗 3 次。
10. 在平皿中加一滴 1 $\times$ PBS，进行第二次解剖，将翅膀成虫盘完整的解剖下来置于 PBS 液滴中。
11. 加一滴抗荧光淬灭剂于载玻片上，用镊子轻托翅膀成虫盘于载玻片，盖上盖玻片封片，四周涂上指甲油，4 °C 保存样品。

注：尽快进行拍照，样品保存不超过 3 天。

12. 使用正置荧光显微镜或共聚焦显微镜拍照。

正置荧光显微镜 (蔡司, Imager Z2) 工作条件：激发波长 520~560 nm，绿光；检测波长 570~620 nm，红光。结果如图 1 所示。

结果与分析

图 1. 抗 **Caspase-3** 抗体染色检测果蝇三期幼虫翅膀成虫盘的凋亡细胞. 使用正置荧光显微镜拍摄。40 Gy 辐照处理后，果蝇翅膀成虫盘的翅囊区出现抗 **Caspase-3** 抗体染色，即存在凋亡细胞，铰链区无凋亡信号。比例尺：100 μm 。

方法 2: TUNEL 法检测果蝇幼虫翅膀成虫盘中的凋亡细胞

摘要：凋亡细胞中染色体 DNA 断裂的形成是一个渐进过程。在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下,可以对 DNA 断裂缺口的 3'-OH 进行标记,借助荧光素等标记物,对凋亡细胞进行检测。TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP end nick labeling), 也称 DNA 缺口的末端标记法,将凋亡细胞的形态特征与生物化学特征结合在一起,可以检测到非常少量的凋亡细胞,灵敏度高,被广泛应用于凋亡细胞的检测 (Yung 等, 2009; Wang 等, 2013; Verghese 和 Su, 2016)。

关键词：凋亡，果蝇翅膀成虫盘，TUNEL

材料与试剂

1. 标准级显微镜载玻片 (25 × 75 mm, 厚度 1 mm ± 0.2 mm)
2. 盖玻片 (22 × 22 mm)
3. 1.5 ml 离心管

4. 平皿
5. 移液枪头
6. 果蝇三期幼虫
7. 1× PBS (4 °C 保存)
8. Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787) (常温保存)
9. 抗荧光淬灭剂 (Beyotime, catalog number: P0128) (-20 °C 保存)
10. TUNEL 试剂盒 (TMR-red; Roche, catalog number: 12156792910) (-20 °C 保存)
11. 指甲油
12. 甲醛 (Sigma, catalog number: F8775)
13. Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787)
14. 柠檬酸钠 (上海沪试)
15. 固定液 (3.7%多聚甲醛) (见溶液配方) (新鲜配制)
16. PBTx (见溶液配方) (4 °C 保存)
17. PBTx5 (见溶液配方) (4 °C 保存)
18. 柠檬酸钠溶液 (见溶液配方) (新鲜配制)

仪器设备

1. 移液枪
2. 解剖镊
3. 解剖皿
4. 解剖显微镜 (奥林帕斯, model: SZ51)
5. 转移脱色摇床 (奥豪斯, model: TS-8)
6. 加盖水浴锅 (37 °C)
7. 台式离心机 (赛多利斯, 1-14)
8. 金属浴 (65 °C)
9. 共聚焦显微镜 (徕卡, model: TCS SP5) 或正置荧光显微镜 (蔡司, mode: Imager Z2)

实验步骤

1. 挑取 DNA 损伤处理后的实验组和对照组果蝇三期幼虫各 15 只，用冷 PBS 清洗虫体，放置到冷 PBS 中。对果蝇进行初步解剖：将虫体从中后部截断，用镊子抵住幼虫头部，用另一把镊子将虫体翻转套在抵住幼虫的镊子上，清除脂肪、肠道等组织，将成虫盘连同皮层放置于冰浴的含 1 ml PBS 的 1.5 ml 离心管中。

注：解剖后的组织可以在室温下放置 20 分钟，或在冰上最多放置 1 小时。

2. 加入 800 μ l 固定液，放置于转移脱色摇床，室温慢速固定 20 rpm $\times$ 20 min。
3. 室温离心，1,000 $\times$ g 1 min，废弃液体。
4. 加入 800 μ l PBTx，放置于转移脱色摇床，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 10 min，清洗 3 次。
5. 室温离心，1,000 $\times$ g 1 min，废弃液体。
6. 加入 800 μ l PBTx5，放置于转移脱色摇床，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 5 min，废弃液体。
7. 加入 800 μ l 柠檬酸钠溶液，于 65 $^{\circ}$ C 金属浴孵育 30 min。
8. 室温离心，1,000 $\times$ g 1 min，废弃液体。
9. 加入 800 μ l PBTx，放置于转移脱色摇床，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 10 min，清洗 3 次。
10. 尽可能吸净上一步骤残余液体，使样本周围的区域干燥。
11. 加入 100 μ l TUNEL 反应混合物 (10 μ l 反应液 + 90 μ l 标记液)，轻弹混匀。反应混合物可在第 9 步提前配制，配制时于冰上操作，注意避光。
12. 在避光、湿润的环境中 (加盖水浴锅)，37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 或者过夜。
13. 室温离心，1,000 $\times$ g 1 min，废弃液体。
14. 加入 800 μ l PBTx，放置于转移脱色摇床，室温慢速清洗 20 rpm $\times$ 10 min，清洗 3 次。
15. 在干净平皿中加一滴 PBS，进一步解剖，将翅膀成虫盘与肌肉组织分离，待所有样品解剖完成后将其转移至滴加抗荧光淬灭剂的载玻片上。
16. 将盖玻片从一侧轻盖在样品上，避免组织变形，四周涂上指甲油，4 $^{\circ}$ C 保存样品。
17. 使用共聚焦显微镜或正置荧光显微镜拍照。

正置荧光显微镜 (蔡司, Imager Z2) 工作条件：激发波长 520~560 nm，绿光；检

测波长 570~620 nm, 红光。结果如图 2 所示。

共聚焦显微镜 (徕卡, TCS SP5) 工作条件: 激发波长 520~560 nm, 绿光; 检测波长 570~620 nm, 红光。结果如图 3 所示。

注: 尽快进行拍照, 样品保存不超过 3 天。

结果与分析

图 2. TUNEL 法检测果蝇凋亡细胞. 正置荧光显微镜拍摄。HU 药物处理 6 h 后, 果蝇翅膀成虫盘出现大量凋亡细胞。比例尺: 100 μm 。

图 3. TUNEL 法检测果蝇凋亡细胞。 共聚焦荧光显微镜拍摄。HU 药物处理 6 h 后，果蝇翅膀成虫盘出现大量凋亡细胞。比例尺：50 μm 。

注意事项

1. 解剖是本实验的第一个步骤，也是非常重要的一个步骤。当组织失去正常的营养交换开始死亡。在组织制备过程中，快速解剖和使用冰浴缓冲液可以减少解剖过程中产生的损伤。初步解剖需要将脂肪等能够吸收抗体的组织去除干净，以免影响孵育的效率。此外，需要用解剖镊轻轻将成虫盘暴露在外面，降低无关组织的掩盖或者遮挡。
2. 抗体孵育是免疫荧光染色的核心步骤。抗体的稀释倍数是其中很重要的一点，好的实验结果由强的阳性信号和低的染色背景组成。需要选择合适的一抗稀释倍数，实现较好的信噪比。不同来源的抗体可能有不同的最佳稀释倍数，需要通过预实验来确定。二抗稀释倍数可以根据说明书或者预实验来确定。二抗的孵育及之后的步骤都需要避光。
3. 样品的洗涤贯穿了整个实验，尽可能吸净上一步液体以减少对下一步实验的影响，并且注意样品没有丢失。
4. 压片是实验操作最后一个步骤，也是决定实验成败的最后一块砖石。要保证组织样品的完整性。在载玻片上滴加的抗荧光淬灭剂不能过多，防止组织滑动损伤。
5. 实验完成要尽快拍照，时间过长有可能导致荧光的淬灭，使照片质量下降。
6. 在 TUNEL 染色过程中可能出现标记不成功的现象，可以在步骤 7 中使用替代渗透

法，将样品置于 10 µg/ml 蛋白酶 K 的 PBTx 溶液中，室温孵育 3~5 min。

7. 如果 TUNEL 反应标记不明显，可以将成虫盘及其连接的肌肉组织共同解剖下来后，用解剖镊轻轻将成虫盘暴露在外；或者 PBTx5 孵育延长至 10 min。
8. TUNEL 检测用的柠檬酸钠溶液现配现用渗透效果最好；此外过夜孵育 TUNEL 反应液，可以使反应更加充分。

溶液配方

1. 0.3% PBST (4 °C 保存)
 - 1× PBS
 - 0.3% Tween-20
2. 封闭液 (新鲜配制)
 - 0.3% PBST + 1% BSA + 2% 羊血清；或 0.3% PBST + 5% 马血清
3. 固定液 (3.7% 多聚甲醛，1× PBS 新鲜配制)
 - 9.63 ml 1× PBS
 - 加 370 µl 甲醛 (Sigma)
4. PBTx
 - 100 ml 1× PBS
 - 加 100 µl Triton X-100 (Sigma)
 - 4 °C 保存
5. PBTx5
 - 100 ml 1× PBS
 - 加 500 µl Triton X-100 (Sigma)
 - 4 °C 保存
6. 柠檬酸钠溶液
 - 50 ml PBTx
 - 加 1.47 g 柠檬酸钠 (上海沪试)
 - 4 °C 保存

致谢

感谢实验室所有过去和现在成员的工作，完善了本文方法。这项工作得到了

国家重大基础研究项目-“973”项目 (2010CB934004)，国家自然科学基金项目 (31771437, 31501165, 31271480, 30871388)，中国科学院“百人计划”，辽宁省“攀登学者”的支持。

以上实验方法已在下列论文中使用：Liu 等 (2012)；Wang 等 (2013)。

作者贡献声明：本文中方法 1 由路春霖撰写，张松灵，路春霖修改；方法 2 由张松灵撰写，路春霖，张松灵修改。秘晓林审校。

参考文献

1. Fogarty, C. E. and Bergmann, A. (2014). [Detecting caspase activity in *Drosophila* larval imaginal discs](#). *Methods Mol Biol* 1133: 109-117.
2. Liu, W., Jiang, F., Bi, X. and Zhang, Y. Q. (2012). [Drosophila FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis](#). *Hum Mol Genet* 21(21): 4655-4668.
3. Verghese, S. and Su, T. T. (2016). [Drosophila Wnt and STAT define apoptosis-resistant epithelial cells for tissue regeneration after irradiation](#). *PLoS Biol* 14(9): e1002536.
4. Wang, Y., Wang, Z., Joshi, B. H., Puri, R. K., Stultz, B., Yuan, Q., Bai, Y., Zhou, P., Yuan, Z., Hursh, D. A. and Bi, X. (2013). [The tumor suppressor Caliban regulates DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent and -independent activity](#). *Oncogene* 32(33): 3857-3866.
5. Yung, Y. C., Kennedy, G. and Chun, J. (2009). [Identification of neural programmed cell death through the detection of DNA fragmentation in situ and by PCR](#). *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3: Unit 3.8.