果蝇幼虫翅成虫盘的 EdU 标记和免疫荧光染色

EdU Labeling and Immunofluorescent Staining of *Drosophila* Larval Wing Imaginal Disc

苗晨*, 杨小杭, 戈万忠*

遗传学研究所, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: miaochen-555@qq.com; wanzhongge@zju.edu.cn

引用格式: 苗晨, 杨小杭, 戈万忠. (2019). 果蝇幼虫翅成虫盘的 EdU 标记和免疫荧光染色. *Bio-101* e1010277. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010277.

How to cite: Miao, C., Yang, X. H. and Ge, W. Z. (2019). EdU labeling and immunofluorescent staining of *Drosophila* larval wing imaginal disc. *Bio-101* e1010277. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010277. (in Chinese)

摘要: EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶类似物, 能够在 DNA 复制时代替胸腺嘧啶 T 插入正在合成的分子中, 后续再通过显色, 标记出正在进行 DNA 复制的细胞, 是一种很好的检测细胞增殖能力的方法。与其他抗体的共染, 达到了其他蛋白与增殖细胞共同标记的目的。果蝇幼虫的翅成虫盘(wing imaginal disc)由高度增殖的上皮细胞组成, 解剖方便, 是研究生长发育的很经典的组织模型 (Cohen, 1993; Beira 和 Paro, 2016)。

关键词: 果蝇翅成虫盘, EdU, 免疫荧光染色

材料与试剂

1. 各种规格枪头 (配套移液枪)
2. 各种规格 EP 管
3. 载破片
4. 盖破片
5. 三龄果蝇幼虫
6. NaCl (国药沪试, catalog number: 10019318)
7. KCl (生工, catalog number: PB0440)
8. Na₂HPO₄ (生工, catalog number: S0404)

9. KH_2PO_4 (生工, catalog number: PB0445)
10. Schneider 昆虫培养基 (Sigma, catalog number: S9895)
11. 8% PFA 溶液 (8% Paraformaldehyde aqueous solution) (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 157-8)
12. Triton X-100 (生工, catalog number: A110694-0100)
13. Bovine serum albumin (BSA) (生工, catalog number: A600332-0100)
14. 一抗
15. 荧光二抗
16. DAPI (Sigma, catalog number: D9542)
17. 抗淬灭剂: VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (VECTOR, catalog number: H-1000)
18. ddH₂O
19. Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit (Invitrogen, catalog number: C10338)
20. 1× PBS, pH 7.4 (见溶液配方)
21. SD 溶液 (见溶液配方)
22. 4% PFA 溶液 (见溶液配方)
23. 0.1% PBT (见溶液配方)
24. 0.5% PBT (见溶液配方)
25. 3% BSA blocking buffer (见溶液配方)
26. Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit (见溶液配方)
27. DAPI 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀
2. 体式显微镜 (Nikon)
3. 精细解剖镊× 2
4. 解剖板
5. 各量程移液枪
6. 滚轴 (海门市其林贝尔仪器制造公司, SRT-202 滚轴式混合器)

7. 激光共聚焦显微镜 (Olympus, FV1000)

实验步骤

一、EdU 标记

先在解剖板中加入适量的 SD 溶液，取适量 (5~20 只，依操作者熟练程度和实验需求 wing disc 数而定) 特定基因型的三龄果蝇幼虫置于解剖板中，使幼虫被 SD 培养液完全浸润，进行快速粗解剖。在幼虫前 1/3 处截断幼虫，丢弃其余尾部 2/3 的部分，取下带有 wing disc 的头部 1/3 组织，使用镊子小心翻转组织，类似于内外翻转手套或者袜子的样子，使其外皮翻入内侧，而内脏翻到外侧，置于含有 SD 培养液的 600 μ l EP 管中，待收集足够只数的头部 1/3 组织，按 1:1,000 加入 EdU (A 溶液，试剂盒提供)，常温在滚轴上滚动 EP 管，作用 30 min。

注：解剖快速，解剖液必须是能保持果蝇组织离体后仍可以继续生长的培养液，EdU 作用时间也要严格控制。

二、固定组织

1. SD 培养液清洗两次，每次 5 min。

注：在本步及之后的所有洗涤，反应步骤中请注意，需要 EP 管在滚轴上滚动进行，移液时可使 EP 管正立于 EP 管架上，静置小段时间使组织自然沉底，再使用 200 μ l 的移液枪小心地移去上方液体 (可以留有残余液体，首先保证不要戳到或吸走组织)，留下组织，再加入所述对应的溶液。

2. 4% PFA 溶液固定组织 15~20 min。(通风橱操作)

3. 0.1% PBT 快洗三次。(通风橱操作)

注：快洗即每次只需上下轻柔翻转 EP 管 2 次。

4. 于滚轴上 0.1% PBT 慢洗三次，每次 10 min。

三、免疫荧光染色

1. 3% BSA blocking buffer 封闭 30 min。

注：封闭的作用是减少后续步骤中抗体的非特异性结合。

2. 吸走 blocking buffer，加入一抗 (按比例用 3% BSA blocking buffer 稀释)

孵育, 4 °C 过夜或常温 4 h, 一抗可以回收再利用。

3. 0.1% PBT 慢洗三次, 每次 10 min。
4. 加入荧光二抗 (按比例用 3% BSA blocking buffer 稀释), 常温 1h30min。
注: 此处选择 CY3 以外的荧光二抗, 切忌与 EdU kit 荧光相同, 此后步骤均要注意避光操作。
5. 1:2,000 加入 DAPI (0.1% PBT 稀释), 作用 20 min。
6. 0.1% PBT 慢洗三次, 每次 10 min。

四、EdU 显色

1. 0.5% PBT 作用 15~20 min。
注: 此处应严格控制时间, 避免过强的通透作用破坏细胞自发荧光。
2. 3% BSA blocking buffer 清洗两次, 每次 5 min。
3. 加入 EdU 显色反应液, 常温反应 30 min, 在滚轴上滚动。
注: 显色反应液试剂盒提供, 现用现配, 避光操作: 1× D 溶液 430 μl, E 溶液 20 μl, B 溶液 1.2 μl, 1× F 溶液 50 μl, 充分混合, 共 501.2 μl。
4. 3% BSA blocking buffer 清洗两次, 每次 5 min。
5. 0.1% PBT 慢洗三次, 每次 10 min。
6. 抗淬灭剂中保存组织, 浸没组织即可, 4 °C 避光保存。

五、制片与观察

1. 待抗淬灭剂浸透组织后 (通常 4 °C 过夜), 用剪掉最尖端部分的 200 μl 黄枪头, 作为吸管小心吸取 EP 管内幼虫组织到载玻片上, 使用细解剖镊将 wing disc 单独解剖出来制片, 盖玻片盖片。
2. 激光共聚焦显微镜观察, 拍照。

结果与分析

如图 1 所示为 *en-Gal4>UAS-GFP* 的三龄幼虫翅成虫盘, EdU 与 GFP, CI 共染结果。GFP 标记翅成虫盘 posterior 区域, CI 标记翅成虫盘 anterior 区域, EdU 标记 S 期细胞。

图 1. 翅成虫盘细胞 EdU 标记. 图为果蝇三龄幼虫翅成虫盘结构, 基因型为: *en-Gal4>UAS-GFP*。蓝色 DAPI 标记 DNA, 白色为 anti-CI 染色, 绿色为 GFP, 即 Gal4 表达位置, 红色为 EdU 标记。标尺: 50 μ m。

失败经验

1. 组织的自发荧光可能会遭到一定程度的破坏, 如果有自发 GFP, 建议用 chicken anti-GFP 的一抗将 GFP 再染一次。
2. EdU 标记与显色时, 保证每个组织细胞都均匀的与溶液接触, 即样品要在滚轴上滚动并严格控制时间。
3. Invitrogen 公司提供不同荧光的 kit, 切忌 kit 荧光与所染抗体荧光相同, F 溶液易变质, 变黄则变质, 所以要分装小管, 避免反复冻融。
4. 注意避光操作, 防止荧光淬灭。

溶液配方

1. 1 $\times$ PBS (pH 7.4)
137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄
2. SD 溶液
购买 Schneider 昆虫培养基 (Sigma, S9895), 按公司提供 protocol 配制培养液
3. 4% PFA 溶液
8% PFA 用 1 $\times$ PBS 稀释为 4% PFA, 常温保存

4. 0.1% PBT

0.1% Triton X-100 in 1× PBS, 常温保存

5. 0.5% PBT

0.5% Triton X-100 in 1× PBS, 常温保存

6. 3% BSA blocking buffer

3% BSA in 0.1% PBT, 4 °C 保存

7. Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit (Invitrogen, C10338)

此试剂盒提供 A-G 试剂, 按照说明将粉末溶解为液体:

A 溶液: EdU(A) 5 mg 粉末, 加入 2 ml DMSO (C) 溶解, 分装, -20 °C 保存, 保质期一年

B 溶液: Alexa Fluor™ azide (B) 加入 70 µl DMSO (C) 溶解, -20 °C 避光保存, 保质期一年

C 溶液: DMSO

D 溶液: 10× Click-iT™ EdU reaction buffer, 4 °C 保存, 用时 ddH₂O 稀释为 1×, 保质期半年

E 溶液: CuSO₄ 溶液, 4 °C 保存

F 溶液: Click-iT™ EdU buffer additive (F) 400 mg 粉末, 加入 2 ml ddH₂O 溶解后为 10× F, 分装, 避免反复冻融, -20 °C 保存, 保质期一年, 用时 ddH₂O 稀释为 1×

G 溶液: Hoechst 33342 (选用)

8. DAPI 溶液

DAPI 粉末加 ddH₂O 加热溶解配制为 20 mg/ml stock, 分装, -20 °C 避光保存, 按 1:2,000 比例使用

致谢

本实验方法参考已发表文章 (Deng 等, 2016) 中的实验方法。基金支持来自国家自然科学基金面上项目 31371319。在此一同表示感谢。

参考文献

1. Beira, J. V. and Paro, R. (2016). [The legacy of *Drosophila* imaginal discs. Chromosoma 125\(4\): 573-592.](#)

2. Cohen, S. (1993). Imaginal disc development. In: Bate, M. and Martinez-Arias, A. (Eds.). The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Deng, Q., Guo, T., Zhou, X., Xi, Y., Yang, X. and Ge, W. (2016). [Cross-talk between mitochondrial fusion and the hippo pathway in controlling cell proliferation during *Drosophila* development.](#) *Genetics* 203: 1777-1788.