果蝇细胞周期检验点检测—EdU 法、BrdU 法及 p-H3 抗体法

Detection of Cell Cycle Checkpoint in *Drosophila* by EdU Assay, BrdU Assay and Anti-Phosphorylated Histone 3 Antibody Staining

王清华^{1, #}, 徐起^{1, #}, 秘晓林^{1, 2, *}

¹基础医学院, 大连医科大学, 大连, 辽宁省; 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: 王清华, 徐起, 秘晓林. (2019). 果蝇细胞周期检验点检测—EdU 法、BrdU 法及 p-H3 抗体法. *Bio-101* e1010293. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010293.

How to cite: Wang, Q. H., Xu, Q. and Bi, X. L. (2018). Detection of cell cycle checkpoint in *Drosophila* by EdU assay, BrdU assay and anti-Phosphorylated histone 3 antibody staining. *Bio-101* e1010293. Doi: 10.21769/BioProtoc.10101293. (in Chinese)

摘要: 细胞周期指细胞从第一次分裂结束产生新细胞到第二次分裂结束所经历的全过程, 细胞周期进程中存在多个检验点。在 G1 期和 S 期之间存在 DNA 合成起始转换点, 简称 S 期检验点; 在 G2 期和 M 期之间存在有丝分裂诱导转换点, 简称 G2/M 检验点。检测 S 期检验点通常采用 BrdU 或 EdU 方法。BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine) 全称 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷, EdU(5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine) 全称 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷, 它们均为胸腺嘧啶类似物, 能够在 S 期替代胸腺嘧啶 (T) 掺入正在复制的 DNA 中。BrdU 可以使用抗 BrdU 单克隆抗体检测, EdU 通过与分子染料的共轭结合, 高效、快速检测细胞中的 DNA 复制。在有丝分裂期组蛋白 3-H3Ser10 被磷酸化修饰, 这是细胞有丝分裂进程中的特征性事件。检测 G2/M 检验点通常使用抗磷酸化组蛋白 3-H3Ser 10 抗体 (p-H3) 免疫染色方法, 通过对阳性细胞进行计数, 分析细胞是否进行了正常的有丝分裂。本文将依次对上述方法进行介绍。

关键词: S 期检验点, G2/M 检验点, BrdU, EdU, p-H3

方法 1: EdU 法检测果蝇幼虫眼成虫盘 S 期检验点

摘要: 使用 EdU 法检测果蝇幼虫眼成虫盘中的 S 期检验点 (Daul 等, 2010; Song 等,

2018)。

材料与试剂

1. 盖玻片(22 × 22 mm)
2. 标准级显微镜载玻片(25 × 75 mm, 厚度 1 mm ± 0.2 mm)
3. 解剖皿
4. 1.5 ml 离心管
5. 果蝇三期幼虫
6. 羟基脲 (Hydroxyurea, HU)
7. 果蝇食物
8. 1× PBS
9. Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787)
10. 1× Click reaction buffer
11. CuSO₄
12. Alexa Fluorazide
13. Reaction buffer additive
14. SFX-Insect 培养液 (HyClone, catalog number: SH30278.02) (4 °C 保存)
15. Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen, catalog number: C10337) (4 °C 保存) (见溶液配方)
16. 抗荧光淬灭剂 (Beyotime, catalog number: P0128) (-20 °C 保存)
17. 指甲油
18. 0.5% PBST (见溶液配方)
19. 3% BSA (见溶液配方)
20. 3.7%甲醛 (新鲜配制) (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊
2. 解剖显微镜 (奥林帕斯, model: SZ51)
3. 转移脱色摇床 (奥豪斯, model: TS-8)

4. 共聚焦显微镜 (徕卡, model: TCS SP5) 或正置荧光显微镜 (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 2 h。
2. 挑取实验组和对照组果蝇幼虫各 15 只, 在装有 1× PBS 的解剖皿中一次解剖果蝇幼虫, 将幼虫眼成虫盘和肌肉组织一起解剖出来, 清除干净脂肪, 放入含有 1 ml SFX-Insect 培养液的离心管中。
3. 加入 1 µl 10 mM EdU 溶液, 放置于摇床上, 室温慢速孵育 20 rpm/min × 30 min。
4. 吸去上清, 加入 1 ml 3.7% 甲醛溶液, 放置于摇床上, 室温慢速固定 20 rpm/min × 15 min。
5. 吸去上清, 加入 1 ml 3% BSA 溶液, 清洗 2 遍。
6. 吸去上清, 加入 1 ml 0.5% PBST, 放置于摇床上, 室温慢速通透处理 20 rpm/min × 20 min。
7. 吸去上清, 加入 1 ml 3% BSA 溶液, 清洗 2 遍。
8. 吸去上清, 加入 100 µl Click 反应液, 室温避光孵育 30 min。
9. 吸去上清, 加入 1 ml 3% BSA 溶液, 清洗 1 遍。
10. 在平皿中加一滴 1× PBS, 二次完全解剖幼虫眼成虫盘。
11. 加一滴抗荧光淬灭剂于载玻片上, 转移幼虫眼成虫盘至抗荧光淬灭剂中。盖上干净的盖玻片, 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. 显微镜观察 (图 1)。

图 1. EdU 法检测果蝇三期幼虫眼成虫盘的 S 期检验点. 在 HU 药物处理后, 位于眼成虫盘形态发生沟前区的 EdU 阳性细胞数明显减少, 荧光强度明显减弱。比例尺: 50 μ m。

方法 2: BrdU 法检测果蝇幼虫脑组织 S 期检验点

摘要: 使用 BrdU 法检测果蝇大脑组织中的 S 期检验点 (Jaklevic 和 Su, 2004; Song 等, 2018)。

材料与试剂

1. 解剖皿
2. 标准级显微镜载玻片 (25 × 75 mm, 厚度 1 mm ± 0.2 mm)
3. 盖玻片 (22 × 22 mm)
4. 1× PBS
5. Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787)
6. SFX-Insect 培养液 (HyClone, catalog number: SH30278.02) (4 °C 保存)
7. 3.0 N HCl
8. 羊血清
9. BrdU (Roche, catalog number: 10280879001)
10. anti-BrdU 抗体 (Sigma, catalog number: B2531)
11. 二抗 (相应于一抗)
12. Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, catalog number: 4408S) (4 °C 保存)
13. 抗荧光淬灭剂 (Beyotime, catalog number: P0128) (-20 °C 保存)

14. 指甲油
15. 0.3% PBST (见溶液配方)
16. 3.7%甲醛 (新鲜配制) (见溶液配方)
17. 封闭液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊
2. 解剖显微镜 (奥林帕斯, model: SZ51)
3. 转移脱色摇床 (奥豪斯, model: TS-8)
4. 共聚焦显微镜 (徕卡, model: TCS SP5) 或正置荧光显微镜 (蔡司, model: 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, 在装有 1× PBS 的解剖皿中一次解剖果蝇幼虫, 将大脑和肌肉组织一起解剖出来, 清除干净脂肪, 放入含有 1 ml SFX-Insect 培养液的离心管中。
2. 加入 40 μ l 10 mg/ml BrdU 母液, 放置于摇床上, 室温慢速孵育 20 rpm/min $\times$ 15 min。
3. 吸去上清, 加入 800 μ l 3.7% 甲醛溶液, 放置于摇床上, 室温慢速固定 20 rpm/min $\times$ 20 min。
4. 吸去上清, 加入 800 μ l 0.3% PBST 溶液, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min, 清洗 3 遍。
5. 吸去上清, 加入 200 μ l 3.0 N HCl, 室温浸泡 30 min。
6. 吸去上清, 加入 800 μ l 0.3% PBST 溶液, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min, 清洗 3 遍。
7. 吸去上清, 加入 800 μ l 封闭液, 放置于摇床上, 室温慢速孵育 20 rpm/min $\times$ 2 h。
8. 吸去上清, 加入 100 μ l 1:200 稀释的抗 BrdU 抗体, 4 °C 孵育过夜,
9. 回收抗体。加入 800 μ l 0.3% PBST 溶液, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min, 清洗 3 遍。
10. 吸去上清, 加入 200 μ l 1:400 稀释的抗一抗种属的相应二抗, 室温避光孵育 2 h。

11. 吸去上清, 加入 800 μ l 0.3% PBST 溶液, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min, 清洗 3 遍。
12. 在干净平皿中加一滴 1 $\times$ PBS, 二次完全解剖大脑组织。
13. 加一滴抗荧光淬灭剂于载玻片上, 用镊子轻托大脑至抗荧光淬灭剂中。盖上干净的盖玻片, 四周涂上指甲油, 4 $^{\circ}$ C 保存样品。
注: 尽快进行拍照, 样品保存不超过 3 天。
14. 显微镜观察 (图 2)。

图 2. BrdU 法检测果蝇三期幼虫大脑组织 S 期检验点. 在 HU 药物处理后, 大脑组织的 BrdU 阳性细胞数明显减少, 荧光强度明显减弱。比例尺: 50 μ m。

方法 3: p-H3 抗体检测果蝇幼虫翅膀成虫盘 G2/M 检验点

摘要: 使用抗磷酸化组蛋白 3-H3Ser10 抗体 (p-H3) 免疫染色方法检测 G2/M 检验点 (Liu 等, 2012; Yuan 等, 2018)。

材料与试剂

1. 标准级显微镜载玻片 (25 $\times$ 75 mm, 厚度 1 mm $\pm$ 0.2 mm)
2. 盖玻片 (22 $\times$ 22 mm)
3. 解剖皿
4. 1.5 ml 离心管
5. 果蝇三期幼虫
6. 1 $\times$ PBS
7. Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787)
8. 3.7% 甲醛 (新鲜配制)

9. 二抗 (相应于一抗)
10. Anti-phospho Histone H3 (Ser10) antibody (Millipore, catalog number: 2900699) (4 °C 保存)
11. Alexa Fluor (anti-rabbit)488 (Cell Signaling Technology, catalog number: 4412S) (4 °C 保存)
12. 抗荧光淬灭剂 (Beyotime, catalog number: P0128) (-20 °C 保存)
13. 指甲油
14. 0.3% PBST (见溶液配方)
15. 封闭液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 解剖镊
2. 解剖显微镜 (奥林帕斯, model: SZ51-SET)
3. 转移脱色摇床 (奥豪斯, model: TS-8)
4. 共聚焦显微镜 (徕卡, model: TCS SP5) 或正置荧光显微镜 (蔡司, model: 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, 在装有 1× PBS 的解剖皿中一次解剖果蝇幼虫, 将翅膀成虫盘和肌肉组织一起解剖出来, 清除干净脂肪, 放置于冰浴的 1.5 ml 离心管中。
2. 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/min $\times$ 20 min。
3. 吸去上清, 加入 800 μ l 0.3% PBST, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min, 清洗 3 次。
4. 吸去上清, 加入 800 μ l 封闭液, 室温封闭 1 h。
5. 吸去上清, 加入 100 μ l 1:100 稀释的抗 p-H3 抗体, 4 °C 孵育过夜。
6. 回收抗体。加入 800 μ l 0.3% PBST, 放置于摇床上, 室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 10 min 清洗 3 次。

7. 吸去上清，加入 800 μ l 封闭液，放置于摇床上，室温慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 15 min。
8. 吸去上清，加入 200 μ l 1:400 稀释的抗一抗种属的相应二抗，室温避光孵育 2 h。
9. 吸去上清，加入 800 μ l 0.3% PBST，放置于摇床上，室温避光慢速清洗 20 rpm/min $\times$ 15 min，清洗 3 次。
10. 在平皿中加一滴 1 $\times$ PBS，二次完全解剖翅膀成虫盘。
11. 加一滴抗荧光淬灭剂于载玻片上，用镊子轻托样品至抗荧光淬灭剂中。盖上干净的盖玻片，四周涂上指甲油，4 $^{\circ}$ C 保存样品。
12. 显微镜观察 (图 3)。

图 3. 抗 p-H3 抗体染色检测果蝇三期幼虫翅膀成虫盘 G2/M 检验点. 共聚焦显微镜拍摄，HU 处理后，果蝇翅膀成虫盘中阳性信号明显减少。比例尺：50 μ m。

注:

- 1) 解剖是实验成功的关键。第一次解剖时，将成虫盘或大脑与肌肉一起解剖，并使成虫盘或大脑尽可能暴露，剔除干净周围脂肪组织，有助于减少非特异结合。
- 2) 吸去上一步液体时，去除干净残留液体，包括离心管盖子里的液体，减少残留液体对下一步实验操作的影响。
- 3) 进行通透处理时，孵育时间要恰当，避免孵育时间过长，造成通透过度。
- 4) Click 反应液现配现用，使用前 15 min 内配制。

- 5) 操作要准确、快速，减少样品暴露在光照下的时间。
- 6) 转移成虫盘或大脑样品至载玻片时，携带的液体宜少，以免盖玻片滑动损伤样品。注意枪头中是否有未转移的成虫盘或大脑样品，如果有，要重新转移样品。
- 7) 封片动作要轻柔，以免盖玻片滑动损坏样品。
- 8) 尽快进行拍照，样品保存不超过 3 天。

溶液配方

1. 0.5% PBST (EdU 染色专用)
 - 99.5 ml 1× PBS
 - 0.5 ml Triton X-100 (Sigma, T8787)
 - 4 °C 保存
2. 3% BSA (EdU 染色专用)
 - 0.03 g BSA
 - 1 ml 1× PBS
 - 现配现用
3. Click 反应液 (EdU 染色专用)
 - 430 µl 1× Click reaction buffer
 - 20 µl CuSO₄
 - 1.2 µl Alexa Fluorazide
 - 50µl Reaction buffer additive
 - 用前 15 min 内配制
4. 3.7% 甲醛
 - 9.6 ml 1× PBS
 - 0.4 ml 甲醛 (Sigma, F8775)
 - 现配现用
5. 0.3% PBST
 - 99.7 ml 1× PBS
 - 0.3 ml Triton X-100
 - 4 °C 保存
6. 封闭液 (p-H3 染色专用)

950 μ l 0.3% PBST

50 μ l 羊血清

现配现用

7. 封闭液 (BrdU 染色专用)

90 ml 0.3% PBST

10 ml 羊血清

现配现用

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)；Song 等 (2018)；Yuan 等 (2018)。

作者贡献声明：本文中方法 1，2 由王清华撰写，徐起，王清华修改；方法 3 由徐起撰写，王清华，徐起修改；秘晓林审校。

参考文献

1. Daul, A. L., Komori, H. and Lee, C. Y. (2010). [EdU \(5-ethynyl-2'-deoxyuridine\) labeling of *Drosophila* mitotic neuroblasts](#). *Cold Spring HarbProtoc* 2010(7): pdb prot5461.
2. Jaklevic, B. R. and Su, T. T. (2004). [Relative contribution of DNA repair, cell cycle checkpoints, and cell death to survival after DNA damage in *Drosophila* larvae](#). *Curr Biol* 14(1): 23-32.
3. 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.
4. Song, F., Li, D., Wang, Y. and Bi, X. (2018). [Drosophila Caliban mediates G1-S transition and ionizing radiation induced S phase checkpoint](#). *Cell Cycle* 17(18): 2256-2267.

5. Yuan, Q., Tian, R., Zhao, H., Li, L. and Bi, X. (2018). [Multiple arginine residues are methylated in *Drosophila* Mre11 and required for survival following ionizing radiation.](#) *G3 (Bethesda)* 8(6): 2099-2106.