果蝇肠上皮损伤再生模型实验方法

A Method for Damage-induced Regeneration of the Intestinal Epithelium in *Drosophila*

胡九龙, 裘荣文*

北京生命科学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: xirongwen@nibs.ac.cn

引用格式: 胡九龙, 裘荣文. (2019). 果蝇肠上皮损伤再生模型实验方法. *Bio-101* e1010303. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010303.

How to cite: Hu, J. L. and Xi, R. W. (2019). A method for damage-induced regeneration of the intestinal epithelium in *Drosophila*. *Bio-101* e1010303. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010303. (in Chinese)

摘要: 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 是葡聚糖的聚阴离子衍生物, 已被广泛用于建立结肠炎的动物模型。给果蝇喂食 DSS 同样能诱导果蝇肠道炎症和损伤, 随后激活肠道干细胞加速肠道上皮增生和修复。DSS 诱导的肠道损伤和再生模型为研究干细胞的调控及上皮的再生机制提供了一个相对简单的实验动物模型。

关键词: 果蝇, 肠上皮, DSS, 再生

材料与试剂

1. 色谱层析滤纸 (chromatography paper, Fisher, Code: 69)
2. 载玻片 (Fan Yi, catalog number: 7105P)
3. 盖玻片 (Henso, catalog number: 7201)
4. 培养瓶 (BIOLOGIX, catalog number: 51-0500)
5. EP 管 (美国 AXYGEN 公司, catalog number: MCT-200-C)
6. 3~5 天的雌果蝇
7. DSS (36,000~50,000 M.Wt., MP Biomedicals, catalog number: 9011-18-1)
8. 葡萄糖 (Sigma-Aldrich, catalog number: S7903)
9. 实验用抗体:
 Anti-Prospero(DSHB, MR1A)
 Goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa 568 (Molecular Probes, catalog

number: A11036)

10. 酵母 (英国 OXOID 公司, catalog number: LP0021)
11. PBS (Solarbio, catalog number: P1020)
12. DAPI (Sigma-Aldrich, catalog number: D9542)
13. 37%多聚甲醛 (Sigma-Aldrich, catalog number: F1635)
14. 正庚烷 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 80066918)
15. 甲醇 (北京化工厂, catalog number: B0301005)
16. 羊血清 (NGS, Cell Signaling Technology, catalog number: 5425)
17. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: T9248)
18. 5% DSS 溶液 (见溶液配方)
19. 5%葡萄糖溶液 (见溶液配方)
20. 封片溶液 (见溶液配方)
21. PBT 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 电子天平 (无锡英衡电子有限公司)
2. 移液枪 (法国 GILSON PIPETMAN)
3. 镊子 (瑞士 Dumont 公司)
4. 摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司)
5. 通风橱 (北京中联科仪科技有限公司)
6. 4 °C 冰箱 (中国海尔集团)
7. 显微镜 (Nikon A1-R confocal microscope)

实验步骤

1. 挑选 3~5 天的雌果蝇, 将已经用水湿润的滤纸放入培养瓶中, 饥饿处理 10 小时。
2. 对照组果蝇空管中滴加 500 μ l 5%的葡萄糖溶液的色谱层析滤纸 (大小为 2.5 cm $\times$ 3.75 cm); 实验组果蝇管中滴加 500 μ l 5% DSS 和 500 μ l 5%葡萄糖溶液的滤纸 (大小为 2.5 cm $\times$ 3.75 cm), 果蝇每天换管和相对应新的滴有溶液的色谱层析滤纸, 于 29 °C 下处理两天。
3. 两天后, 将果蝇转移到正常食物管中培养, 添加少许酵母, 培养 7~14 天。

4. 取 400 μ l PBS 溶液于 EP 管中。
5. 用镊子将肠道取出放入 EP 管中。果蝇肠道详细解剖步骤见 Chen 等 (2016a) 发表的论文。
6. 在 EP 管中加入 60 μ l 37%甲醛和 500 μ l 100%正庚烷，在摇床上避光 30 分钟。
7. 在通风橱中弃掉全部液体。
8. 在 EP 管中加入 500 μ l 100%甲醇和 500 μ l 100%正庚烷，用手剧烈摇晃 30 秒。
9. 在通风橱中弃掉全部液体。
10. 在 EP 管中加入 1 ml 100%甲醇，在摇床上避光 5 分钟。
11. 弃掉全部液体，重复步骤 10 一次。
12. 用 1 ml PBT 洗涤两次，每次 5 分钟。
13. 封闭：在 EP 管中加入 300 μ l PBT 和 15 μ l normal goat serum 于摇床上避光 60 分钟。
14. 染一抗：在 EP 管中直接加入一抗，于 4 °C 摇床上避光过夜。
15. 弃掉全部液体，用 1 ml PBT 洗涤三次，每次 5 分钟。
16. 染二抗：在 EP 管中直接加入 300 μ l PBT 和 1 μ l 二抗，在摇床上避光 2 小时。
17. 弃掉全部液体，用 1 ml PBT 洗涤 2 次，每次 5 分钟。
18. 在 EP 管中加入 300 μ l PBT 和 1 μ l DAPI 于摇床上反应 5 分钟。
19. 用 1 ml PBT 洗涤两次，每次 5 分钟。
20. 加两滴封片溶液于 EP 管中，于 4 °C 冰箱中保存 20 分钟。
21. 制片，在显微镜下观察。

结果与分析

本实验方法参考 Amcheslavsky 等 (2009) 和 Chen 等 (2016b) 发表的论文。果蝇肠道是由平滑肌围裹的单层管状上皮结构构成。果蝇的肠腔由内到外分别为围食膜、肠上皮层、基底膜和平滑肌层。肠道细胞中的多功能肠道干细胞 (intestinal stem cells, ISCs) 通过有丝分裂产生新的干细胞和子代细胞,称之为肠母细胞或中间过渡型细胞 (enteroblast, EB)。EB 细胞进一步分化成具有营养吸收功能的肠上皮细胞 (enterocytes, ECs) 和肠内分泌细胞 (enteroendocrine cell, EE), 两者分别由 Pdm1 和 Prospero 蛋

白标记。EC 细胞占肠道总细胞数量的 90%，是多倍体细胞，具有较大的细胞核。ISC 和 EB 细胞 (统称为前体细胞) 以及 EE 细胞为二倍体，具有较小的细胞核。

DSS 处理的果蝇后两天与对照组比较能观察到 *esg* (*esgGal4*, UAS-GFP) 表达的细胞 (ISC 和 EB) 增多，显微镜下 GFP 阳性细胞相对数量会显著增多 (图 1)。

图 1. DSS 处理的果蝇肠道 ISC 和 EB 细胞增多

注意事项

1. 实验用 DSS 的分子量比较关键，根据我们的经验 40 KDa 的效果比较好。
2. 5% DSS 处理的两天一般为损伤期，处理后 1~2 天一般为恢复期。
3. 根据我们的经验，5% DSS 处理两天后果蝇死亡率大概为 10%。
4. 由于肠道中各区段干细胞的活性不一，DSS 处理后的不同区段的反应程度也会有差异。

溶液配方

1. 5% DSS 溶液

溶解 100 mg DSS 于 2 ml 无菌的水中，使用前溶液保存在 4 °C，最好现配现用

2. 5%葡萄糖溶液

溶解 100 mg 葡萄糖于 2 ml 无菌的水中，使用前溶液保存在 4 °C，最好现配现用

3. 封片溶液

用甘油和 1× PBS 溶液体积比 7:3 配成

4. PBT 溶液

在 100 ml 1× PBS 中加入 0.1 ml Triton X-100 混匀

致谢

感谢金真为本文提供图片。

参考文献

1. Amcheslavsky, A., Jiang, J. and Ip, Y. T. (2009). [Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*](#). *Cell Stem Cell* 4(1): 49-61.
2. Chen, J., Li, J., Huang, H. and Xi, R. (2016a). [Gene expression analysis of sorted cells by RNAseq in *Drosophila* intestine](#). *Bio-protocol* 6(24): e2079.
3. Chen, J., Xu, N., Huang, H., Cai, T. and Xi, R. (2016b). [A feedback amplification loop between stem cells and their progeny promotes tissue regeneration and tumorigenesis](#). *Elife* 5: e14330.