细胞增殖的 EdU 荧光标记法

EdU Fluorescence Labeling for Cell Proliferation

何璐薇^{1,2}, 赵宏伟⁴, 林谋斌^{1,2,3,*}

1. 临床研究与转化医学中心, 同济大学附属杨浦医院, 上海; 2. 胃肠外科和转化医学研究所, 同济大学医学院, 上海; 3. 普外科, 同济大学附属杨浦医院, 上海; 4. 化学生物学技术平台, 中科院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: lmubin@hotmail.com

引用格式: 何璐薇, 赵宏伟, 林谋斌. (2021). 细胞增殖的 EdU 荧光标记法. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010840. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010840.

How to cite: He, L. W., Zhao, H. W., Lin, M. B. (2021). EdU Fluorescence Labeling for Cell Proliferation. // High Content Imaging and Analysis eBook. *Bio-101* e1010840. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010840. (in Chinese)

摘要: 细胞增殖检测是一种常用的生物学实验方法, 主要反映细胞生长、周期及活力的情况。MTT、CCK8 法和 CellTiter-Lumi™ 化学发光法基于细胞活力检测细胞增殖, 受细胞中代谢酶活性的影响。而 5-乙炔-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 掺入可以直接检测细胞中的 DNA 合成, 反映细胞周期中 S 期情况, 并且比基于抗体检测的 5-溴-脱氧尿嘧啶核苷 (bromo-deoxyuridine, BrdU) 法, 操作简便、检测灵敏性高。EdU 是一种新型胸腺嘧啶脱氧核苷酸类似物, 可以在 DNA 合成过程中代替胸苷掺入到新合成的 DNA 中 (Cavanagh *et al.*, 2011)。EdU 耦联的乙炔基可与荧光探针耦联的叠氮化物经过一价铜离子催化形成稳定的三唑环, 简称为点击反应 (Click reaction) (Goonewardena *et al.*, 2013)。新合成的 DNA 可通过荧光标记被高内涵细胞成像分析仪识别并计算 EdU 阳性细胞数, 从而比较细胞增殖能力, 该方法可用于高通量筛选。

关键词: 细胞增殖检测, 细胞周期, EdU, 高内涵细胞成像分析仪

研究背景

细胞的异常增殖是造成肿瘤发生的原因之一。在研究肿瘤发生发展的过程中, 能准确反映细胞增殖的检测方法显得尤为重要。在该方法中, 我们检测了结直肠癌细胞系 HT29 细胞的增殖能力。EdU 染色可标记处于细胞周期 S 期的细胞, 结合高内涵细胞成像分析仪计算出 EdU 阳性细胞占总细胞的比例。我们可通过比较处于 S 期的细胞

比例判断细胞的增殖能力。该方法适用于检测多因素影响细胞增殖、细胞数量较少的实验案例。该实验方法的优势在于能一次性得到高通量的结果。

材料与试剂

1. 96孔细胞培养板（Corning, catalog number: 3599）
2. 离心管（Corning, catalog number: 430791）
3. HT29细胞
4. RPMI-1640培养基（Gibco, catalog number: 11875093）
5. 胎牛血清 FBS（Excell Bio, catalog number: FSP500）
6. 双抗（Gibco, catalog number: 15140122）
7. DPBS（Gibco, catalog number: C14190500CP）
8. 含EDTA的胰酶（Invitrogen, catalog number: 25200114）
9. BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒（Beyotime, C0075S）
10. 1×PBS（见溶液配方）
11. 4%多聚甲醛（见溶液配方）
12. 3% BSA（见溶液配方）
13. 0.3% TritonX-100（见溶液配方）

仪器设备

1. 细胞培养箱（Heraeus, model: HERAcell 150）
2. 离心机（Eppendorf, model: 5810R）
3. 移液器（Eppendorf）
4. 全自动细胞计数仪（Bodboe, JSY-SC-021H）
5. 高内涵细胞成像分析仪（Perkin Elmer, Operetta）

软件

1. Harmony 4.8

实验步骤

1. 铺细胞

- 1.1 将HT29细胞用DPBS洗一遍，加入含EDTA的胰酶（0.25%）并放入细胞培养箱中消化5分钟。
- 1.2 消化完成后，加入含有FBS的培养基终止消化。用移液管将细胞吸入离心管中，置于离心机中离心，200 x g，5分钟。
- 1.3 吸取上清，用新鲜培养基重悬细胞并进行细胞计数。
- 1.4 将细胞（5,000个/孔）铺于96孔细胞培养板（细胞数目根据具体细胞类型自行决定）。

2. 细胞的EdU标记

- 2.1 细胞培养时间可根据具体实验而定，最后检测时要求细胞单层、分布均匀、不可成团。当细胞需要进行药物或其他刺激处理时，先将细胞培养过夜，贴壁后进行药物或刺激处理。待药物或刺激处理之后，再进行EdU的掺入。
- 2.2 用细胞培养液将EdU（10 mM）1:500稀释得到2× EdU工作液（20 μM），EdU的掺入浓度需根据细胞类型及实验条件进行摸索。
- 2.3 96孔细胞培养板的培养基体积为100 μl，将37 °C预热的2× EdU工作液（20 μM）加入培养板中，不建议更换孔板中原有的培养基，以免对细胞产生影响。
- 2.4 将96孔细胞培养板继续置于细胞培养箱中孵育2小时，孵育时间根据细胞生长速率决定，通常为细胞周期10%左右的时间。一般哺乳动物细胞的细胞周期在18-25小时，其他特殊细胞如人胚胎细胞、酵母细胞或神经细胞的细胞周期请参考文献并用显微镜观察实际细胞增殖周期。

3. 细胞固定及通透

- 3.1 去除96孔板的培养基，每孔加入100 μl的固定液（4%多聚甲醛），室温固定15分钟。
- 3.2 去除固定液，每孔加入100 μl洗涤液（3% BSA）洗涤细胞3次，将96孔板放置在摇床或水平振荡器上，每次洗涤3-5分钟。
- 3.3 去除洗涤液，每孔加入100 μl通透液（0.3% TritonX-100），室温孵育10-15分钟。
- 3.4 去除通透液，每孔加入100 μl洗涤液（3% BSA）洗涤细胞3次，每次洗涤3-5分钟。

4. Click反应

- 4.1 根据检测试剂盒的要求配制 Click 反应液，Click Reaction Buffer: Click Additive Solution : CuSO_4 : Azide 555 = 430 : 50 : 20 : 1。
- 4.2 去除孔板中的洗涤液，每孔加入 100 μl 反应液，室温避光孵育 30 分钟。
- 4.3 去除反应液，每孔加入 100 μl 洗涤液（3% BSA）洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 分钟。
5. 细胞核染色
 - 5.1 用 1 $\times$ PBS 将 Hoechst 33342 1 : 1,000 稀释。
 - 5.2 去除洗涤液，每孔加入 1 $\times$ Hoechst 33342，室温避光孵育 10 分钟。
 - 5.3 （可选）去除 1 $\times$ Hoechst 33342，每孔加入 100 μl 洗涤液（3% BSA）洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 分钟。
6. 高内涵成像

将96孔板板底用擦镜纸擦拭后，置于高内涵细胞成像分析仪Operetta进行荧光成像及图像分析。Azide 555的最大激发波长是555 nm，最大发射波长是565 nm，Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346 nm，最大发射波长为460 nm。打开Harmony软件，使用10x长工作距离物镜，添加EdU荧光通道和Hoechst 33342荧光通道，基于Hoechst33342通道初步确定聚焦高度，针对EdU通道微调聚焦高度。根据荧光强度调整曝光时间，每孔选择9视野进行拍摄。

视频 1. 96 孔板换液洗涤操作视频

结果与分析

HT29 细胞经 EdU/Hoechst 33342 荧光标记后，利用高内涵细胞成像分析仪采集荧光信号（图 1）。

图 1. EdU 法检测细胞增殖

Harmony 图像分析方法：首先基于 Hoechst 33342 通道图像进行细胞核圈选，然后对细胞核内的 EdU 荧光强度进行定量，基于视野内无细胞区域和 EdU 阴性细胞的 EdU 荧光强度确定荧光阈值，将 EdU 阳性的细胞群并定义为 EdU+，计算每孔 EdU 阳性细胞的比例，即可比较细胞增殖能力。按照下图 2 Harmony 软件高内涵分析流程进行，表 1 对流程中的参数进行了详细的说明。图像分析软件给出的最终数据格式如图 3。

图 2. Harmony 软件高内涵分析流程。A. 图像分析流程界; B. 分析过程关键步骤圈选效果图

表 1. Harmony 软件高内涵分析流程参数说明

Image Analysis step in Harmony software	
Input Image	成像通道为 EdU 荧光通道(Ex520-550/Em560-630), Hoechst 33342 通道(Exc360-400/Em410-480)
Find Nuclei	利用 Hoechst 33342 通道圈选细胞核
Calculate Intensity Properties	计算细胞核内 EdU 荧光
Select Population	根据视野内无细胞区域和 EdU 阴性细胞的 EdU 荧光强度确定荧光阈值, 大于阈值的定义为 EdU 阳性细胞群
Define Results	分别输出每个孔中总的细胞核数、EdU 阳性的细胞数及 EdU 阳性的细胞比例

图 3. 图像分析结果格式。A. 分析结束后软件给出各孔参数的数据格式；B. 软件给出整板各参数数据热图。

溶液配方

1. 1×PBS

在蒸馏水中溶解 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24 g, 加水定容至 1 L, 调节 pH 值到 7.2~7.4。

2. 4%多聚甲醛

称取 4 g 多聚甲醛加入 1× PBS 中, 缓慢搅拌加热, 滴加 NaOH 使溶液变为碱性帮助溶解, 溶液澄清冷却后, 加入盐酸调整 pH 值至 7.2~7.4, 定容至 100 ml, 在 4 °C 避光保存。

3. 3% BSA

在 100 ml 1× PBS 中加入 3 g BSA, 溶解至澄清。

4. 0.3% TritonX-100

在 100 ml 1× PBS 中加入 0.3 ml TritonX-100，溶解至澄清。

致谢

感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所化学生物学技术平台全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金面上项目（81874201），上海市自然科学基金（20ZR1452300），上海市卫计委课题（201840359）资助。本实验方法根据碧云天公司的细胞增殖检测试剂盒（C0075S）进行实施。

参考文献

1. Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A. and Meedeniya, A. C. (2011). [Thymidine analogues for tracking DNA synthesis](#). *Molecules* 16 (9): 7980-7993.
2. Goonewardena, S. N., Leroueil, P. R., Gemborys, C., Tahiliani, P., Emery, S., Baker, J. R., Jr. and Zong, H (2013). [Fluorogenic 'click-on' dendrimer reporter for rapid profiling of cell proliferation](#). *Bioorg Med Chem Lett* 23 (7): 2230-2233.