应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2013,50(5):1474 - 1478. DOI:10.7679/j.issn.2095 - 1353.2013.202

其他技术与方法

BrdU 抗体染色技术检测昆虫器官的细胞增殖*

张徐波 沈 杰**

(中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 BrdU(5-bromo-2′-deoxyuridine)是一种人工合成的核苷酸类似物,常用于标记活体组织的增殖细胞。它的结构类似于胸腺嘧啶,在细胞分裂的 S 期,可以取代胸腺嘧啶而插入正在复制的细胞 DNA 中。通过免疫组化手段,用 BrdU 抗体检测整合在细胞 DNA 中的 BrdU 分子,可以反映出细胞周期的活力,即细胞增殖的速率。本文介绍一种优化的 BrdU 染色流程,用来标记昆虫小器官的细胞增殖速率。通过这种技术,我们重新评估了 Dpp 信号通路中的转录抑制因子 Brinker 在翅芽发育过程中调控细胞增殖的作用,发现它并不是以前所认为的在翅囊区是一种生长抑制因子。

关键词 昆虫发育生物学, Bromodeoxyuridine(BrdU), 细胞增殖, 昆虫器官, 翅, Brinker

Revealing the proliferation rate in insect organs by BrdU antibody staining

ZHANG Xu-Bo SHEN Jie**

(Department of Entomology, China Agricutural University, Beijing 100193, China)

Abstract A synthetic nucleoside, Bromodeoxyuridine (5-bromo-2′-deoxyuridine, BrdU), is commonly used to detect proliferating cells in living tissues. This compound is an analogue of thymidine and is incorporated into newly synthesized DNA of S phase cells by being substituted for thymidine during DNA replication. Immunohistochemical staining of BrdU is then used to detect the incorporated BrdU and thereby reveal the actively replicating cells. This article introduces an optimized BrdU protocol for detecting cell proliferation in small insect organs. Using this technique, we re-assessed the role of a transcriptional repressor, Brinker, in the Dpp signaling pathway controlling growth regulation during wing disc development. We found that, contrary to previous belief, Brinker is not a growth repressor in the wing pouch.

Key words insect developmental biology, Bromodeoxyuridine (BrdU), proliferation, insect organs, wing, Brinker

5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU)染色是一种检测细胞增殖速率的常用方法,广泛应用于生命科学的诸多领域。BrdU,中文名称为 5-溴脱氧尿嘧啶核苷,是一种胸腺嘧啶的类似物,该分子可以通过与胸腺嘧啶竞争而嵌入新合成的 DNA 分子中,通过免疫荧光染色,检测出细胞的分裂速率(Lehner *et al.*,2011)。BrdU 一般在细胞分裂间期的 S 期进行标记,在这一时期,母细胞的染色质快速复制,大量的 DNA 分子合成,BrdU 可以在这个期间取代胸腺嘧啶而参与 DNA 复制(Kee *et al.*, 2002)。分裂越快的组织区域所掺入的 BrdU 分子越多,被染色的细胞核密度越高,染色也越鲜亮。

磷酸化的组蛋白 H3(Phospho-Histone 3,Ph3)抗体染色是另一种检测细胞的增殖速率的方法。该染色标记细胞的有丝分裂期,这个时期细胞的 DNA 正在复制,磷酸化的组蛋白 Ph3 含量达到顶峰,用抗 Ph3 的抗体对细胞进行免疫荧光染色,可以揭示细胞的增殖速率(Hooser *et al.*, 1998)。与 BrdU 染色相比,Ph3 染色流程相对比较简单,成功的概率也高。但由于处于分裂间期的细胞所占比

* 资助项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助课题新教师类(20100008120022)。

**通讯作者,E-mail:shenjie@cau.edu.cn

收稿日期:2012-12-03,接受日期:2013-01-11

例要远大于正值分裂期的细胞,因此 BrdU 染色的密度比 Ph3 染色大得多,能够更为精确的估计小区域的增殖速率。

近年来,Invitrogen 公司生产了一种类似于 BrdU 的试剂,5-Ethynyl-2′-deoxyuridine(EdU),它是一种分子更小的胸腺嘧啶核苷类似物,能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶渗入正在复制的 DNA 分子中,通过与染料分子的共轭反应可以进行快速的细胞增殖检测(Zeng *et al.*,2010)。它的分子更小,无需酸解染色质就可插入 DNA 中,对细胞的形貌破坏小,流程较 BrdU 标记更为简洁快速。但是 BrdU 抗体染色作为一种经典的免疫组化反应,二抗反应具有信号放大功能,虽然流程长,但更为经济,目前已广为接受使用,是一种理想的研究昆虫小器官细胞增殖特点的手段。

果蝇 *Drosophila melanogaster* 是生命科学研究中的经典模式昆虫,由于其幼虫的翅芽结构相对简单,大量的实验以果蝇翅芽为模型进行研究(张徐波等,2010;刘素宁和沈杰,2011)。本文以果蝇的翅芽为例,介绍一种优化的 BrdU 抗体染色流程,可以高效检测昆虫小器官的细胞增殖速率。通过这种技术,我们重新评估了此前被认为是一种生长抑制因子的基因 *brinker* 在翅芽生长过程中的调控细胞增殖的作用。果蝇翅的发育过程是在器官组织水平研究细胞增殖的一个重要模型,特别是研究器官成形素 Dpp 及其信号通路调控细胞增殖机理的热点模型。Dpp 被认为是一种生长促进因子,它在翅芽的中心区域表达后,向翅芽两侧运输,形成逐渐降低的连续浓度梯度,控制翅芽细胞保持均一的生长速率(Affolter and Basler,2007)。如果通过表达转基因在两侧区域增加 Dpp 分子浓度或其信号传导活力,会导致两侧区域的过度生长(Martin-Castellanos and Edgar,2002)。*brinker* 是 Dpp 的靶标基因,它的表达受 Dpp 信号传导活力的抑制,因而只在翅芽的两侧边缘区域表达(Jazwinska *et al.*,1999)。它是一种转录抑制因子,文献报道,它介导了 Dpp 调控细胞增殖的过程,在翅芽的两侧区域抑制细胞增殖。在翅芽两侧区域增加 Dpp 分子浓度或其信号传导活力,通过抑制了 *brinker* 基因的表达,从而实现促进细胞增殖的作用(Martin *et al.*,2004;Schwank *et al.*,2008)。

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

果蝇 3 龄幼虫:野生型幼虫;在翅囊区共表达 GFP 和 *brinker* 的转基因幼虫(基因型 nub-Gal4 UAS-GFP UAS-GFP UAS-brinker);在翅囊区共表达 P35 和 *brinker* 的转基因幼虫(基因型 nub-Gal4 UAS-GFP UAS-P35 UAS-brinker)。

1.2　实验试剂

5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU),AppliChem,货号 A2139_0001。一抗:小鼠抗 BrdU[2B1],MBL,货号 MI-11-3;兔抗 PH3,Sigma,货号 H0412。二抗:山羊抗小鼠 DyLight549,Agrisera,货号 AS09 640;山羊抗兔 DyLight549,Agrisera,货号 AS09 643。常规试剂:Schneider 细胞培养液,pH7.4 的 PBS,10% Triton,37% 甲醛,盐酸,酒精。

1.3　实验方法与步骤

整个流程包括活体器官在含 BrdU 细胞培养液中培养,洗涤,固定,酸解,抗体染色等步骤,具体操作流程如下:

1.3.1　在 Schneider 细胞培养液中对果蝇幼虫进行解剖。推荐在直径为 30 mm 的细胞培养皿中解剖。让翅芽舒展开,去除肠子、脂肪体、腿芽、平衡棒等遮挡物,要保证翅芽依然较牢固地连在虫体内表皮上,以方便后续的 2 次解剖。解剖速度要尽可能快。

1.3.2　配制含 BrdU 的细胞培养液。由于 BrdU 在水中的溶解度不高,所以先将 BrdU 粉末溶于 80% 的酒精中,直到饱和状态。每次所需 BrdU 酒精溶液最好是新配的。然后将 BrdU 溶液按 1∶100 的比例加入 Schneider 细胞培养液开始培养翅芽。

1.3.3　将 1.3.1 步骤中的培养液小心抽走,然后迅速加入 1.3.2 步骤中的培养液。在 25℃左右室温下将培养皿放在摇床上以较快的速度摇(40 $r \cdot min^{-1}$)。培养 40 ~ 50 min。

1.3.4　接着用培养液连续洗 2 次,然后再用 PBS 洗 1 次,每次 5 min。

1.3.5　将组织浸泡在含 4% 甲醛的 PBS 溶液中进行固定,时间为 15 min。

1.3.6　将组织转移到含 4% 甲醛,0.6% Triton 的 PBS 中进行第 2 次固定,时间为 15 min。

1.3.7　在含有 0.3% Triton 的 PBS 中连续洗 2 次,

每次 10 min。在含有 0.6% Triton 的 PBS 中洗 45 min,这一步为了增加组织的渗透性。

1.3.8 将含有 0.6% Triton 的 PBS 和 3.2mol/L 的盐酸溶液以 1∶1 比例混合。翅芽组织在这种酸性溶液中进行酸解,细胞的染色质会处于松散状态,有利于后面步骤中 BrdU 抗体的结合。酸解 30 min。

1.3.9 在含有 0.3% Triton 的 PBS 中洗 3 次,每次 10 min。在 PBT 溶液中洗 30 min。

1.3.10 在 0.5 mL 塑料管中进行一抗染色。BrdU 抗体用 PBT 稀释,比例为 1∶100。将组织转至含有 200 μL 的 BrdU 抗体溶液的塑料管中浸泡,放在 4℃冰箱中的小摇床上,轻摇并过夜。回收一抗,并且用 PBT 将组织清洗 4 次,然后放在摇床上摇 30 min。

1.3.11 在 0.5 mL 塑料管中进行二抗染色。二抗山羊抗小鼠 DyLight549 用 PBT 稀释,比例为 1∶200。轻轻吸出上一步管中的溶液,加入二抗溶液,染色 1 h。染色过程遮光进行。用 PBT 将组织清洗 4 次,然后放在摇床上摇 1 h。清洗过程同样需遮光。

1.3.12 2 次解剖。将组织转至载玻片上,用吸水纸将液体吸干。滴一滴 50% 的甘油,用镊子把翅芽从组织上完整解剖下来,移除表皮组织,盖上盖玻片,用指甲油固定封片。

1.3.13 以上为 Brdu 染色流程。对于 Ph3 抗体染色不需要活体培养和染色质酸解,因此省去了许多步骤。将第一次解剖的含翅芽的虫子皮在固定液中固定 30 min。然后用 PBT 清洗 4 次,放在摇床上摇 1 h,就可以进行抗体染色,步骤同 1.3.10 ~1.3.12。

1.3.14 在荧光显微镜上拍照分析。文中的照片为 AMG EVOS fl 荧光显微镜和 Leica TCS-SP2-AOBS 激光共聚焦显微镜拍照。

2 结果与分析

图 1 为成功的野生型翅芽的 BrdU 染色。可以看出,整个翅芽的细胞增殖速率是均一的。翅芽组织在含 BrdU 的细胞培养液中的培养时间要足够长,否则 BrdU 未能很好的进入细胞的 DNA 中,拍照时染色的细胞核中心发虚。步骤 1.3.5 ~ 1.3.7 由于组织在含甲醛的溶液中浸泡,容易变形,所以要避免清洗或转移时对组织的相互挤压。步骤 1.3.8 的盐酸可使染色质酸解,处于松散状态。但浓度应该很好掌握,过高组织易变形收缩,过低则酸解不充分,从而影响染色的质量。图 2 中的翅芽由于盐酸酸解不够充分,导致抗体未能很好地结合。因此,大部分区域没有成功染色。

Ph3 染色步骤简单,成功率也高,但与 BrdU 染色相比,密度要小很多。因此 BrdU 染色更能精确地评估细胞的增殖速率。值得注意的是,BrdU 具有致癌性,所以使用时要特别小心。要戴口罩和合适的手套,防止衣服等物体对 BrdU 粉末的吸附。

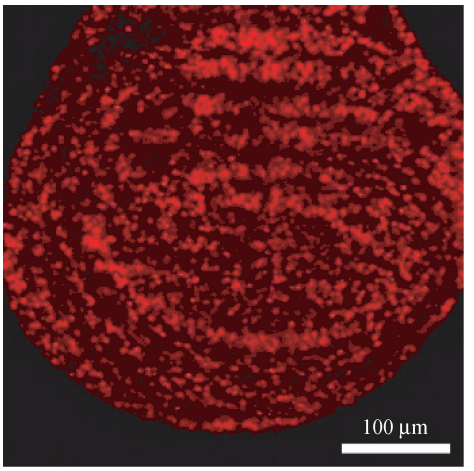

图 1 野生型翅芽 BrdU 染色

Fig. 1 Good BrdU staining in wild type wing imaginal disc

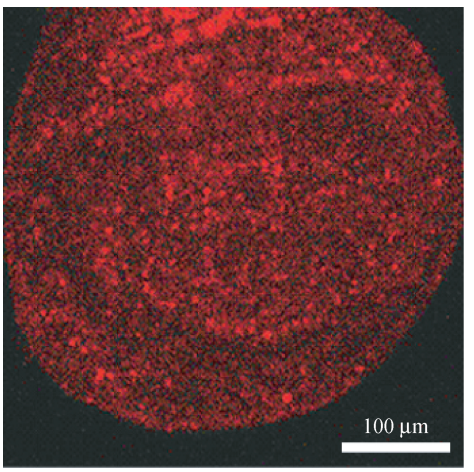

图 2 染色失败的野生型翅芽

Fig. 2 Bad BrdU staining in wild type wing imaginal disc

为了验证果蝇翅芽的生长调控机理,我们重

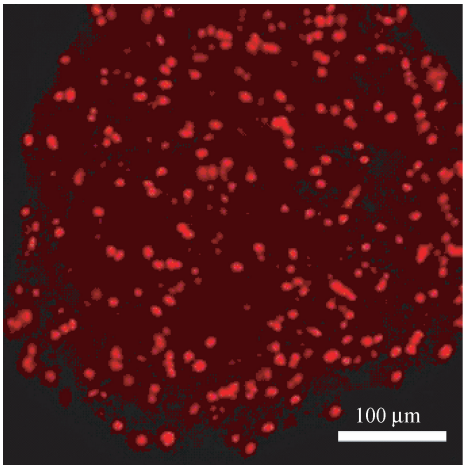

图 3　野生型翅芽的 Ph3 染色

Fig. 3　PH3 antibody staining in wild type wing imaginal disc

复了文献中的核心实验,在翅囊区过度表达 *brinker* 基因,再通过 *BrdU* 技术,标记并揭示翅芽细胞的增殖速率。首先,像文献中一样,在翅囊区表达了 *brinker* 基因。通过 BrdU 技术,看到了该区域的 BrdU 免疫荧光在 GFP 共表达区域变弱(图 4),说明翅芽细胞的增殖速率下降了。这些初步结果和文献中的报道完全一致,但是我们仍然怀疑,因为过表达 *brinker* 会抑制 Dpp 信号传导活力,从而激活细胞凋亡。上述的 BrdU 免疫荧光变弱完全有可能是由于大量细胞死亡所造成的。我们

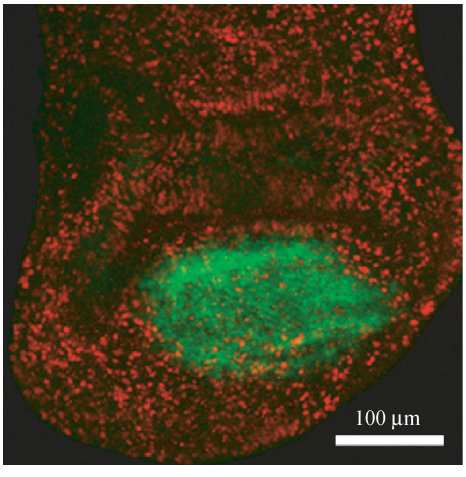

图 4　共表达 GFP(绿)和 *brinker* 基因的翅芽的 BrdU 染色(红)

Fig. 4　BrdU staining (red) in wing disc co-expressed GFP (green) and *brinker*

通过观察细胞凋亡的标记物,激活态的 Caspase-3 抗体染色,发现有大量的细胞凋亡发生在 GFP 共表达区域(图 5)。这一观察支持了我们的怀疑。

为了进一步解释 Brinker 的抑制细胞增殖的作用是细胞凋亡的二级效应,我们共表达了抑制细胞凋亡的杆状病毒 P35(Danon *et al.*,2004)基因。再通过 BrdU 技术,看到了该区域的 BrdU 免疫荧光在 GFP 共表达区域没有变弱(图 6),说明抑制细胞凋亡后,Brinker 不能抑制翅芽细胞的增殖。为了进一步验证,通过 PH3 抗体染色,也同样揭示了分裂细胞在 GFP 共表达区域并没有减少(图 7)。因此,前人在文献中报道的实验不够严密,我们认为 Dpp 的靶标基因,转录抑制因子 *brinker* 基因,在翅囊区域的异位表达不是直接抑制细胞增殖,而是引起了严重的细胞凋亡。

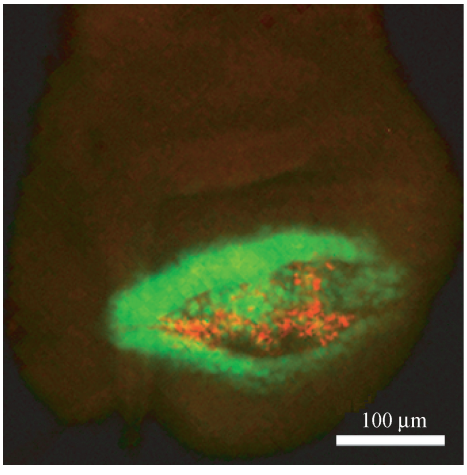

图 5　共表达 GFP(绿)和 *brinker* 基因的翅芽的 Caspase-3 染色(红)

Fig. 5　Caspase-3 staining (red) in wing disc co-expressed GFP (green) and *brinker*

3　讨论

本文介绍了在昆虫小器官上检测细胞增殖的 BrdU 标记优化方法。采用这一方法,可重演经典文献中的核心实验,通过更仔细的实验设计和观察,发现了 Brinker 在翅囊区域的异位表达不能直接抑制细胞增殖,它只是引起了严重的细胞凋亡。这一结果表明 DPP-Brinker 信号通路调控翅芽细胞生长的机理比以前认为的更加复杂。我们未发表的一些实验支持 Dpp 信号传导活力在翅芽的两

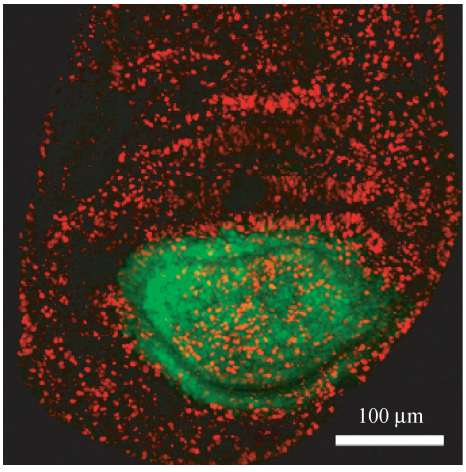

图 6 共表达 GFP(绿)、P35 和 *brinker* 基因的翅芽的 BrdU 染色(红)

Fig. 6 BrdU staining (red) in wing disc co-expressed GFP (green), P35, and *brinker*

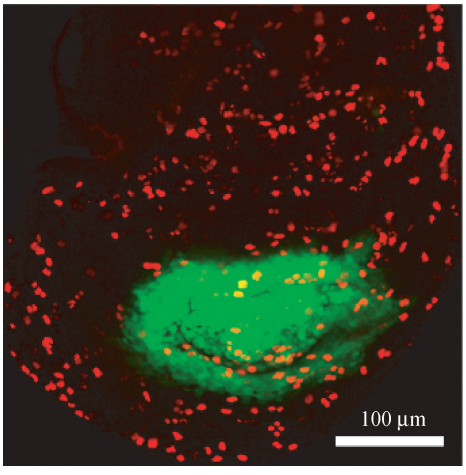

图 7 共表达 GFP(绿)、P35 和 *brinker* 基因的翅芽的 PH3 染色(红)

Fig. 7 PH3 staining (red) in wing disc co-expressed GFP (green), P35, and *brinker*

侧区域确实促进细胞增殖,但是在翅芽中间区域其作用机理很可能完全不同。研究表明,Dpp 调控器官生长的机理是复杂的,值得继续深入系统地研究这一问题:Dpp 的靶标基因在翅芽的不同区域是否以不同的方式调控生长?

参考文献(References)

Affolter M, Basler K, 2007. The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat. Rev. Genet.*, 8(9):663 – 674.

Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, Gallois P, 2004. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *J. Biol. Chem.*, 279(1):779 – 787.

Hooser AV, Goodrich DW, David Allis C, Brinkleyl BR, Michael A, 1998. Mancini. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.*, 111(Pt23):3497 – 3506.

Jazwinska A, Kirov N, Wieschaus E, Roth S, Rushlow C, 1999. The *Drosophila* gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell*, 96(4):563 – 573.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM, 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Meth.*, 115(1): 97 – 105.

Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehner C, Furtner T, Couillard-Despres S, Rivera FJ, Brockhoff G, 2011. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res.*, 345(3): 313 – 328.

Martin FA, Perez-Garijo A, Moreno E, Morata G, 2004. The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development*, 131(20):4921 – 4930.

Martin-Castellanos C, Edgar BA, 2002. A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development*, 129(4): 1003 – 1013.

Schwank G, Restrepo S, Basler K, 2008. Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development*, 135(24): 4003 – 4013.

Zeng C, Pan F, Jones LA, Lim MM, Griffin EA, Sheline YI, Mintun MA, Holtzman DM, Mach RH, 2010. Evaluation of 5-ethynyl-2′-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Res.*, 1319:21 – 32.

刘素宁, 沈杰, 2011. 果蝇基因组与功能基因研究进展. 应用昆虫学报, 48(6):1559 – 1572.

张徐波, 芦娟, 沈杰, 2010. 器官的构造是如何形成的——以果蝇翅为例. 昆虫知识, 47(1):5 – 15.