

# 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记酵母基因组 DNA 的方法\*

赵宏宇<sup>1,2</sup> 赵 玥<sup>1</sup> 王建英<sup>1,2</sup> 李 珺<sup>1,2</sup> 蔡 禄<sup>1,2\*\*</sup>

(1 内蒙古科技大学数理与生物工程学院 包头 014010 2 内蒙古科技大学生物工程与技术研究所 包头 014010)

**摘要** 胸腺嘧啶类似物 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 标记技术是一种研究 DNA 复制、修复等生命过程的有效手段。由于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中缺少胸腺嘧啶核苷酸补救途径, 胞外 BrdU 不能有效的渗入到基因组中, 使该技术在酿酒酵母中的应用受到极大制约。通过在基因组中引入单纯疱疹病毒胞苷激酶 (HSV-TK) 和人类平衡核苷转运蛋白 (hENT1) 基因, 工作建立了 BrdU 标记酵母基因组 DNA 的方法。在生长对数中期加入 0.2mg/ml BrdU, 离体检测法检测发现, 标记 3h 的荧光信号较 1h、5h 时强; 胞内检测法结果显示, 标记 3h 时 55.3% 的基因组 DNA 中能够渗入 BrdU。该工作为酿酒酵母 DNA 复制、修复等方面提供了直接有效的研究方法。

**关键词** 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 单纯疱疹病毒胞苷激酶 人类平衡核苷转运蛋白 酿酒酵母 DNA 复制

**中图分类号** Q78

DNA 复制是细胞生命周期中关键环节之一, 利用胸苷的类似物进入新合成的 DNA 进行检测一直是研究 DNA 代谢的有效方法<sup>[1]</sup>。传统的同位素标记物氚胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR) 标记技术因放射性污染、检测技术难度大、试验周期长等缺点而逐渐被 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (简称 BrdU, 下同) 取代。目前 BrdU 标记新合成 DNA 的方法在动物细胞组织的肿瘤生物学、遗传学、分子生物学等领域得到广泛应用<sup>[2]</sup>。酿酒酵母系统由于缺少一个适当的核苷转运体转运胞苷以及用来将胞苷、BrdU 磷酸化成 TMP 和 BrdUMP 的胞苷激酶, 不能有效的将细胞外的胞苷和它的类似物转运以及整合到正在复制的 DNA 链中, 使 BrdU 标记 DNA 技术在酿酒酵母中的应用受到极大制约<sup>[3]</sup>。McNeil 及 Schwob 等研究小组发现, 体内单纯疱疹病毒胞苷激酶 (Herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 可以增强 BrdU 渗入到酿酒酵母基因组中的效率<sup>[4,5]</sup>; Vernis 等<sup>[6]</sup>在研究酿酒酵母的胸苷补救途径以及 Hodson 等<sup>[7]</sup>利用胸苷与 BrdU 标记裂殖酵母基因组 DNA 时发现, 人类平衡核苷转运蛋白 (human equilibrative nucleoside

transporter 1, hENT1) 可以进一步增强胞苷转运, 并且与 HSV-TK 协同作用可以显著增强 BrdU 整合到酵母中的效率。本实验将 HSV-TK 和 hENT1 基因整合到酿酒酵母 YPH499 基因组中, 在生长对数中期加入 BrdU 培养后, 利用我们发展的 BrdU 标记离体检测与胞内检测技术, 发现 BrdU 整合到基因组的效率明显增强。工作为利用酿酒酵母系统研究 DNA 复制、修复以及酵母自主复制机制等提供了直接有效的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (*MATa* *ura3-52 lys2-80I* *amber ade2-101ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) 由美国新泽西州医学院微生物学与分子遗传学部 Carol S. Newlon 教授赠送; 大肠杆菌 DH5α 本实验室保存。

质粒 p405 由美国新泽西州医学院微生物学与分子遗传学部 Carol S. Newlon 教授赠送<sup>[8]</sup>, 该质粒是在穿梭整合型质粒 pRS405 的多克隆位点的 *SacI* 和 *NotI* 酶切位点间插入 HSV-TK、hENT1 基因以及相应的启动子 GPD 和 ADH1 重组而成, 其结构见图 1。该重组质粒含有 *Ampicillin* 基因, 在大肠杆菌培养体系中可以加入氨苄青霉素进行筛选; 同时含有 *LEU2* 基因, 用于转入

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-11-17

\* 国家自然科学基金 (61072129)、内蒙古自然科学基金 (2011MS0504)、内蒙古科技大学创新基金 (2010NC056) 资助项目

\*\* 通讯作者, 电子信箱: nmcailu@163.com

亮氨酸缺陷型酵母菌株的筛选。

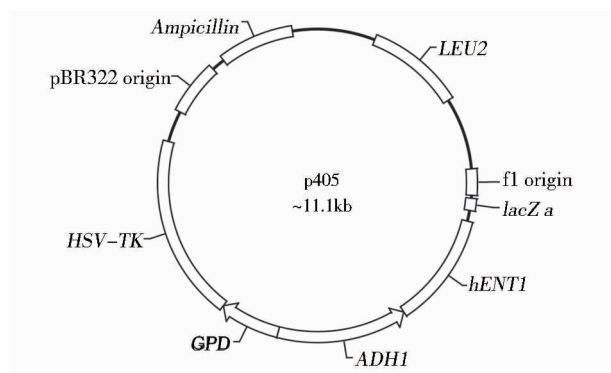


图1 质粒 p405 的物理图谱示意图

Fig.1 Gene map of the recombinant plasmid p405

1.1.2 主要试剂及培养基 Yeast extract、Tryptone、Tris Base、SDS、Agar 购自 OXOID 公司, Agarose 购自 Invitrogen 公司, 赖氨酸、色氨酸、鲑鱼精 DNA、BrdU、鼠抗 BrdU 单克隆抗体、FITC-羊抗小鼠 IgG 抗体、DAPI、Sarcosyl、PEG3350 购自 Sigma 公司, Rnase A、1kb DNA Maker、氨苄青霉素购自 TaKaRa 公司, 腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸、尿嘧啶、牛血清蛋白、蛋白酶 K 购自 AMRESCO 公司, Zymolyase 购自 ZYMO RESEARCH 公司,  $\beta$ -琼脂糖酶 I 购自 NEB 公司, APES(3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷)购自福州迈新公司, 其他试剂均为国产分析纯。

酵母完全培养基 YPD: 1% Yeast extract 和 2% Tryptone 121℃ 灭菌 20min 后, 加入 115℃ 灭菌的 2% 葡萄糖溶液, 混匀保存。

酵母选择培养基 SD(Leu-): 121℃ 灭菌 20 min 的 0.7% YNB 和 115℃ 灭菌的 2% 葡萄糖混合, 加入过滤除菌的 20mg/L 尿嘧啶、20mg/L 腺嘌呤、30mg/L 赖氨酸、20mg/L 组氨酸和 200mg/L 苏氨酸。

大肠杆菌完全培养基 LB: 1% NaCl, 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 调 pH7.0 后 121℃ 灭菌 20 min。

大肠杆菌转化 SOB 培养基: 2% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.05% NaCl, 250mmol/L KCl, 0.5mol/L MgCl<sub>2</sub>, 121℃ 灭菌 20 min。

大肠杆菌选择培养基 LBA: LB 培养基中加入 50 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素。

1.1.3 实验仪器 紫外-可见分光光度计(NanoDrop), 高速冷冻离心机(Eppendorf), 凝胶成像仪(GeneGenius), 荧光倒置显微镜(Nikon Ti), 菌落计数器等。

## 1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌质粒转化 利用氯化钙转化法将质

粒转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中<sup>[9]</sup>。

1.2.2 质粒提取 采用 Tiangen 质粒小提试剂盒从大肠杆菌中提取质粒 DNA。

1.2.3 酵母生长曲线测量 挑取酵母 YPH499 单菌落接种到 20ml YPD 培养基中, 30℃、200r/min 振荡培养, 每间隔 2h 取样 100 $\mu$ l, 利用血球计数板在显微镜下计数, 做三个平行试验, 取均值后绘制生长曲线。酵母对数生长期平均倍增时间  $t_d$  按下列公式计算:

$$C_2 = C_1 \times \exp[\mu_n \times (t_2 - t_1)]$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_n}$$

式中,  $C_1$  和  $C_2$  分别为  $t_1$  和  $t_2$  时刻的细胞数;  $\mu_n$  为该段内细胞的平均比生长速率。

1.2.4 酵母转化 利用 LiAc 转化法<sup>[10]</sup>。

1.2.5 BrdU 标记与酵母基因组提取 挑取转化质粒的酿酒酵母 YPH499 单克隆菌落接种在 20ml YPD 培养基中, 30℃、200r/min 振荡培养 14h 进入对数生长期, 加入 0.2mg/ml BrdU 继续培养 1h、3h、5h, 分别收集 3ml 菌体, 利用珠磨法提取基因组 DNA<sup>[11]</sup>, 紫外分光光度计测浓度与纯度, 琼脂糖电泳观察条带, 用于涂片观察。

1.2.6 载玻片的预处理 取载玻片用 1% SDS 清洗, 再用大量清水冲洗; 将清洗后的玻片用蒸馏水润湿之后放入王水(浓盐酸与浓硝酸的体积比为 3:1)中浸泡过夜; 用蒸馏水洗 2 次或 3 次, 用甲醇冲洗后干燥; 将玻璃片放入 50ml 甲醇(内含 0.2mmol/L APES)中浸泡振荡 1h; 取出玻璃片用超纯水洗去未结合的 APES, 再用无水乙醇洗涤干燥备用。

1.2.7 BrdU 标记的离体检测法 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(也称一抗)可以特异性结合 DNA 上的 BrdU, 然后用带有荧光素 FITC 的羊抗小鼠 IgG(也称二抗)结合一抗, 通过探测 FITC 的荧光强度可以实现对结合 BrdU 的 DNA 含量进行检测。

取 1 $\mu$ l 100ng/ $\mu$ l 酵母基因组 DNA 点到处处理好的玻璃片上; 用 0.05mol/L 氢氧化钠的乙醇溶液浸泡玻璃片 5~20min; 取出玻璃片放入 0.5% 戊二醛溶液中浸泡 5min; 70% 乙醇清洗, 无水乙醇干燥; 甲醇溶液浸泡 3min 固定, 干燥; 取 15 $\mu$ l 1% BSA 点在盖玻片上, 盖到点样处, 100% 湿度放置 15min; 用 1% BSA 稀释一抗(小鼠抗 BrdU 单克隆抗体)到 5%, 取 15 $\mu$ l 点到盖玻片上, 盖到点样处, 100% 湿度放置 1h; 用 1% BSA 稀释二抗(FITC 标记羊抗小鼠 IgG)到 5%, 点到盖玻片上; 用

PBS 清洗与一抗反应的玻璃片,之后将带有二抗的盖玻片盖上,100%湿度放置 1h;用 PBS 清洗玻片,在荧光倒置显微镜下观察照相。实验过程中以 TE 缓冲液代替基因组 DNA 作为空白对照。

**1.2.8 BrdU 标记的胞内检测法** 收集 1.5ml BrdU 标记的细胞,缓冲液 CPES (0.25mol/L 柠檬酸,0.12mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,20mmol/L EDTA pH7.5,21.8g/100ml Sorbitol) 洗涤离心后重悬,采用 300 $\mu\text{l}$  1.5% 低熔点琼脂糖与 100 $\mu\text{l}$   $2.05 \times 10^7$  cell/ml 的酵母细胞混合固定,将凝固的琼脂糖细胞混合物切成条状,用缓冲液 CPE (0.25mol/L 柠檬酸,0.12mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,20mmol/L EDTA pH7.5) 悬浮凝胶条,加入 10U/ml Zymolyase 使细胞破壁 1h;去上清,用 Solution III (10mmol/L Tris pH8.0,1% Sarcosyl,0.45mol/L EDTA, pH9.0) 悬浮凝胶条,加入 1mg/ml 蛋白酶 K 裂解过夜;取出凝胶条 72℃ 融化,加入 2U 的  $\beta$ -琼脂糖酶 42℃ 裂解琼脂糖,分别加入终浓度 5% 的  $\beta$ -巯基乙醇和终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI 染色后,取 5 $\mu\text{l}$  样品点到处理好的玻璃片上;按照 1.2.7 的方法与一抗和二抗反应,在荧光倒置显微镜下观察照相。实验过程中以 TE 缓冲液代替基因组作为空白对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线

为了保证 BrdU 能在细胞快速生长阶段掺入到新合成的 DNA 中,测定了酿酒酵母 YPH499 的生长曲线(图 2)。从图 2 中可看出,从 12~22h,酵母处于对数生长期,在该阶段内,经计算其平均倍增时间为 2.008h,所以在后续的 BrdU 标记试验中,选择接种后 14h 时加入 BrdU,标记时间分别为 1h、3h、5h。

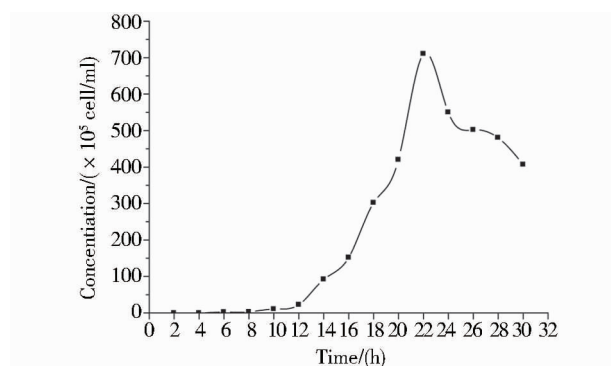


图 2 酿酒酵母 YPH499 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* YPH499

### 2.2 离体检测 BrdU 标记效果

细胞培养 14h 时加入 BrdU,分别提取标记 1h、3h、5h 后的基因组 DNA 稀释后涂片,加入带有 FITC 的抗体检测,在倒置显微镜下通过蓝光激发观察结果见图 3。图 3 显示,与对照菌[图 3(a)]几乎没有荧光显示不同,携带 *HSV-TK* 和 *hENTI* 基因的基因组 DNA,不同的标记时间呈现不同的荧光强度[图 3(b)、(c)、(d)]。BrdU 标记 1h 时荧光强度相对较弱,3h 时相对亮度信号较强,检测到样品中存在大量的 BrdU;5h 时的荧光强度又有所减弱。由于本研究 BrdU 标记阶段细胞的倍增时间是 2.008h,标记 1h,只有较少的细胞基因组 DNA 完成复制,BrdU 的掺入量有限,而标记 3h,大部分的细胞正好完成基因组 DNA 的一个复制周期,单位体积细胞的荧光总量达到最高;标记 5h,细胞总数明显增加,在标记物 BrdU 不增加的前提下,单位体积细胞的荧光量则有所下降。

### 2.3 BrdU 标记效果的胞内检测

DAPI 是一类可透过细胞膜,并与 DNA 特异结合的荧光染料,为了进一步检测胞内 BrdU 标记效果,利用琼脂糖凝胶将 BrdU 标记 3h 的携带 *HSV-TK* 和 *hENTI* 基因的细胞分散固定,用 DAPI 染料染色检测胞内 DNA 含量[图 4(a)、(c)]。按 1.2.7 所述原理,通过探测 FITC 分子的荧光强度可以检测胞内结合 BrdU 的 DNA 含量[图 4(b)、(d)]。我们选择了 30 个不同位置或样品,分别统计 DAPI 和 BrdU 标记的基因组 DNA 含量,发现在 DAPI 染色的基因组 DNA 中,约 55.3% 的位点上同时可以检测到 BrdU 的存在,说明当 0.2mg/ml BrdU 标记 3h 时,有 55.3% 的基因组 DNA 中掺入了 BrdU。

## 3 讨论

BrdU 作为一种胸腺嘧啶核苷的类似物,其化学结构特点是胸腺嘧啶的碱基嘧啶环上与 5 位 C 原子连接的甲基被溴代替。BrdU 自身不易透过酵母细胞膜,且酿酒酵母细胞内不存在可以转运胞外 BrdU 的核苷转运蛋白(nucleoside transporters, NTs)。到目前只发现两类人 NTs,即平衡型核苷转运蛋白(human equilibrative nucleoside transporters, hENTs)和浓度依赖型核苷转运蛋白(human concentrative nucleoside transporters, hCNTs)<sup>[12]</sup>。hENTs 转运核苷具有双向转运特点,主要包括 hENT1 和 hENT2,是 hENTs 的主要亚型。实验发现将 *hENTI* 基因通过质粒整合到酵母基因

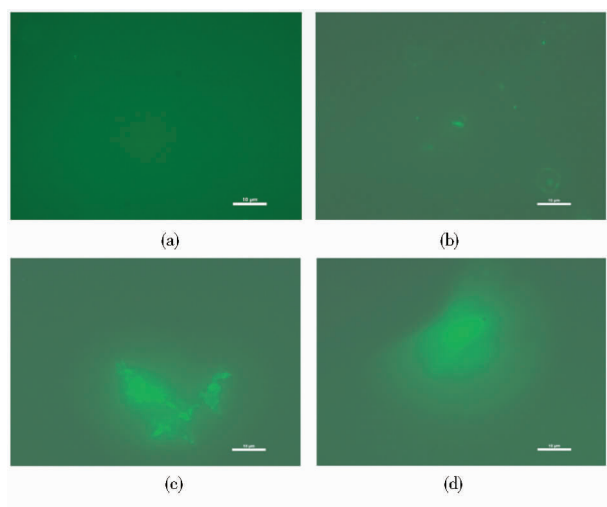


图3 离体检测 BrdU 标记结果

Fig.3 The fluorescence signal intensity of BrdU detected *in vitro*

(a) Control sample of genome DNA without *HSV-TK* and *hENT1* gene  
(b), (c), (d) Genome DNA sample with *HSV-TK* and *hENT1* gene which was labeled by BrdU at 1h, 3h and 5h. Scale bar was 10μm

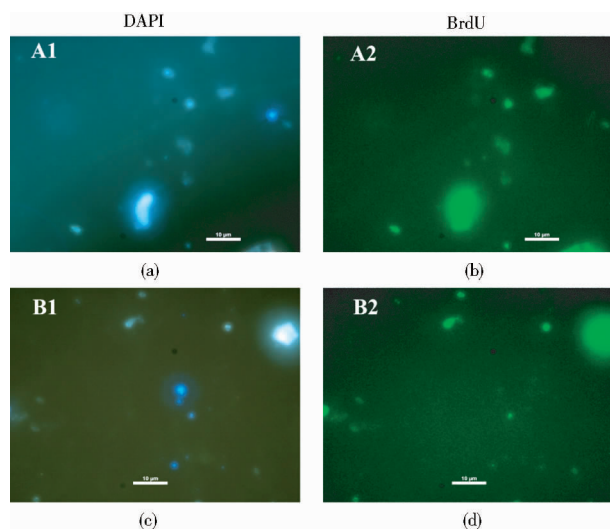


图4 2个 BrdU 标记 3h 后胞内检测荧光的示例

Fig.4 Two example of genome DNA fluorescence pictures detected *in vivo*

(a) and (c) were the DAPI fluorescence pictures in all genome DNA; and (b) and (d) was the corresponding fluorescence pictures of FITC-antibody against to BrdU in genome DNA. Scale bar was 10μm

组中,在启动子 *ADH1* 的作用下可以表达 *hENT1* 蛋白,协助 BrdU 穿过细胞膜进入细胞内部,表明 *hENT1* 在转运核苷类似物中起到了主导作用<sup>[13]</sup>。同时整合到基因

组上的 *HSV-TK* 基因在启动子 *GPD* 作用下表达的 *HSV-TK* 蛋白可将 BrdU 进一步磷酸化为 BrdUMP,在 DNA 复制时磷酸化的 BrdU 可以像胸腺嘧啶核苷一样可掺入到新合成的 DNA 中,其作用过程见图 5。利用抗 BrdU 的一抗可以特异性结合 DNA 上的 BrdU,然后用带有荧光素的二抗结合一抗,通过探测荧光强度可以实现对结合 BrdU 的 DNA 含量进行检测。

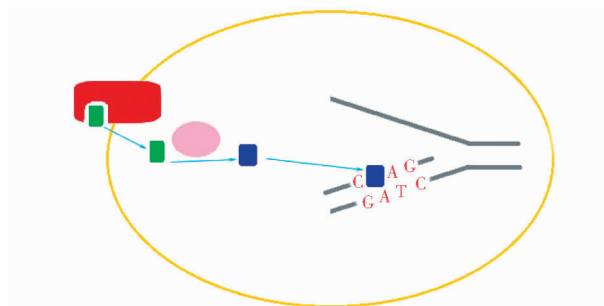


图5 酿酒酵母细胞中 HSV-TK 与 hENT1 作用示意图

Fig.5 The schematic diagram of HSV-TK and hENT1 in *S. cerevisiae*

Under the assistance of *hENT1*, BrdU enter into *S. cerevisiae* through the cell membrane, and then *HSV-TK* can catalyze the BrdU to BrdUMP. In the process of DNA replication BrdU instead of thymidine can insert genome DNA. Orange: yeast cell boundary; red: *hENT1*; green: BrdU; pink: *HSV-TK*; blue: BrdUMP

BrdU 标记的效果与其浓度和标记时间有关,本实验使用 0.2mg/ml BrdU 进行标记,检测菌株酿酒酵母 YPH499 对数生长期的倍增时间为 2.008h。当标记时间小于其倍增时间时,仅有部分酵母完成了复制,所以表现为基因组 DNA 中的 BrdU 较少,检测 BrdU 时荧光强度较弱;而当标记时间超过倍增时间时,多数酵母完成了 DNA 复制及分裂,检测 BrdU 时荧光强度较亮;若再增加标记的培养时间,酵母经过了多次复制倍增, BrdU 的浓度又会限制标记效果,使得提取的基因组 DNA 中 BrdU 含量相对减少,荧光强度会再度减弱。实验中通过两种检测方法对比了时间对标记效果的影响,发现标记 3h 时, BrdU 可以渗入到 55.3% 的酵母基因组 DNA 中。当然,根据研究目的的不同, BrdU 浓度及标记时间应该进一步的摸索。

标记 DNA 的胸腺嘧啶类似物主要有氚(<sup>3</sup>H)标记的胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)、BrdU 以及近几年发展的 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)等。<sup>3</sup>H-TdR 标记法由于在操作过程中的放射性使其应用受到很大的限制,且在显微镜下观察时分辨率

和信噪比都很低<sup>[14]</sup>。相对于<sup>3</sup>H-TdR, BrdU 和 EdU 标记和检测的准确性高、标记率高、方法简便、迅速、安全,而且染色结果易于在显微镜下观察。但是, BrdU 抗体分子太大,双链 DNA 中互补配对的碱基阻断了 BrdU 单克隆抗体与 BrdU 亚单位的结合,为了暴露其抗原表位,细胞或组织标本必须经过变性处理(酸解、酶解、热解等),这就影响了细胞或标本的结构,也使得染色结果及程度依赖于不同实验所应用的不同条件;同时,变性可能破坏细胞内蛋白质的抗原识别位点,限制了 BrdU 检测方法中同时检测其他蛋白质的应用<sup>[14-15]</sup>。EdU 是一种由乙炔基取代脱氧胸腺嘧啶环上与 5 位 C 相连的甲基的化合物,与 BrdU 类似,在标记裂殖酵母基因组 DNA 时,TK 和 hENT1 蛋白同样可以增强 EdU 整合到基因组 DNA 中的效率<sup>[16]</sup>。EdU 上的乙炔基能够与一种荧光标记的小分子叠氮化合物探针反应,在检测时,荧光叠氮化合物可以通过细胞膜与结合在 DNA 的 EdU 上的乙炔基形成稳定的三唑环<sup>[17]</sup>,所以该方法标记酵母基因组 DNA 时,不用裂解细胞,可以直接对整个酵母细胞进行荧光观察或应用流式细胞仪研究,显得更为迅速而且检测时产生的背景淡及灵敏度高。但是 Kearsey 研究小组<sup>[16]</sup>发现 EdU 的掺入会对裂殖酵母的 DNA 产生损伤,影响了细胞的连续繁殖, Diermeier-Daucher 等<sup>[18]</sup>报道在利用 EdU 标记动物细胞基因组 DNA 时也存在类似的毒害效应,使 EdU 只适用于单个细胞周期的标记,对于连续标记多个细胞周期时, BrdU 标记要优于 EdU 标记法。总之,将 *HSV-TK* 和 *hENT1* 基因整合到酿酒酵母基因组上,利用 BrdU 标记新合成的 DNA 是研究酿酒酵母细胞 DNA 复制、修复、重组等基本生物过程的一种有效手段,尤其是在研究酿酒酵母自主复制序列的启动复制效率等方面显示出很大的优越性<sup>[19-20]</sup>。

### 参考文献

- [1] Biggs M J, Richards R G, Dalby M J. Using immuno-scanning electron microscopy for the observation of focal adhesion-substratum interactions at the nano- and microscale in S-phase cells. *Methods Mol Biol*, 2011, 695:53-60.
- [2] Liu H, Liu Y Q, Xu A H, et al. A novel anticancer agent, retigeric acid B, displays proliferation inhibition, S phase arrest and apoptosis activation in human prostate cancer cells. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3):598-606.
- [3] Grivell A R, Jackson J F. Thymidine kinase; evidence for its absence from *Neurospora crassa* and some other micro-organisms, and the relevance of this to the specific labeling of deoxyribonucleic acid. *J Gen Microbiol*, 1968, 54:307-317.
- [4] McNeil J B, Friesen J D. Expression of the Herpes simplex virus thymidine kinase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 1981, 184:386-393.
- [5] Lengronne A, Pasero P, Bensimon A, et al. Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK (+) yeast strains. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:1433-1442.
- [6] Vernis L, Piskur J, Diffley JF. Reconstitution of an efficient thymidine salvage pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(19):e120.
- [7] Hodson J A, Bailis J M, Forsburg S L. Efficient labelling of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* with thymidine and BUdR. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(21):e134.
- [8] Viggiani C J, Aparicio O M. New vectors for simplified construction of BrdU-Incorporating strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2006, 23(14-15):1045-1051.
- [9] Joe S, David R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.
- [10] 安伯格 D. C., 伯克 D., 斯特拉森 J. N., 霍克克(译). 酵母遗传学方法实验指南(第2版). 北京: 科学出版社, 2009. Amberg D C, Burke D, Strathern J N., Huo K (translation). *Methods in Yeast Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed, Beijing: Science Press, 2009, 98-99.
- [11] 赵宏宇, 李珏, 赵玥, 等. 4 种酵母基因组提取方法的比较. *食品科学*, 2011, 32(09):170-173. Zhao H Y, Li J, Zhao Y, et al. Comparison of four methods for genomic DNA extraction from Yeasts. *Food Science*, 2011, 32(09):170-173.
- [12] Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. *Current Drug Metabolism*, 2004, 5:63-84.
- [13] Hyde R J, Cass C E, Young J D, et al. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters; recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol*, 2001, 18(1):53-63.
- [14] 刘雷, 杨立业. EdU 在检测细胞增殖中的应用. *医学综述*, 2010, 16(19):2901-2904. Liu L, Yang L Y. Detection of DNA Synthesis in Proliferating Cells with EdU. *Medical Recapitulate*, 2010, 16(19):2901-2904.
- [15] Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(1):65-71.
- [16] Hua H, Kearsey S E. Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(9):e60.
- [17] Salic A, Mitchison T J. A chemical method for fast and sensitive



- detection of DNA synthesis *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(7):2415-2420.
- [18] Diermeier-Daucher S, Clarke S T, Hill D, et al. Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. Cytometry A, 2009, 75(6):535-546.
- [19] de Morgan A, Brodsky L, Ronin Y, et al. Genome-wide analysis of DNA turnover and gene expression in stationary-phase *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 2010, 156(Pt 6):1758-1771.
- [20] Rhind N. Incorporation of thymidine analogs for studying replication kinetics in fission yeast. Methods Mol Biol. 2009, 521:509-515.

## A Method of Labeling Genome DNA of *Saccharomyces cerevisiae* with BrdU

ZHAO Hong-yu<sup>1,2</sup> ZHAO Yue<sup>1</sup> WANG Jian-ying<sup>1,2</sup> LI Jun<sup>1,2</sup> CAI Lu<sup>1,2</sup>

(1 School of Mathematics Physics and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

(2 Institute of Bioengineering & Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

**Abstract** DNA labeling with thymidine analogue bromodeoxyuridine (BrdU) is a powerful tool for analyzing DNA replication and repair. But the technique was limited to use for *Saccharomyces cerevisiae* due to lack of thymidine salvage pathway which promoted BrdU binding to DNA. Two genes, herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) and human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), were inserted to the yeast genomic DNA by using an integration plasmid p405. The results showed that when the concentration of BrdU was 0.2mg/ml, it can be labeled to *S. cerevisiae* genomic DNA during the mid-logarithmic period. The fluorescence signal intensity at 3h was stronger than those at 1h or 5h *in vitro*. And data from detecting *in vivo* showed that 55.3% of the *S. cerevisiae* genomic DNA can be integrated with BrdU. These indicated that a new method with BrdU for labeling to *S. cerevisiae* genomic DNA was established. The protocol can be used easily for analysis of genomic DNA replication and repair for *S. cerevisiae*.

**Key words** BrdU Herpes simplex virus thymidine kinase Human equilibrative nucleoside transporter *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication and repair