

基于 EdU/BrdU 双标记法检测细胞周期动力学的方法

袁月^{1,2},艾立丽²,张鹏^{1,2}(贵州医科大学¹基础医学院生物学教研室,²组织工程与干细胞实验中心,
功能核酸生物药研究重点实验室,贵阳 550004)

摘要 目的 建立一种基于 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 双标记法检测细胞周期 S 期时间 (Ts) 和总细胞周期时间 (Tc) 的方法。方法 通过 EdU 和 BrdU 双重标记 HEK293T 细胞后进行免疫荧光染色,利用高内涵细胞成像分析仪采集荧光信号,统计整个细胞群中 EdU 阳性和 BrdU 阳性细胞个数,基于之前发表文章中的细胞周期计算公式,对其进行改进后,可精准计算出细胞的 Ts 和 Tc 时长,并利用建立的方法对人胚胎干细胞细胞周期时长进行计算。结果 根据 EdU/BrdU 双标记的方法计算出人胚胎干细胞的 Ts 为 10.9 h, Tc 为 15.3 h。结论 基于 EdU/BrdU 双标记法能检测出细胞的 Ts 和 Tc 时长,是一种可以精准高效检测细胞周期的方法。

关键词 EdU; BrdU; 细胞周期; 免疫荧光; 人胚胎干细胞

中图分类号 Q 2-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2170-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.015

真核细胞的周期包括细胞生长、DNA 复制和分裂等不同阶段^[1]。细胞周期检测的常用方法是流式细胞术,此方法的准确性受到细胞数量、染料的比例和流式细胞仪的参数设定等因素影响^[2],并且得到的细胞周期只能显示各时期的比例,并不能得到细胞周期的时长。因此,准确计算细胞周期时长对细胞生物学的研究至关重要。

核苷类似物可以通过细胞 DNA 复制插入基因组,常用的核苷类似物有 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-Bromodeoxyuridine, BrdU),通过检测细胞中 EdU 或 BrdU 的标记情况,可确定细胞的增殖状态和周期分布^[3-7]。之前有文章^[8]通过核苷类似物双标记的方法检测细胞周期的时长,但是文章中使用的计算公式并不能准确地计算出细胞周期。因此,该研究基于之前发表文章^[8]中的细胞周期计算公式,对其进行改进,利用 HEK293T 细胞作为模型系统,使用 EdU 和 BrdU 对其进行双标记,计算出细胞的总

细胞周期时间 (total cell-cycle, Tc) 和 S 期时间 (synthesis-phase, Ts),并使用人胚胎干细胞对所建立的方法进行可行性检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 HEK293T 细胞(上海中乔新舟生物科技有限公司,货号:ZQ0083);BeyoClick™ Edu-488 细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号:C0071S);BrdU 和硼酸(德国 Sigma-Aldrich 公司,货号:B5002、B7901);Anti-BrdU(英国 Abcam plc 公司,货号:ab6326);山羊抗大鼠二抗 cy3(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,货号:A10522);4% 多聚甲醛、DAPI、抗荧光衰减封片剂和吐温-20(北京索莱宝科技有限公司,货号:P1110-500ml、C0060、S2100、T8200);双抗(青-链霉素混合液)、PBS 和胎牛血清(上海道鹏生物科技有限公司,货号:C3420、C3580-0500、C04001-500);DMEM 基础培养基(美国 Grand Island Biological 公司,货号:C11995500BT);胰蛋白酶(上海奕杉生物科技有限公司,货号:ES0014);牛血清白蛋白(上海生工生物公司,货号:A500023-0100);Y-27632 2HCl(美国 Cellect Chemicals 公司,货号:S1049);mTeSR™1 培养液(加拿大 STEMCELL Technologies 公司,货号:85850)。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(贵州宝途企业

2024-09-02 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:32000601);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]重点 005);贵州省教育厅科技创新团队(编号:黔教教[2023]068 号)

作者简介:袁月,女,硕士研究生;

张鹏,男,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: peng12zhang@outlook.com

投资管理有限公司,型号:3111)、Operetta 高内涵显微成像系统(美国 PerkinElmer,型号:HH1600)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK293T 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,放置在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养,细胞密度为 70% ~ 80% 时进行传代。人胚胎干细胞在过夜包被 Matrigel 基质胶的培养皿中生长,传代第 1 天使用含有终浓度为 10 μmol/L Y-27632 2HCl 的 mTeSRTM1 培养液,1 d 后换液为不含 Y-27632 2HCl 的 mTeSRTM1 培养液,放置在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养,细胞密度为 70% ~ 80% 时进行传代。

1.2.2 EdU/BrdU 标记 S 期细胞 细胞生长密度达到 70% ~ 80% 时,将细胞消化后接种于铺有细胞爬片的 6 孔板内培养 48 h,使用 10 μmol/L EdU 标记细胞 20 min,通过 PBS 洗涤 3 遍以去除 EdU。换正常培养基培养 1 h 后,进一步使用 100 μmol/L BrdU 标记 20 min,使用 PBS 洗涤 3 遍以去除 BrdU。

1.2.3 EdU/BrdU 荧光标记细胞 收集被 EdU/BrdU 标记的细胞爬片,使用 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 10 min。2 mol/L HCl 变性 30 min,PBS 洗 3 次,硼酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 8.5)中和 15 min,PBS 洗 3 次。4% BSA 室温下封闭 1 h。一抗使用 BrdU 进行 1:200 稀释,4 °C 孵育过夜,PBST 洗 3 次,每次 10 min。二抗使用山羊抗大鼠 cy3 进行 1:500 稀释,室温避光孵育 1 h,PBST 洗 3 次,每次 10 min。BeyoClickTM Edu-488 细胞增殖检测试剂盒配置的 Click 反应液室温避光孵育 30 min,PBST 洗 3 次,每次 10 min,DAPI 染色 5 min 后清洗,封片剂封片后显微镜观察染色情况。

1.2.4 EdU/BrdU 信号采集 利用高内涵细胞成像分析仪采集荧光信号,Harmony 图像分析方法对采集的荧光信号进行初步筛选。首先基于 DAPI 通道图像进行细胞圈选:根据细胞圆润度、单个细胞面积进行筛选,剔除粘黏细胞及大小异常细胞,获取单个完整细胞,在此基础上,使用 R4.3.0 软件对细胞核内的 EdU/BrdU 荧光信号强度进行定量,基于视野内无细胞区域和 EdU/BrdU 阴性细胞的荧光强度确定荧光阈值,并将 EdU 阳性的细胞群定义为 EdU +ve,BrdU 阳性的细胞群定义为 BrdU +ve,EdU 单阳性细胞群定义为 EdU +ve&BrdU-ve。

1.2.5 EdU/BrdU 标记的动力学参数计算 EdU/BrdU 是双胸腺嘧啶类似物,可整合到 S 期合成的 DNA 中。使用 EdU/BrdU 依次间隔标记增殖细胞,

通过免疫荧光可区分出确定的细胞群。根据这些细胞群的荧光标记量,基于以下公式计算出增殖细胞群的总细胞周期时间 T_c 和 S 期时间 T_s:

$$\text{BrdU}^{+ve}\% = \frac{\text{BrdU}^{+ve}}{(\text{BrdU}^{+ve} + \text{BrdU}^{-ve})} \quad (1)$$

BrdU^{+ve}% 为 BrdU 阳性细胞占比,表示任何时刻处于 S 期的细胞比例,分母表示细胞总数,分子表示 BrdU 阳性细胞数。

$$T_s = 1 \text{ h} \times \frac{\text{BrdU}^{+ve}}{(\text{EdU}^{+ve} \& \text{BrdU}^{-ve})} \quad (2)$$

T_s 表示增殖细胞群的 S 期持续时间,分母为 EdU 阳性(EdU 标记时处于 S 期)并且 BrdU 阴性(BrdU 标记时已退出 S 期)的细胞总数,表示 EdU 标记时处于 S 期而 BrdU 标记时已退出 S 期进入 G₂ 期的细胞,分子表示 BrdU 阳性细胞数,1 h 表示 EdU 和 BrdU 标记的时间间隔为 1 h。

$$T_c = \frac{T_s}{\text{BrdU}^{+ve}\%} \quad (3)$$

T_c 表示增殖细胞群的总细胞周期时间。

1.2.6 绘制 EdU/BrdU 荧光标记荧光分布散点图 为直观显示 EdU/BrdU 荧光标记分布情况,通过 R4.3.0 软件包“ggplot2”绘制两者荧光标记表达量的散点图。

1.2.7 人胚胎干细胞验证可行性 人胚胎干细胞的发育可塑性使其在基础研究和再生医学领域具有无限的可能,且人胚胎干细胞细胞周期目前研究较多,相对比较明确。之前对胚胎干细胞的周期进行研究中发现,胚胎干细胞 T_c 时长为 15 ~ 16 h,50% ~ 70% 处于 S 期^[9]。因此,本研究选用人胚胎干细胞来对 EdU/BrdU 双标记法检测细胞周期动力学的方法进行可行性验证。

2 结果

2.1 EdU/BrdU 实验设计 使用 EdU 和 BrdU 分别对 HEK293T 细胞进行间隔标记。假设细胞周期是均匀分布的,则 EdU 和 BrdU 初始标记的细胞量一致,同周期的细胞,单位时间内退出 S 期的细胞量也是一致的。基于此,假设 S 期的细胞数量为 3,则 EdU 标记上的细胞数为 3,间隔时间为 1 h,使用 BrdU 进行标记,被 EdU 标记的细胞里会有 1 个细胞退出 S 期,进入 G₂ 期,而 BrdU 能标记上的细胞数也为 3,且有 2 个细胞为 EdU 和 BrdU 标记期间一直处于 S 期的细胞,见图 1A;根据同周期细胞,单位时间内退出 S 期的细胞数量一致,EdU 和 BrdU 标记

的间隔时间改为 2 h, 则当 BrdU 进行标记时, 被 EdU 标记的细胞里会有 2 个细胞退出 S 期, 进入 G₂ 期, 而 BrdU 能标记上的细胞数为 3, 其中有 1 个细胞为 EdU 和 BrdU 标记期间一直处于 S 期的细胞, 见图 1 B。根据之前文章中的描述^[8], T_{SI} 和 T_{CI} 分别为:

$$T_{SI} = 1 \text{ h} \times \left(\frac{\text{EdU}^{+ve} \& \text{BrdU}^{+ve}}{\text{EdU}^{+ve} / \text{BrdU}^{-ve}} \right) \quad (4)$$

分子表示 EdU 和 BrdU 标记期间一直处于 S 期的细胞, 分母表示 EdU 标记以后, 并且 BrdU 标记前退出 S 期的细胞, 文章里 EdU 和 BrdU 的标记间隔时间为 1 h。

$$T_{CI} = \frac{T_{SI}}{(\text{BrdU}^{+ve} / \text{BrdU}^{-ve})} \quad (5)$$

分母表示任何时刻处于 S 期的细胞与非 S 期细

胞的比值, 根据之前文章中的公式(4), 假设 EdU 和 BrdU 标记时间间隔分别为 1 h、2 h, 根据(4)公式计算得 T_{SI} 分别为:

$$T_{SI-1h} = 1 \text{ h} \times \left(\frac{2}{1} \right) = 2 \text{ h} \quad (6)$$

$$T_{SI-2h} = 2 \text{ h} \times \left(\frac{1}{2} \right) = 1 \text{ h} \quad (7)$$

T_{SI} 随着标记时间间隔的改变而改变, 结果不合理, 且(5)中的分母表示 S 期与非 S 期的比例, 即(5)表示非 S 期的周期。

对公式进行改进, 假设 EdU 和 BrdU 标记时间间隔分别为 1 h、2 h, 根据(2)公式计算得 T_S 为:

$$T_{S-2h} = T_{S-1h} = 1 \text{ h} \times \left(\frac{3}{1} \right) = 3 \text{ h} \quad (8)$$

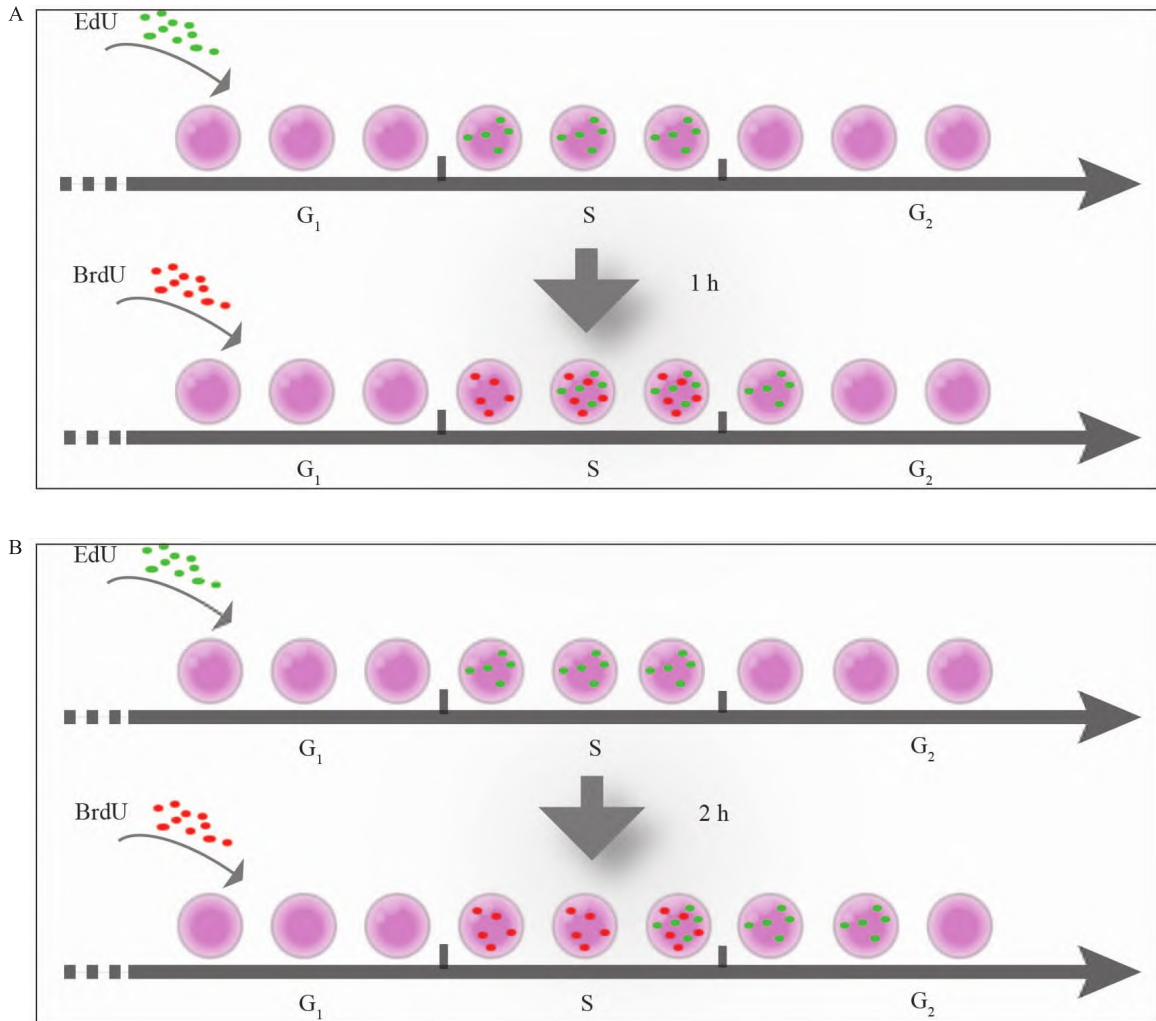


图 1 EdU/BrdU 双标记示意图

Fig. 1 Schematic diagram of EdU/BrdU double labeling

A: EdU and BrdU marking with one hour's interval; B: EdU and BrdU marking with two hours' interval.

此时, T_s 不随着标记时间间隔的改变而改变, T_s 的长短与 S 期被标记上的细胞数相关。综合公式(6)、(7)、(8)结果,提示改进后的公式(2)能合理表示增殖细胞群的 T_s 。

2.2 EdU/BrdU 荧光标记细胞结果 对标记后的细胞进行免疫荧光染色并采集荧光信号,EdU/BrdU 双阳性细胞表示在 EdU 和 BrdU 标记期间一直处于 S 的细胞,见图 2A,EdU 单阳性细胞表示在 EdU 标记期间处在 S 期,BrdU 标记时细胞已经退出 S 期,进入了 G_2 期,见图 2B,在整个 EdU/BrdU 标记期间都处在 S 期以外的其它细胞,则不会被标记上,见图 2C。

2.3 EdU/BrdU 信号采集结果 高内涵 Harmony 图像分析方法对采集到的荧光信号进行初筛,再通过 R 软件分析获得荧光信号,由散点图可看出,被标记上的细胞群有 EdU/BrdU 双阳性、EdU 单阳性

和 EdU/BrdU 双阴性,见图 3A。EdU 的荧光信号强度分布在 15 000 ~ 30 000 的细胞数最多,而 BrdU 的荧光强度分布在 8 000 ~ 15 000 最多,这是由于在 EdU/BrdU 标记的间隔期 1 h 内,EdU 随着 DNA 的复制而增多,见图 3B、3C。

2.4 细胞周期动力学计算 基于 Harmony 图像分析方法及 R 软件对细胞核内的 EdU/BrdU 荧光信号强度进行定量,基于视野内无细胞区域和 EdU/BrdU 阴性细胞的荧光强度确定荧光阈值,EdU 单阳性细胞数为 1 072,Brdu 阳性细胞数为 8 371,总细胞数为 19 461,则根据公式可计算出 EdU/BrdU 双标记的 HEK293T 细胞中,Brdu 的荧光率 $BrdU^{+ve}\%$ 为:

$$BrdU^{+ve}\% = \left(\frac{BrdU^{+ve}}{BrdU^{+ve} + BrdU^{-ve}} \right) = \frac{8\,371}{19\,461} = 43.0\% \quad (9)$$

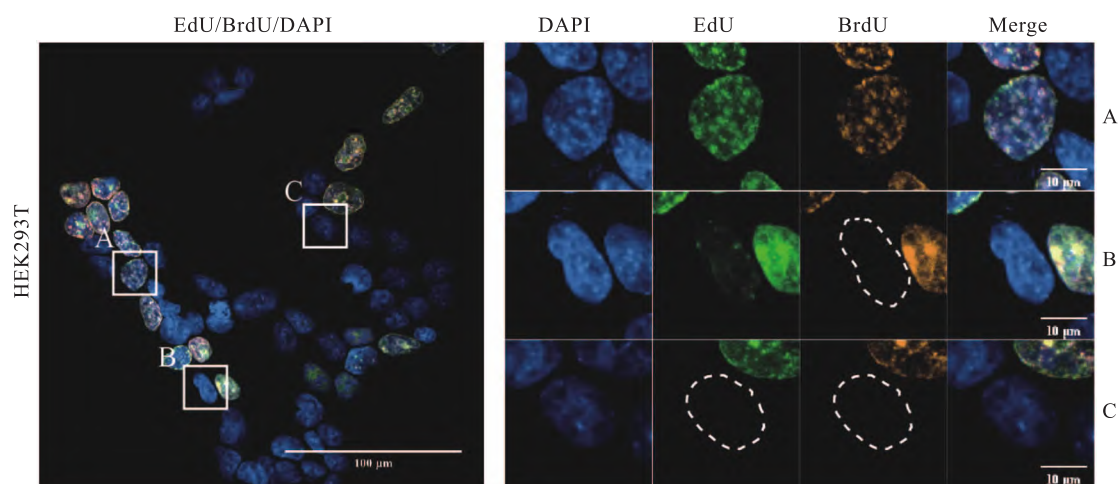


图2 HEK293T 细胞 EdU/BrdU 双标记免疫荧光染色 $\times 20$

Fig. 2 Immunofluorescence staining of HEK293T cells with EdU/BrdU double labeling $\times 20$

A: EdU/BrdU double positive; B: EdU single positive; C: EdU/BrdU double negative.

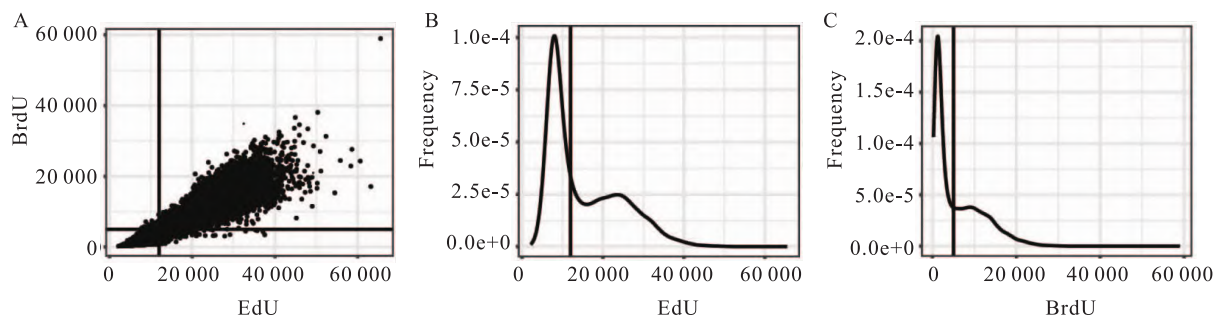


图3 EdU/BrdU 信号分布统计图

Fig. 3 Statistical map of EdU/BrdU signal distribution

A: Scatter plot of EdU/BrdU signal value distribution; B: Frequency plot of EdU signal value distribution; C: Frequency plot of BrdU signal value distribution.

HEK293T 细胞的 T_s 期时长为:

$$T_s = 1 \text{ h} \times \left(\frac{\text{BrdU}^{+ve}}{\text{EdU}^{+ve} \& \text{BrdU}^{-ve}} \right) = 1 \text{ h} \times \frac{8\ 371}{1\ 072} = 7.8 \text{ h} \quad (10)$$

HEK293T 细胞的 T_c 期时长为:

$$T_c = \left(\frac{T_s}{\text{BrdU}^{+ve}\%} \right) = \frac{7.8}{43.0\%} \text{ h} = 18.1 \text{ h} \quad (11)$$

2.5 人胚胎干细胞的 EdU/BrdU 信号采集结果

高内涵 Harmony 图像分析方法对采集到的荧光信号进行初筛,再通过 R 软件分析获得荧光信号,由散点图可看出,人胚胎干细胞中被标记上的细胞群有 EdU/BrdU 双阳性、EdU 单阳性和 EdU/BrdU 双阴性,见图 4。

2.6 人胚胎干细胞的细胞周期动力学计算结果

对人胚胎干细胞的 EdU/BrdU 荧光标记信号后,基于视野内无细胞区域和 EdU/BrdU 阴性细胞的荧光强度确定荧光阈值,EdU 单阳性细胞数为 321, BrdU 单阳性细胞数为 3 508,总细胞数为 4 912,则根据公式可计算出 EdU/BrdU 双标记的人胚胎干细胞中, BrdU 的荧光率 $\text{BrdU}^{+ve}\%$ 为:

$$\text{BrdU}^{+ve}\% = \left(\frac{\text{BrdU}^{+ve}}{\text{BrdU}^{+ve} + \text{BrdU}^{-ve}} \right) = \frac{3\ 508}{4\ 912} = 71.4\% \quad (11)$$

人胚胎干细胞的 T_s 期时长为:

$$T_s = 1 \text{ h} \times \left(\frac{\text{BrdU}^{+ve}}{\text{EdU}^{+ve} \& \text{BrdU}^{-ve}} \right) = 1 \text{ h} \times \frac{3\ 508}{321} = 10.9 \text{ h} \quad (12)$$

人胚胎干细胞的 T_c 期时长为:

$$T_c = \left(\frac{T_s}{\text{BrdU}^{+ve}\%} \right) = \frac{10.9}{71.4\%} = 15.3 \text{ h} \quad (13)$$

(12)、(13) 检测结果与文献报道的符合^[9]。提

示使用人胚胎干细胞检测 EdU/BrdU 双标记法检测细胞周期动力学的方法具有可行性。

3 讨论

细胞周期长度不是固定的,而是根据细胞类型以及它们所处的环境变化的^[10-12]。通过检测细胞周期的时长,可以了解细胞生命活动和增殖情况,这对于研究生物体的发育、生长和组织修复等生命过程非常重要^[13],良好的检测方法有助于在生物医学研究和临床治疗中准确揭示细胞周期的动态变化,满足分子生物学、发育生物学、肿瘤学等多个领域的研究需求。

细胞周期检测方法包括流式细胞术、同位素法检测、周期相关蛋白检测、标记 DNA 复制等多种技术。然而,现有的细胞周期检测方法仍存在一些局限。流式细胞术是通过碘化丙啶(propidium iodide, PI)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)和烟酸己可碱(Hoechst)等对 DNA 含量进行染色,进而检测处于 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 阶段的细胞比例^[14],虽然能快速得到大量样本的细胞周期分布信息,却只能检测光学信号的强弱与总量,难以提供细胞形态学的信息,且 PI 是根据 DNA 含量不同来分析细胞各时期所占比例,不能检测出细胞周期的具体时长。本研究建立的 EdU/BrdU 双标记法检测细胞周期,通过统计单位时间内退出 S 期的细胞数,计算出细胞的 T_s 和 T_c 时期的具体时长,后续实验可以结合流式细胞术检测出的各时期所占比例,推算出细胞周期其它时期的具体时长。流式细胞术实验通常需要大量细胞进行检测,且染色和洗涤过程中极易造成细胞丢失^[15],这对于难以获得

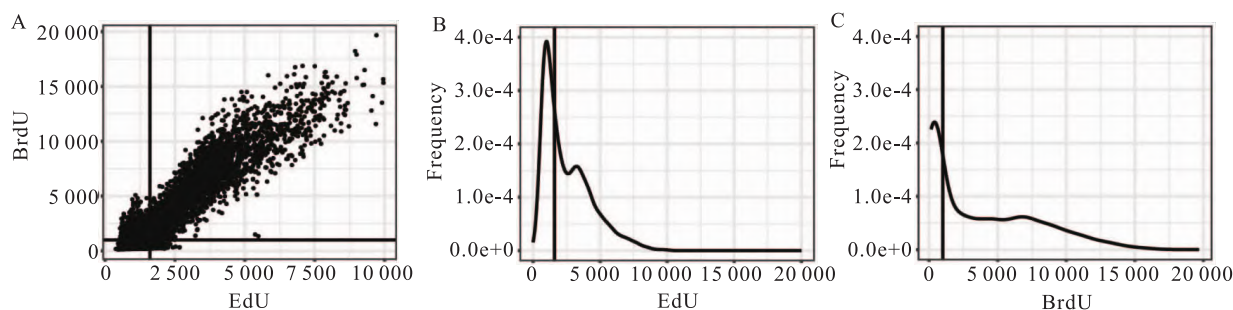


图4 胚胎干细胞 EdU/BrdU 信号分布统计图

Fig. 4 Statistical map of EdU/BrdU signal distribution in human embryonic stem cells

A: Scatter plot of EdU/BrdU fluorescence distribution; B: Frequency diagram of EdU fluorescence distribution; C: Frequency diagram of BrdU fluorescence distribution.

或者稀有的细胞样品而言,是一个巨大的挑战,然而本研究建立的方法可以很好地解决这个问题。首先,本实验中的免疫荧光染色不需要对细胞进行消化,一定程度上减少了细胞的损耗,其次,细胞数量不需要很多,可以均匀铺板在爬片上即可。虽然同位素标记法在精度上有其优势,但是同位素法检测细胞生长和增殖需要放射性同位素及特定的仪器设备,且为了准确测量细胞周期的时长,需要在不同时间点对细胞进行同位素标记,并测量标记物的累积量,且使用放射性同位素标记 DNA 存在辐射风险,因此,在应用上有一定的局限性。本研究中使用的高内涵细胞成像分析仪收集荧光信号与 Harmony 图像分析对采集的荧光信号进行初筛的仪器是可替代的,免疫荧光染色后的细胞可以使用普通荧光显微镜进行荧光信号采集,之后利用 ImageJ 软件中的 StarDist 插件,即可对采集的荧光信号进行初筛的计算。因此本研究建立的方法中仪器具有可替代性,使得该方法更容易实施,具有普遍性,只测量一次就可以检测到不同时间点的细胞中 DNA 复制情况,该方法更省时、方便。此外,EdU 和 BrdU 具有较小的分子量,使用它们进行双标记细胞的细胞周期计算,具有更高的灵敏度和准确性、同时检测不同细胞周期阶段的优点。

本研究建立的 EdU/BrdU 双标记法检测细胞周期法也有一定的局限性。本研究的公式是建立在细胞周期均匀分布的基础上,即同样时间内,处于 S 期的细胞, DNA 复制速度是相等的,所有 EdU 和 BrdU 初始标记 DNA 的量一致,所以 EdU 和 BrdU 处理时间需严格把控。另外,铺板的细胞不能过于密集,聚团生长,否则很难区分单个细胞,从而影响结果的准确性。

总之,本研究优化了双胸腺嘧啶标记检测细胞周期的方法,使用 EdU/BrdU 双标记 DNA,通过免疫荧光染色后统计荧光强度,可以计算出细胞周期的 S 期时长与总细胞周期时长。本研究为细胞周期的计算提供了一种新方法,为探索细胞周期调控的机制和深入理解细胞周期的动态变化提供技术和方法支持。

参考文献

- [1] Tyson J J, Novák B. Time-keeping and decision-making in the cell cycle[J]. *Interface Focus*. 2022, 12(4): 20210075. doi: 10.1098/rsfs.2021.0075.
- [2] 张鹏,彭涛,范安然,等. Alexa Fluor 488 NHS Ester 染料提高流式细胞周期检测结果的可行性[J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(6): 637-40, 646. doi:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.004.
- [3] Zhang P, Peng T, Fan A R, et al. Feasibility of Alexa Fluor 488 NHS Ester dye for improving flow cycle detection in flow cytometry [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2019, 44(6): 637-40, 646. doi:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.004.
- [4] Schorl C, Sedivy J M. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells[J]. *Methods*, 2007, 41(2): 143-50. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.07.022.
- [5] Pereira P D, Serra-Caetano A, Cabrita M, et al. Quantification of cell cycle kinetics by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)-coupled-fluorescence-intensity analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40514-32. doi: 10.18632/oncotarget.17121.
- [6] 周洋,涂彬,宋凯,等. ALKBH5 调控大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(12): 1870-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.004.
- [7] Zhou Y, Tu B, Song K, et al. Effects of ALKBH5 regulation on proliferation of cardiac fibroblasts in rats [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(12): 1870-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.004.
- [8] Martynoga B, Morrison H, Price D J, et al. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis[J]. *Dev. Biol*, 2005, 283(1): 113-27. doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.005.
- [9] Bialic M, Al Ahmad Nachar B, Koilak M, et al. Measuring S-phase duration from asynchronous cells using dual EdU-BrdU pulse-chase labeling flow cytometry [J]. *Genes*, 2022, 13(3): 408. doi:10.3390/genes13030408.
- [10] Harris L, Zalucki O, Piper M. Correction to: BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations[J]. *J Mol Histol*, 2018, 49(4): 447. doi:10.1007/s10735-018-9783-2.
- [11] Padgett J, Santos S D M. From clocks to dominoes: lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells [J]. *FEBS Lett*, 2020. doi:10.1002/1873-3468.13862.
- [12] Kühl N M, Rensing L. Heat shock effects on cell cycle progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(3): 450-63. doi: 10.1007/PL00000707.
- [13] Douglas R M, Haddad G G. Genetic models in applied physiology: invited review: effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2003, 94(5): 2068-83. doi: 10.1152/jappphysiol.01029.2002.
- [14] Khan A, Singh P, Srivastava A. Iron: key player in cancer and cell cycle? [J] *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 62: 126582. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126582.
- [15] 马艺戈,王冰蕊,高洁,等. 氯化高铁血红素诱导 K562 细胞红系分化对其细胞周期的影响[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(4): 409-16. doi: 10.19586/j.2095-2341.2020.0033.

(下转第 2182 页)

the primary and secondary aggregated areas being significantly higher than that in other regions ($P < 0.01$). The Kriging interpolation prediction map suggested that the four prefectures in southern Xinjiang continued to be high-risk regions for tuberculosis (incidence rate $> 300/100\ 000$). The overall incidence rate in the northern region was relatively low, with the lowest rate observed in Urumqi, radiating outwards. **Conclusion** The incidence rate of tuberculosis in Xinjiang shows an upward trend before 2018, followed by a year-on-year decrease. The centroid of the incidence rate shifts towards the northeast. From 2010 to 2022, the tuberculosis epidemic in Xinjiang exhibits a notable spatiotemporal clustering, particularly prominent in the southwestern region, where the four prefectures constitute high-risk areas for tuberculosis. The prevention and control efforts of tuberculosis in Xinjiang should prioritize the regions with high tuberculosis incidence, intensifying prevention and control measures as well as policy support.

Key words tuberculosis; Kriging interpolation; center of gravity transfer model; spatiotemporal distribution; spatio-temporal scan statistics; standard deviational ellipse analysis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 72163033, 72064036, 72174175)

Corresponding author Zhang Liping, E-mail: zhanglp1219@163.com

(上接第 2175 页)

[13] Ma Y G, Wang B R, Gao J, et al. The effect of hemin-induced erythroid differentiation in K562 cells on cell cycle[J]. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(4): 409–16. doi: 10.19586/j.2095–2341.2020.0033.

[14] Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic methods of cell cycle analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3674. doi: 10.3390/

ijms24043674.

[15] 董波, 陈肖华, 张浩, 等. 一种改进的用于测定细胞周期的细胞制备方法[J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(2): 124–6.

[15] Dong B, Chen X H, Zhang H, et al. An improved method of cell preparation for cell cycle assay[J]. *Mil Med Sci*, 2002, 26(2): 124–6.

Method for retermine cell-cycle dynamics based on EdU/BrdU dual labeling

Yuan Yue^{1,2}, Ai Lili², Zhang Peng^{1,2}

(¹Dept of Biology, Basic Medical Sciences College,

²Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Key Laboratory of Functional Nucleic Acids-Based Biopharmaceutical Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To establish a method for detecting the duration of the synthesis-phase (T_s) and the total cell-cycle (T_c) based on the dual labeling of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-Bromodeoxyuridine (BrdU).

Methods HEK293T cells were double labeled with EdU and BrdU and then subjected to immunofluorescence staining. The fluorescence signals were collected using a High-Content Imaging System. The numbers of EdU-positive and BrdU-positive cells in the entire cell population were counted. Based on the cell cycle calculation formula in a previously published article, it was improved to accurately calculate the duration of T_s and T_c of cells. The cell cycle time of human embryonic stem cells was calculated using the established method. **Results** Based on the kinetic parameters of the EdU/BrdU dual labeling, the T_s of human embryonic stem cells was 10.9 h, and the T_c was 15.3 h. **Conclusion** The EdU/BrdU dual labeling method can be used to detect the duration of the cell cycle, providing an accurate and efficient method for cell cycle analysis.

Key words EdU; BrdU; cell-cycle; immunofluorescence; hESC

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 32000601); Scientific and Technological Project of Guizhou Province (No. Qiankehe Foundation-ZK[2021] Key 005); Science and Technology Innovation Team of Guizhou Provincial Department of Education (No. Qianjiaoji [2023] 068).

Corresponding author Zhang Peng, E-mail: peng12zhang@outlook.com