

## 不同固定剂在激光共聚焦荧光技术中的效果评价

范瑾瑾, 骆宁, 董秀清, 余学清\*

(中山大学附属第一医院肾内科实验室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨3种不同的固定剂在激光共聚焦免疫荧光技术中对信号表达的影响。【方法】对培养的NRK-52E细胞分成胞浆,胞膜及胞核抗原3组,每组用4 g/L PFA,甲醇及丙酮分别固定后,完成免疫荧光实验;原代滑膜成纤维样细胞分两组用4 g/L PFA固定后分别用TritonX-100和预冷的甲醇进行打孔,完成免疫荧光实验之后,使用Confocal显微镜在条件同等的情况下观察并拍摄荧光图像,以证实不同的固定剂对信号表达的影响。【结果】胞浆蛋白 $\alpha$ -SMA用丙酮固定时信号清晰锐利,将Actin蛋白的丝状结构表达得非常充分。胞膜蛋白ZO-1用甲醇固定处理的信号最清晰。胞核蛋白磷酸化的Smad3用4 g/L PFA固定时p-Smad3信号与细胞核具有很好的共定位关系。原代滑膜成纤维样细胞用预冷甲醇打孔处理的细胞,其磷酸化的骨架相关蛋白(P-ERM)蛋白信号明显优于用TritonX-100打孔处理的细胞。【结论】针对不同抗原结构特点选用固定剂;有机溶剂固定剂用于细胞支架成分的固定,交联剂固定剂用于膜相关成分的固定,同时使用交联剂固定剂及有机溶剂打孔可较好的保存抗原而获得高质量的荧光图片。

**关键词:** 细胞免疫荧光; 固定剂; 激光扫描共聚焦显微镜

**中图分类号:** R-331      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0600-05

### Evaluation of Different Fixatives in Confocal Immunofluorescence

FAN Jin-jin, LUO Ning, DONG Xiu-qing, YU Xue-qing\*

(Renal Laboratory, Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To evaluate the immunostaining effect of three different fixatives by confocal microscopy. 【Methods】 NRK-52E cells were cultured and fixed by 4 g/L PFA, methanol, and acetone, respectively, followed by three different antibodies to determine the representative antigens in membranes, cytoplasm, and nucleus under the confocal microscopy. Primary synovial fiber-like cells were cultured and fixed by 4 g/L PFA, permeabilizing by TritonX-100 and cooled methanol respectively. Immunostaining results of detecting the P-ERM protein were performed by confocal microscopy under the same observing condition. 【Results】 The signals of a cytoplasm skeleton protein and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) showed sharp and clear, when the NRK cells were treated with acetone. A membranes protein, ZO-1 showed best results when the cells were treated with methanol. Compared to other fixatives, the cells fixed with 4 g/L PFA showed the best co-localization results of p-Smad3 protein with nucleus signals. The signals of P-ERM on primary synovial fiber-like cells indicated that it was significantly better when the cell permeabilizing by cooled methanol, comparing with permeabilization by TritonX-100. 【Conclusion】 Organic fixative were applied for fixing the cytoskeleton components and cross-linking fixative were suit for fixing the membrane components. Fixing by cross-linking agents followed by permeabilization of organic solvents can keep the antigens well and therefore could be used to take high quality pictures.

**Key word:** immunocytochemistry; fixative; confocal microscopy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 600-604]

自Coons等于1941年首次采用荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术获得成功<sup>[1]</sup>,免疫

荧光技术因其特异性强、敏感性高、速度快而广泛应用于免疫组织化学实验。运用免疫荧光技术探

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 国家985工程重点学科建设基金(2050205-203)

作者简介: 范瑾瑾, E-mail: fan\_jinjin@yahoo.com; \*通信作者: 余学清, 教授, 博士生导师, E-mail: yuxq@mail.sysu.edu.cn

察和显示细胞内抗原或半抗原物质等方法称为免疫荧光细胞化学技术 (immunocytochemistry, ICC), 其样本如同其它免疫组化主要来源于组织切片、血液涂片、培养的细胞、细胞悬液等。常规的 ICC 操作步骤大致相同, 包括实验材料固定、封闭、抗体孵育和封片<sup>[1]</sup>, 尽管实验样本、实验内容、抗体来源、实验步骤和条件均相同, 但最终获得的显微镜图像的质量却差别很大。我们长期的实验经验提示其可能与实验样本的处理有关, 尤其是与生物材料的固定有关。我们前期工作表明, 选择正确的固定剂和固定方法是得到高质量荧光图像的关键, 而激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscopy) 特有的细胞断层扫描功能, 可以将细胞内的蛋白准确定位<sup>[2]</sup>, 从而成为观察细胞免疫荧光结果的最佳工具。本文就以培养的细胞作为载体, Confocal 作为工具, 采用 4 g/L 多聚甲醛缓冲液 (PFA)、甲醇 (methanol) 和丙酮 (acetone) 三种常规的固定剂, 观察它们分别对胞膜信号、胞浆信号和胞核信号表达的影响, 同时观察促渗透试剂 TritonX-100 和甲醇对信号表达的影响<sup>[3]</sup>, 以证实不同固定剂对荧光图片质量的影响, 为实验研究中恰当地选用固定剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

1.1.1 培养法与分组 大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E, 美国 ATCC) 用含体积分数 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco) 的高糖 DMEM/F12 培养基置 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 ~ 48 h, 待细胞长至亚融合状态, 用体积分数 0.25% Trypsin-EDTA 消化, 传代至 35 mm 小皿中制成细胞爬片, 分 3 组。

A: 胞浆蛋白  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 组: NRK 细胞无血清化 16 h 后, 加入 10 ng/mL 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ , Sigma 美国) 刺激 6 h 后固定细胞。

B: 胞膜蛋白 ZO-1 组: NRK 细胞无血清化 24 h 后固定细胞。

C: 胞核蛋白 p-Smad3 组: NRK 细胞无血清化 16 h 后, 加入 10 ng/mL TGF- $\beta$  刺激 24 h 后固定细胞。

1.1.2 原代滑膜成纤维样细胞 取人关节镜术后关节滑膜组织 2 cm 大小, 剪碎后用 1 mg/mL 胶原

酶 (Invitrogen 美国) 37 °C 消化 4 h, 用 200 目筛网过滤后, 离心 (5 000 r/min,  $r = 15$  cm, 10 min) 弃上清, 沉淀加体积分数 20% 胎牛血清 (Gibco, 美国) DMEM 培养基培养 24 ~ 48 h, 细胞贴壁后改为体积分数 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国) 待细胞长至亚融合状态, 用体积分数 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 美国) 消化, 传代至 35 mm 小皿中制成细胞爬片, 用肿瘤坏死因子 10  $\mu$ g/mL TNF- $\alpha$  (R&D, 美国) 刺激 12 h 后固定细胞。观察骨架相关蛋白 Phospho-Ezrin (Thr 567)/Radixin (Th 564)/Moesin (Th 558), 简称 P-ERM 在细胞内的表达。

### 1.2 抗体特性和来源

胞浆蛋白抗  $\alpha$ -SMA 第一抗体为 Mouse anti-Monoclonal Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle (cat#A5228 Sigma, 美国), 胞膜蛋白 ZO-1 的一抗是: Rabbit anti-ZO-1 N-term (cat#40-2300 Invitrogen, 美国), 胞核蛋白磷酸化的 Smad3 的一抗是 Rabbit anti-p-Smad3 (cat#ab52309 Abcam, 美国), 骨架相关蛋白 P-ERM 的一抗是 Rabbit anti-p-ERM antibody (cat#3141 Cell Signaling, 美国)。相应的荧光二抗分别是: Alexa Fluor488 rabbit anti-mouse-IgG (cat#A11059), Alexa Fluor546 donkey anti-rabbit IgG (cat#A10040) 和 Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG (cat#A11008) 均来自于美国 Invitrogen 公司。

### 1.3 样本处理和固定

样本采用 4 g/L PFA 室温固定 15 min, 再用体积分数 0.25% TritonX-100 打孔 5 min。预冷的甲醇 -20 °C 固定 10 min, 无需打孔。预冷的丙酮 -20 °C 固定 10 min, 无需打孔。4 g/L PFA 室温固定 15 min, 再用预冷的甲醇 -20 °C, 打孔, 10 min。

### 1.4 免疫细胞化学实验

NRK 细胞分为 A, B, C 三组, 每组准备 3 张细胞爬片, 分别用 3 种固定剂按不同的方式固定; 原代滑膜成纤维样细胞准备两张细胞爬片, 都用 4 g/L PFA 室温固定 15 min, 一张用体积分数 0.25% TritonX-100 打孔 5 min 另一张用预冷的 (-20 °C) 甲醇, 打孔, 10 min。然后分别用 5 g/L 小牛血清 (BSA) + 10 g/L 二抗种属来源的正常血清作为封闭液, 室温封闭 1 h; 用封闭液稀释一抗, 一抗浓度分别为:  $\alpha$ -SMA 1:200, ZO-1 1:50, p-Smad3 1:200, P-ERM 1:100, 4 °C 过夜; 次日加入相应二抗 (1:1000 封闭液稀释) 避光室温 1 h; 用 DAPI (Sigma, 美国) 1:400 (用去离子水稀释) 衬染 5 min,

中性树脂 Permout G (EM Science, 美国) 封片。

### 1.5 实验结果的评价方法和标准

置于 Confocal (Carl Zeiss 510 META, 德国) 显微镜下观察, 扫描获取图像。扫描针孔 (Pinhole) 均为 1 Airy Units。同一种蛋白的扫描参数固定不变。荧光显微镜所观察到的图像, 主要以两个指标判断结果, 一个是形态学特征; 另一个是荧光的亮度, 在结果的判定中, 必须将二者结合起来, 染色结果以阳性信号部位着色清晰、背景不着色为宜。

## 2 结果

### 2.1 三种固定方式处理下的胞浆蛋白信号

结果表明, 无论用何种固定剂都可检测到  $\alpha$ -SMA 的信号 (图 1), 其中 4 g/L PFA 固定所得到的信号呈弥散状, 用甲醇固定所得到的信号有一定的立体感, 当选用脂溶性较强的固定剂丙酮时, 信号清晰锐利, 将 Actin 蛋白的丝状结构表达得非常充分。

### 2.2 三种固定方式处理下的胞膜蛋白信号

实验结果表明, 三种固定剂处理的细胞均能检测到 ZO-1 信号, 但以甲醇固定处理的信号最清晰, 丙酮固定的信号最弱 (图 2)。

### 2.3 三种固定方式处理下的胞核蛋白信号

实验结果表明, 4 g/L PFA 处理的细胞, Smad3 信号与细胞核具有很好的共定位关系。而另外两种固定方式均存在一定的共定位偏差 (图 3)。

### 2.4 同一种固定方法用两种不同的促渗透剂处理的胞浆蛋白

图 4 所示的细胞是用 4 g/L PFA 固定的原代滑膜成纤维样细胞, 绿色胞浆信号代表 P-ERM。实验结果表明, 选用预冷甲醇打孔处理的细胞, 其 P-ERM 蛋白信号明显优于用体积分数 0.25% TritonX-100 打孔处理的细胞。

## 3 讨论

传统的荧光显微镜使用的是场光源, 标本上每一点的图像都会受到邻近点的衍射或散射光的干扰; 当观察的样本是具有层次区别的重叠结构的细胞时, 它的平面成像功能只能得到荧光图像而无法观察细胞内部微细结构。激光扫描共聚焦显微镜由于激光和荧光的共聚焦成像以及 Pinhole 的应用阻止了焦点以外的干扰衍射光和散射光,

这样得到的图像是样本的光学横断面, 克服了普通显微镜图像模糊的缺点, 大大地提高了荧光图像的分辨率<sup>[2]</sup>。而为了观察细胞内部微细结构, 确保抗体与其对应抗原自由结合, 细胞首先必须固定和打孔。完美的固定就是在将抗原稳定固定于本来的位置, 同时又保留细胞及亚细胞结构的真实性, 从而让抗体不受阻碍地穿过整个细胞到达靶抗原<sup>[7]</sup>。

一般分子生物学实验室常用的固定剂分为两大类: 有机溶剂和交联剂<sup>[8]</sup>。有机溶剂固定剂例如丙酮、甲醇可以在去除脂质使细胞脱水的同时, 使蛋白质瞬时沉淀在细胞骨架上。作为一种胞浆蛋白,  $\alpha$ -SMA 是一种具有收缩能力的微丝蛋白, 属于 Actin (肌动蛋白) 蛋白家族。该种蛋白是在所有真核细胞中都表达的高度保守的蛋白质, 它们沿微管组成了细胞骨架的主要成分<sup>[4]</sup>。我们的结果表明, 做为一种胞浆蛋白, 无论用何种固定剂, 都可以检测到  $\alpha$ -SMA 的信号 (图 1)。如图 1C 所示的, 用丙酮固定过的信号表现得清晰锐利极富立体感。

常用的交联剂是多聚甲醛, 通常它通过氨基的自由端构建细胞间的桥梁, 从而搭起连接抗原的网络系统。比起有机溶剂的固定剂, 交联剂固定剂可更好地保护抗原的结构, 但由于它的作用温和可能会损失某些细胞成份的抗原性, 而且需要额外的打孔步骤以便抗体与其相应的抗原得到充分的结合<sup>[8]</sup>。如图 2 所示, ZO-1 作为一种细胞膜连接蛋白, 在丙酮固定组, ZO-1 表现出不连续性, 此可能为脂溶性较强的丙酮损伤了膜的通透性所致。用 4 g/L PFA 固定细胞对抗原有很好的保护作用, 但 ZO-1 信号表现得比较模糊, 不及用甲醇固定的细胞表达得锐利结实。

有机溶剂固定剂的溶脂作用有可能引起细胞的脱水变形, 从而无法对抗原准确定位。有文献报道, 磷酸化的 Smad3 在转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激 24 h 后完全转入细胞核<sup>[5]</sup>。图 3A、B 所示, 当选用脂溶性的丙酮和甲醇固定细胞时, 这两种固定剂的脂溶性损伤了细胞的通透性, 磷酸化的 Smad3 部分溢出核外, 表现出和胞核的不完全共定位。而用 4 g/L PFA 做为固定剂保护了磷酸化的 Smad3 抗原的稳定性, 荧光显示出的信号锐利结实且与细胞核有很好的共定位。

P-ERM 蛋白是细胞膜与细胞骨架肌动蛋白之间的连接蛋白。它是一个由长排的肌动蛋白通过  $\alpha$ -辅肌动蛋白连接起来的网络。沿着骨架的边

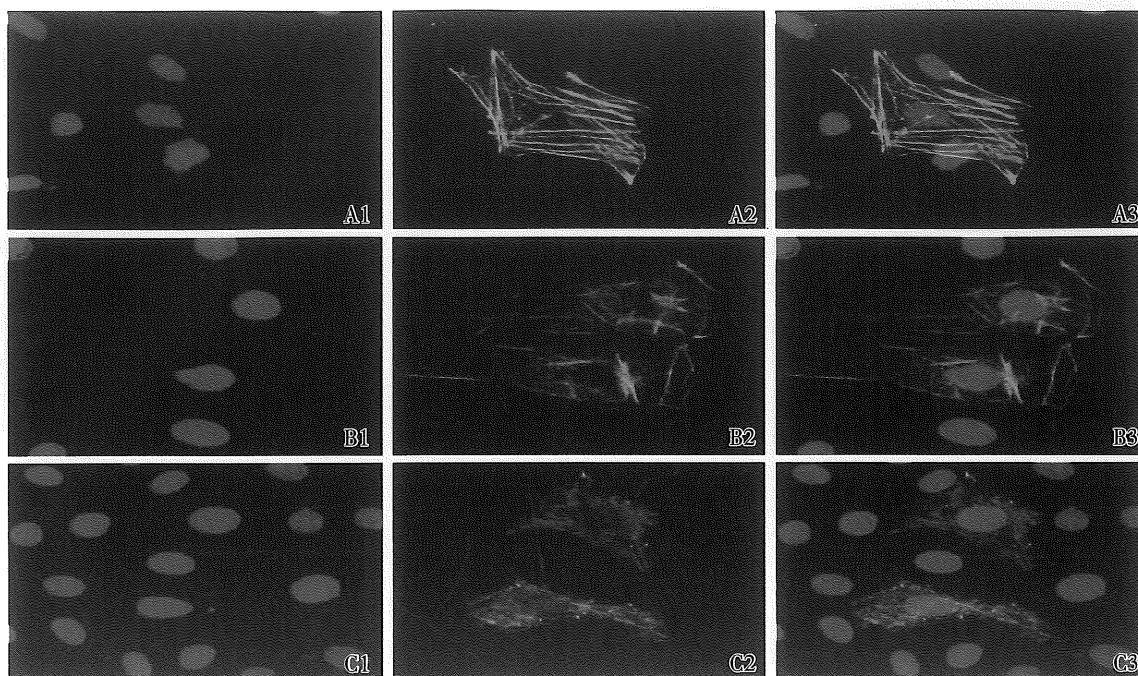


图 1 NRK 细胞经 TGF- $\beta$  刺激后胞浆蛋白  $\alpha$ -SMA 的表达

Fig.1 Expression of cytoplasm  $\alpha$ -SMA in NRK cells after TGF- $\beta$  stimulation

A: acetone fixed; B: methanol fixed; C: 4 g/L PFA fixed; Immunofluorescence staining, Confocal  $\times$  800

In each set of panels, the left panels (A1,B1,C1) show nuclear staining (DAPI, blue), the middle panels (A2,B2,C2) show  $\alpha$ -SMA antibody staining (green), and the right panels (A3,B3,C3) are merged images of the left and middle images.

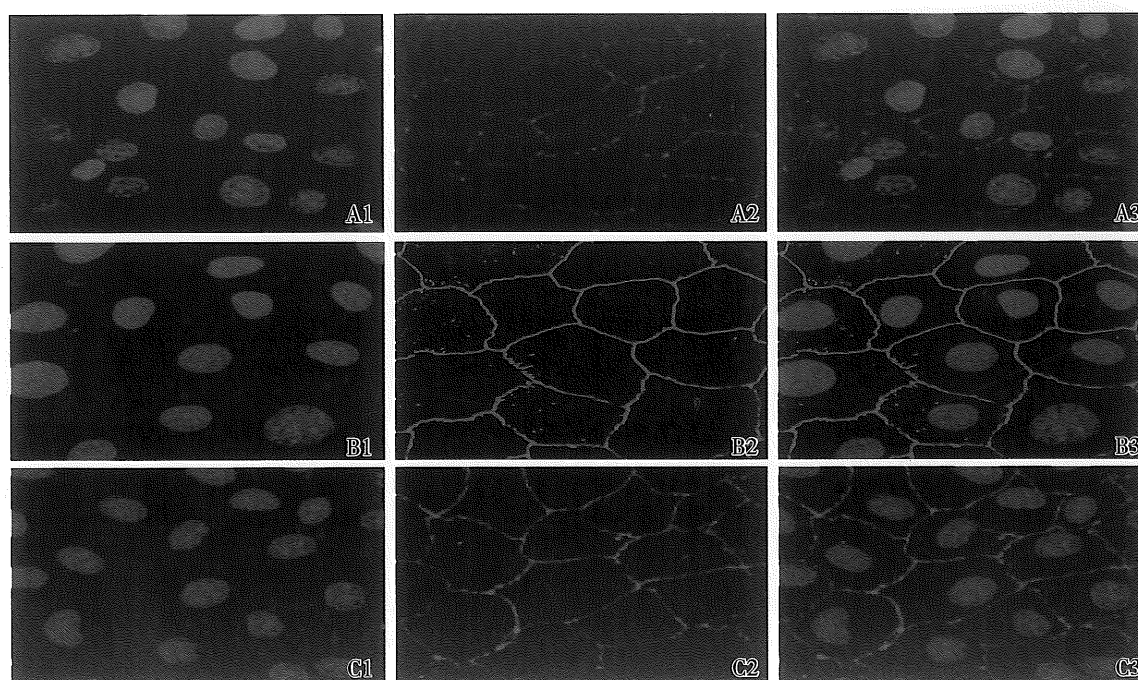


图 2 NRK 细胞胞膜蛋白 ZO-1 的表达 (免疫荧光染色, Confocal  $\times$  800)

Fig.2 Expression of membrane protein ZO-1 in NRK cells

A: acetone fixed; B: methanol fixed; C: 4 g/L PFA fixed; Immunofluorescence staining, Confocal  $\times$  800

In each set of panels, the left panels (A1, B1, C1) show nuclear staining (DAPI, blue), the middle panels (A2, B2, C2) show ZO-1 antibody staining (red), and the right panels (A3, B3, C3) are merged images of the left and middle images.

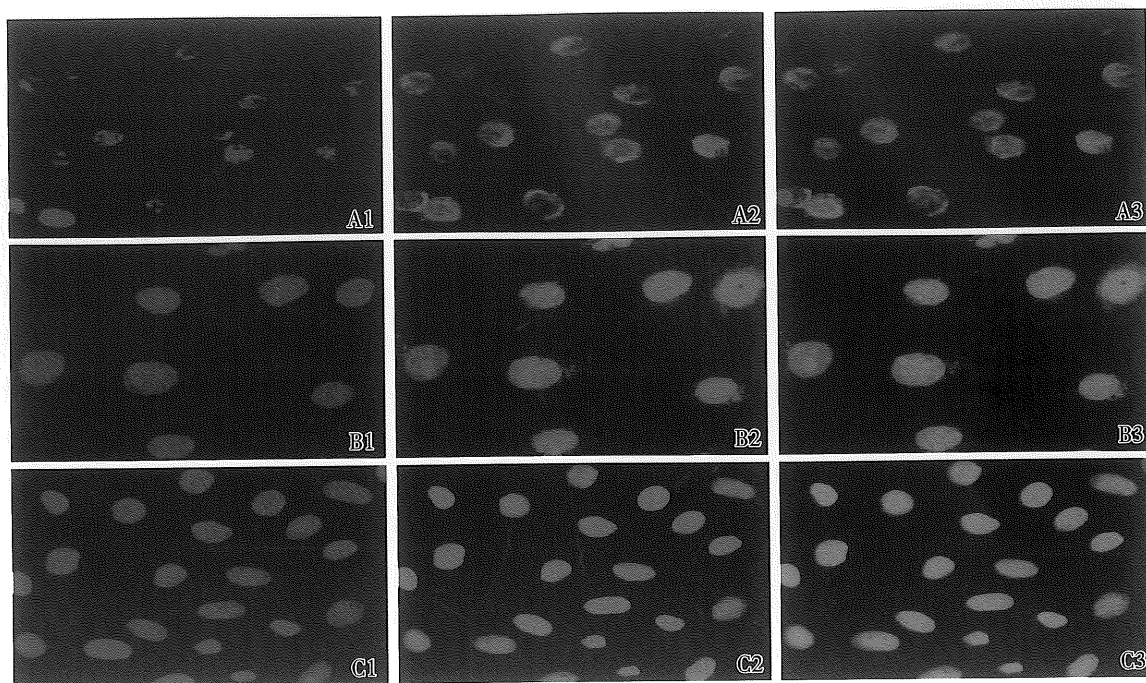


图 3 NRK 细胞经 TGF- $\beta$  刺激后胞核蛋白 p-Smad3 的表达

Fig.3 Expression of nucleoprotein p-Smad3 in NRK cells after TGF-B stimulation.

A: acetone fixed; B: methanol fixed; C: 4 g/L PFA fixed; Immunofluorescence staining, Confocal  $\times 800$

In each set of panels, the left panels (A1, B1, C1) show nuclear staining (DAPI, blue), the middle panels (A2, B2, C2) show p-Smad3 antibody staining (red), and the right panels (A3, B3, C3) are merged images of the left and middle images.

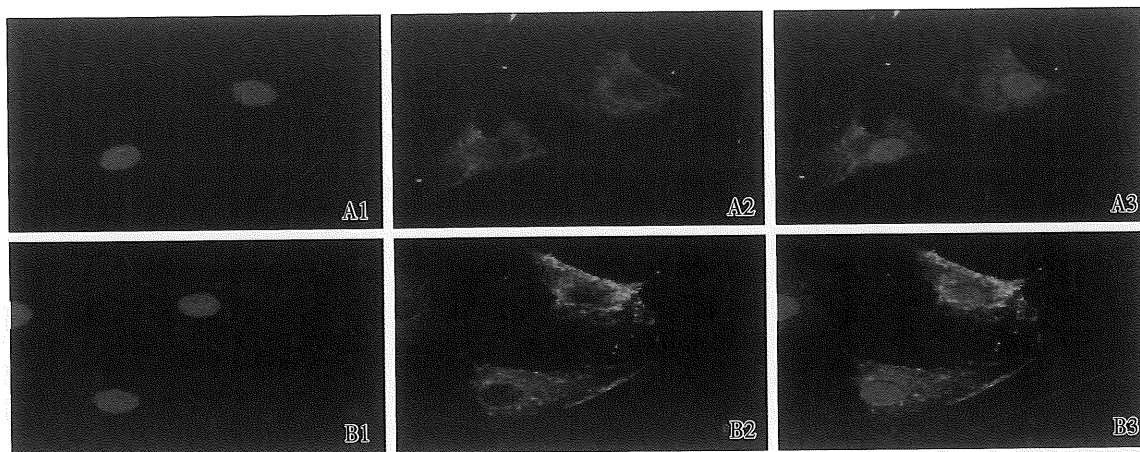


图 4 原代滑膜成纤维样细胞经 TNF- $\alpha$  刺激后骨架相关蛋白 P-ERM 的表达

Fig.4 Expression of skeleton associated P-ERM protein in primary synovial fiber-like cells after TNF- $\alpha$  stimulation

A: fixed with 4 g/L PFA Permeabilizing by 0.25% TritonX-100; B: fixed with 4 g/L PFA Permeabilizing by ice cooled methanol; Immunofluorescence staining,  $\times 800$

In each set of panels, the left panels (A1, B1) show nuclear staining (DAPI, blue), the middle panels (A2, B2) show P-ERM antibody staining (green), and the right panels (A3, B3) are merged images of the left and middle images.

缘(接近细胞膜的地方)分布,它们不但将长排的肌动蛋白连接在一起,而且还与整合素蛋白相结合<sup>[6]</sup>。同时运用两种固定剂时(图 4),多聚甲醛温和的固定作用维护了细胞形态的完整性,有机溶剂类的甲醇瞬时引起蛋白的变性,从而更真实地

反应出骨架蛋白在细胞的分布。

因此,固定剂对细胞免疫荧光的图像效果影响很大。目前尚无一种标准固定剂可用于各种抗原的固定。选择最佳固定剂标准首先是最好地保

(下转第 619 页 to page 619)