

## 对细胞膜质蛋白共定位染色方法的改良

狄安洁<sup>1</sup>, 吴庆瑜<sup>1</sup>, 谭凯<sup>2</sup>, 徐双悦<sup>1</sup>, 兰天舒<sup>3</sup>, 王逸难<sup>1</sup>, 庄国洪<sup>1\*</sup>, 闫国良<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学医学院 福建 厦门 361000; 2. 南昌大学抚州医学院 江西 抚州 344000; 3. 厦门医学院 福建 厦门 361000)

**摘要:** [目的]将流式细胞术染色方法进行改良用于 T 细胞膜质蛋白共定位的共聚焦显微镜检测,在共定位表达于细胞膜上的 CD4 和细胞质内表达的 TIPE2 蛋白较常规镜检免疫荧光染色法可提高实验效率。[方法]取小鼠脾脏 T 细胞,用流式细胞术的染色方法代替实验室常规免疫染色法,对细胞膜上的 CD4 与细胞质内的 TIPE2 蛋白进行染色,制片并在激光共聚焦显微镜下观察。[结果]小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞上出现了 TIPE2 蛋白的共表达,符合实验预期,同时实验效率从原有 10% 提高到 90%。[结论]采用该染色方法后突破了常规免疫荧光染色必须要在载玻片上进行的局限,简化了操作,保证了实验的有效性,提高实验效率。

**关键词:** 方法改良; 蛋白共定位; 免疫荧光; 激光共聚焦

中图分类号: Q331 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.04.0062

## An improved method for co-localization immunofluorescence staining of plasma proteins in T cell membrane

DI An-jie<sup>1</sup>, WU Qing-yu<sup>1</sup>, TAN Kai<sup>2</sup>, XU Shuang-yue<sup>1</sup>, LAN Tian-shu<sup>3</sup>, WANG Yi-nan<sup>1</sup>, ZHUANG Guo-hong<sup>1\*</sup>, YAN Guo-liang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361000, China; 2. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000, China; 3. Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China)

**Abstract** [Objective] The flow cytometry staining method was improved for the confocal microscopy detection of cytomembrane-cytoplasmic protein co-location for a special T cell, which had TIPE2 protein expressed in cytoplasm of CD4<sup>+</sup>T cells. This method had more efficient than the conventional immunofluorescence staining method. [Method] Take the mouse spleen T cells, replace the normal immunostaining method in the laboratory according to the staining method of flow cytometry, dye the CD4 on the cell membrane and the TIPE2 protein in the cytoplasm, observe under the laser confocal microscope. [Result] The results showed that TIPE2 protein co-expression appeared within mouse spleen CD4<sup>+</sup>T cells, which was consistent with previous reports. The experimental efficiency was updated from 10% to 90%. [Conclusion] This promoted staining method breaks through the limitations of the conventional immunofluorescence staining on the slides with suitable operation, the result showed the effectiveness of the experiment.

**Keywords:** improved method; protein colocalization; immunofluorescence; laser confocal

免疫荧光技术是 20 世纪中期发展起来的一种可以对细胞蛋白进行定性、定位以及定量分析的生物学检测技术<sup>[1]</sup>。它的原理是将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物,再用这种带着荧光的抗体(或抗原)作为分子探针检测细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。荧光素受激发光激发可发出不同波长的荧光,分析不同荧光的强度从而达到检测目的。免疫荧光技术具有特异性强、敏感度高、

速度快的优势,同时也存在非特异性染色、结果判定仍有主观掺杂、技术程序比较复杂的缺点<sup>[2-3]</sup>。

其中,制作细胞标本后的染色步骤是制约这项技术发展的一个重要瓶颈。目前国际通用的对于细胞样品进行免疫染色的方案大多是通过固定剂固定-洗涤剂漂洗-血清/BSA 封闭-一抗孵育-荧光二抗染色-DAPI 染色-封片-荧光显微镜观察这样的步骤进行的<sup>[3-6]</sup>。尤其是对于细胞上蛋白共定

收稿日期: 2019-05-21

基金项目: 厦门大学本科生创新创业训练计划项目(2018X0584); 机能与临床转化福建省高校重点实验室开放基金资助项目(JNYLC1813)

作者简介: 狄安洁(1996-),女,山西太原人,本科生, E-mail: DAJ961212@126.com。

\* 通讯作者: 闫国良(1976-),河北定州人,理学博士,高级实验师,研究方向: 移植免疫,参与编写教材 2 部,发表文章 12 篇, Tel: 0592-2187157, E-mail: guoliangyan@xmu.edu.cn。

庄国洪, Tel: 0592-2187157, E-mail: zhgh@xmu.edu.cn。

位的染色方法具有高度的一致性<sup>[7-11]</sup>。

依照文献介绍这样的染色方法也适用于活细胞<sup>[12]</sup>。然而通过深度比较,笔者认为该染色方案对活细胞存在毒性和破坏性,固定剂和洗涤剂的使用会对实验结果产生干扰,造成假阳性或假阴性,实验效率低下,需要反复多次摸索适宜抗体浓度条件,且对照不易控制,国内相关的实验论坛上也已经就此进行过讨论,对时间成本是极大的浪费。本实验创新性采取了一种新的改良自流式细胞术的染色方法,对细胞膜蛋白质进行免疫荧光染色,在共聚焦检测后发现结果良好、成功率高且可重复等优势。故撰文介绍该改良方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

SPF级C57BL/6小鼠,6~8W,体质量 $20 \pm 2$ g,购于厦门大学实验动物中心。标准动物饲料喂养,室温 $25 \pm 2$ ℃,湿度50%~60%。

#### 1.1.2 试剂

抗体FITC-anti-CD4购自美国Biolegend公司(No.203305)0.5mg/mL;anti-TIPE2(肿瘤坏死因子- $\alpha$ -诱导蛋白8-2)购自美国Thermo公司(No.PA5~38711)1mg/mL;驴抗兔二抗购自美国Biolegend公司(No.406421)0.2mg/mL。

#### 1.1.3 仪器

共聚焦激光扫描显微镜,型号:FV1000,Olympus。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 脾脏细胞制备方法

小鼠脱颈处死后,切开腹部取出脾脏,并与少量PBS放于15mL离心管中充分研磨,加入5mL PBS充分混匀,静置1min;待悬液分层后取上层细胞悬液至一新的15mL离心管中800r/min,离心5min,取沉淀加入红细胞裂解液2~3mL,裂解红细胞3~5min;再加入8mL PBS吹打混匀,1200r/min离心5min;离心后弃去上清液,在沉淀中加PBS1mL吹打混匀后计数备用。

#### 1.2.2 膜蛋白共定位免疫荧光染色

用含有0.5%小牛血清的PBS调节细胞悬液至细胞数为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL;取100 $\mu$ L放置于1.5mL的EP管中1100r/min,离心3min并去掉上清;

取Permeabilization buffer和Fixation按3:1的体积比混匀后,按100 $\mu$ L/管加入上述EP管中4℃避光孵育20min;不用洗涤,直接加入TIPE2一抗(0.5 $\mu$ L/100 $\mu$ L)4℃避光孵育20min;随后体积内同时加入PE标记的驴抗兔二抗(1:500)和FITC-anti-CD4(0.5 $\mu$ L/100 $\mu$ L)4℃避光孵育40min;用FACS buffer(200 $\mu$ L/管)1100r/min,洗涤离心3min,重复1次;体系中加入DAPI(1:3000)100 $\mu$ L,4℃下孵育5min;立即取10 $\mu$ L滴在载玻片上,盖上盖玻片进行观察;也可放置4℃冰箱保存6~8h,以防止荧光淬灭。

## 2 结果与分析

### 2.1 显微镜观察结果

显微镜下(400 $\times$ )观察结果显示,使用传统免疫荧光染色法染色细胞数量为2~5个/视野,改良后的染色细胞数量为30~40个/视野。

对小鼠脾脏细胞进行了CD4、TIPE2蛋白染色,和DAPI染色,在共聚焦显微镜下可观察到CD4和TIPE2蛋白双信号,同时,通过合并图片后两个信号重合度高且明显。进行了3次重复实验,得出结果一致,见图1。

### 2.2 染色方法的比较分析

改良后的染色方法不需要对细胞进行前固定,可重复性好。此外,从组织中提取的T细胞无法长时间贴壁培养,而笔者的染色方法都是在1.5mL EP管中进行,不需要对细胞进行贴壁固定,将原本需要准备3.5d的实验缩短到30min,同时该方法可以完全避免因实验操作步骤繁琐而造成的细胞脱落,减少了实验失败的次数,从而有效提高实验效率。

最后,实验室常规免疫荧光染色操作中,对于荧光抗体的使用比例大都参考Western Blotting的抗体使用参数,而该参数的使用需实验者反复摸索从而确定合适的抗体浓度。在本实验改良后的染色方法中,借鉴了同样在EP管里进行染色的流式细胞染色方法及抗体使用参数,不需反复摸索抗体的使用浓度而可以直接使用抗体参数,从而保证了染色的高成功率和可重复性。

方法改良之后,实验时间缩短到原来的1/54,实验效率大幅提高。改良前后方法的具体对比如表1所示。

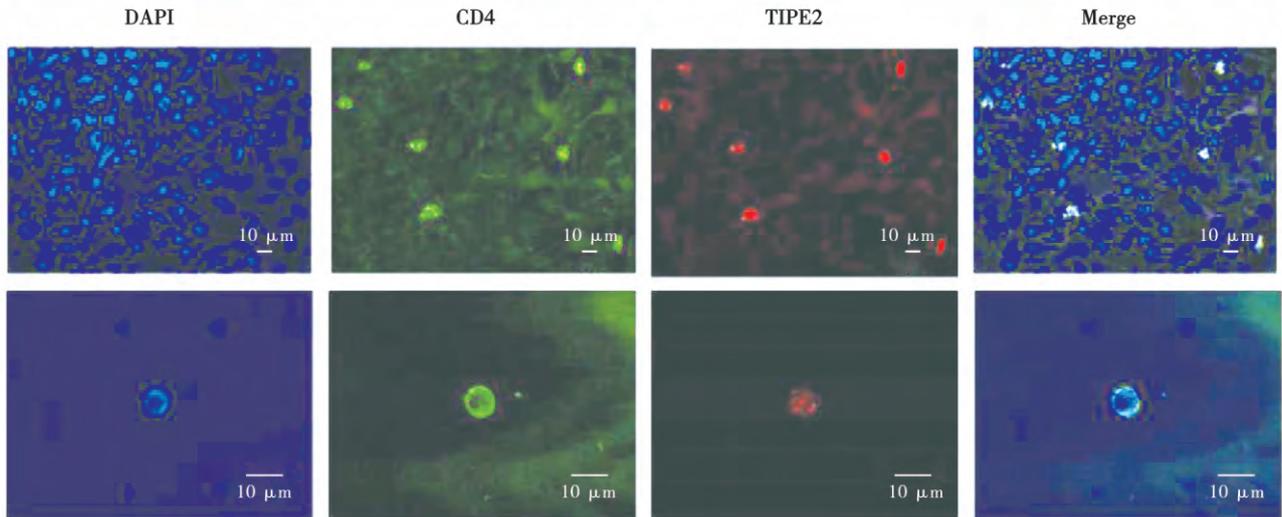


图1 小鼠脾脏细胞 CD4 与 TIPE2 蛋白共定位免疫荧光染色

注解: DAPI(上)低倍镜下,细胞核 DAPI 染色; DAPI(下)高倍镜下,细胞核 DAPI 染色; CD4(上)低倍镜下,CD4 蛋白荧光染色; CD4(下)高倍镜下,CD4 蛋白荧光染色; TIPE2(上)低倍镜下, TIPE2 蛋白荧光染色; TIPE2(下)高倍镜下, TIPE2 蛋白荧光染色; Merge(上)低倍镜下,三种染色图片合并; Merge(下)高倍镜下,三种染色图片合并。

Fig. 1 Mice spleen cells CD4 and TIPE2 protein co-located immunofluorescence staining

Note: DAPI( up) At low magnification ,nuclear DAPI staining; DAPI( down) At high magnification ,nuclear DAPI staining; CD4( up) At low magnification ,CD4 protein fluorescence staining; CD4( down) At high magnification ,CD4 protein fluorescence staining; TIPE2( up) At low magnification , fluorescence staining of TIPE2 protein; TIPE2( down) At high magnification ,fluorescence staining of TIPE2 protein; Merge( up) At low magnification ,combination of three stained pictures; Merge( down) At high magnification ,combination of three stained pictures.

表1 两种免疫荧光染色方法的比较

Tab. 1 Comparison of two immunofluorescence staining methods

步骤	经典免疫荧光染色法	流式细胞术免疫荧光染色
细胞制备	细胞贴壁生长 3 d	含 0.5% 小牛血清的 PBS 制成细胞悬液, 1 100 r/min 离心 3 min
固定剂固定	4% 多聚甲醛 浸泡 15 min	Permeabilization buffer: Fixation = 1:3 4 °C 避光孵育 20 min
洗涤剂漂洗	PBS 洗涤 2 次 5 min/次 0.2% Triton X-100 冲洗 5 min	—
血清/BSA 封闭	5% 脱脂牛奶 阻断 30 min	—
一抗孵育	4 °C 过夜(12 h)	4 °C 避光孵育 20 min
荧光二抗染色	37 °C 避光孵育 1 h	4 °C 避光孵育 20 min
(离心洗涤)	—	FACS buffer 1 100 r/min 洗涤 2 次 3 min/次
DAPI 染色	4 °C 孵育 5 min	4 °C 孵育 5 min
封片	✓	✓
荧光显微镜观察	✓	✓
时长总计	4.5 d	<2 h

### 3 讨论

目前已有文献报道 TIPE2 可以促进 Fas 介导的 T 细胞凋亡, TIPE2 敲除或者缺失的 CD4<sup>+</sup> T 细胞凋亡明显减少<sup>[13]</sup>。为了得到 CD4<sup>+</sup> T 细胞内同时有 TIPE2 的共表达这一结果, 庄国洪等<sup>[14]</sup>在另一篇文

章中通过 real-time PCR 的检测推测心脏移植植物中的 TIPE2 可能主要来自 T 细胞, 并通过此方法证实了 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 TIPE2 的关系, 从而佐证了实验设想, 得出推论。

实验室常规用流式细胞术对 T 细胞进行定量的检测, 然而若是要对 T 细胞细胞膜和细胞质中的蛋

白质进行共定位,以确定两者之间的功能相关性,那就只能通过免疫染色的方法来进行。而就目前技术发展而言,免疫荧光染色技术所能达到的效果较之常规免疫染色和 HE 更精确,是绝大多数实验室都会采用的实验手段,在染色方法上也基本大同小异<sup>[7-9,11,15-18]</sup>。

实验室常规用于 T 细胞膜质蛋白共定位的方法第一步都是要使用固定剂对细胞进行处理,亦有学者专门对不同固定剂渗透方法对活细胞观察效果的影响加以研究<sup>[19]</sup>。但这样的固定剂通常会破坏细胞膜结构,如果仅仅针对细胞膜上的两种蛋白共定位或仍然可行,但对于分别处在细胞膜和细胞质中的不同蛋白进行共定位则难度较大,且破膜后很难排除假阳性,导致实验数据无法取舍,达到准确判断的目的。笔者用传统免疫荧光染色方法进行了反复的实验,实验步骤如表 1 中所示,但实验结果不理想:原免疫荧光染色法用时近 1 周,单视野中细胞计数只有 1%~3% 的染色效率。因此,笔者探索用流式细胞染色的方法改良染色,对小鼠脾脏细胞进行两种蛋白的共定位,激光共聚焦显微镜观察,而改良后的染色方法效率提高了近 54 倍,并最终得到了如图 1 所示的理想结果。

经过对相关文献的汇总查阅,笔者发现流式细胞技术通常作为染色后的检测手段多有报道,如郭继强等<sup>[20]</sup>利用不同的染色方法相互佐证鉴定同一细胞类型,张志霞等<sup>[21]</sup>通过实验验证新型化学染料。而仅在 2012 年刘良忠等<sup>[22]</sup>报道过一种简化染色法,但该文献报道的流式细胞染色技术仅能定性细胞类型或检测已知 marker 的细胞分型/筛选,没有提供细胞共定位的实验结果。本文创造性的把改良后的流式细胞染色技术运用于细胞膜质蛋白共定位荧光染色中,通过共聚焦显微镜的观察可以对细胞膜质蛋白 marker 进行共定位,简化方法,提高效率,结果准确。

#### 4 结论

通过系统改良后对 T 细胞进行免疫荧光染色,将实验时间缩短到原来的 1/54,实验效率提高了 54 倍。

改良后的染色方法突破了常规免疫荧光染色必须要在载玻片上进行的局限性,简化了操作,提高实验效率,结果更可靠,并减少了对样品和试剂的各种无效浪费。

致谢:衷心感谢厦门大学中心实验室黄静茹老师在细胞流式和激光共聚焦显微镜方面提供技术帮助!

#### 参考文献

- [1] Meyerkord C L, Fu H. Protein-Protein Interactions [M]. Methods in Molecular Biology, 2015.
- [2] 俞松山,叶惠英,韩珊珊. 免疫荧光技术与荧光探针 PCR 技术用于检测小儿呼吸道合胞病毒的对比分析 [J]. 实用预防医学, 2016, 23(06): 750-752.
- [3] 丁如. 临床检验中免疫荧光技术的应用 [J]. 实用医技杂志, 2013, 20(12): 1325-1326.
- [4] Manos P, Edmond J. Immunofluorescent analysis of creatine kinase in cultured astrocytes by conventional and confocal microscopy: a nuclear localization [J]. J Comp Neurol, 1992, 326(2): 273-282.
- [5] Yuan X, Hu T, He H, et al. Respiratory syncytial virus prolifically infects N2a neuronal cells, leading to TLR4 and nucleolin protein modulations and RSV F protein co-localization with TLR4 and nucleolin [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 13.
- [6] Ugboke CI, Hirst WD, Rattray M. Neuronal influences are necessary to produce mitochondrial co-localization with glutamate transporters in astrocytes [J]. J Neurochem, 2014, 130(5): 668-677.
- [7] Pljesa-ercegovac M, Savic-Radojevic A, Kravic-Stevovic T, et al. Co-localization of GSTP1 and JNK in transitional cell carcinoma of urinary bladder [J]. Genet Mol Biol, 2010, 33(3): 460-462.
- [8] Lee WK, Choi JK, Cha SH. Co-localization and interaction of human organic anion transporter 4 with caveolin-1 in primary cultured human placental trophoblasts [J]. Exp Mol Med, 2008, 40(5): 505-513.
- [9] Kolek O, Gajkowska B, Godlewski MM, et al. Co-localization of apoptosis-regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF-beta1 [J]. Eur J Cell Biol, 2003, 82(6): 303-312.
- [10] Van de Walle GR, Favoreel HW, Nauwynck HJ, et al. Antibody-induced internalization of viral glycoproteins in pseudorabies virus-infected monocytes and role of the cytoskeleton: a confocal study [J]. Vet Microbiol, 2002, 86(1-2): 51-57.
- [11] Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, et al. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils [J]. Biochem J, 1997, 327 ( Pt 3): 917-923.
- [12] 黎燕,冯建男,张纪岩. 分子免疫学实验指南(生物实验室系列) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [13] 李志,焦治兴,齐忠权. 免疫负调控分子 TIPE2 的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(13): 1924-1928.

(下转第 342 页)

在致病力方面的作用已经通过动物实验得到了证实<sup>[11-13]</sup>。

前噬菌体基因并不只是细菌基因组一种被动的遗传物质,也是细菌生命活动中相当活跃的参与者<sup>[14]</sup>。作为细菌间基因水平转移的重要载体,前噬菌体的存在不仅赋予细菌基因组生物多样性,也影响着宿主菌的生命活动<sup>[15]</sup>。因此,要充分了解与人类关系极为密切的细菌群体,就不能忽视细菌染色体中前噬菌体基因的研究。

本文采用基因工程方法成功构建了重组载体 pET-32a(+)-PT1028ORF001,表达了相对分子质量为 82.4 kDa 的重组 PT1028ORF001 蛋白,为进一步研究该前噬菌体基因的功能打下一定基础。

#### 参考文献

- [1] 黎庶,胡福泉.前噬菌体[J].微生物学通报,2009,36(3):432-438.
- [2] Jankauskaitė L,Misevičienė V,Vaidelienė L,et al. Lower airway virology in health and disease – from invaders to symbionts[J]. Medicina (Kaunas) 2018,54(5):1-15.
- [3] Lorenz N,Reiger M,Toro-Nahuelpan M,et al. Identification and initial characterization of prophages in vibrio campbellii[J]. PLOS ONE 2016,11(5):e0156010.
- [4] Mee-Marquet N,Diene SM,Barbera L,et al. Analysis of the prophages carried by human infecting isolates provides new insight into the evolution of Group B *Streptococcus* species[J]. Clin Microbiol Infect 2018,24(5):514-521.
- [5] Zeng G,Chen X,Zhang X,et al. Genome-wide identification of pathogenicity,conidiation and colony sectorization genes in *Metarhizium robertsii*[J]. Environ Microbiol 2017,19(10):3896-3908.
- [6] Dos Santos DF,Istvan P,Quirino BF,et al. Functional metagenom-ics as a tool for identification of new antibiotic resistance genes from natural environments[J]. Microb Ecol 2017,73(2):479-491.
- [7] Fortier LC,Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens[J]. Virulence,2013,4(5):354-365.
- [8] Argov T,Azulay G,Pasechnek A,et al. Temperate bacteriophages as regulators of host behavior[J]. Curr Opin Microbiol,2017,38:81-87.
- [9] Olszak T,Latka A,Roszniewski B,et al. Phage life cycles behind bacterial biodiversity[J]. Curr Med Chem,2017,24(36):3987-4001.
- [10] Salmond GP,Fineran PC. A century of the phage: past,present and future[J]. Nat Rev Microbiol 2015,13(12):777-786.
- [11] Pham TD,Nguyen TH,Iwashita H,et al. Comparative analyses of CTX prophage region of *Vibrio cholerae* seventh pandemic wave 1 strains isolated in Asia[J]. Microbiol Immunol,2018,62(10):635-650.
- [12] Trost E,Blom J,Soares Sde C,et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis and pneumonia[J]. J Bacteriol,2012,194(12):3199-3215.
- [13] Karmali MA. Factors in the emergence of serious human infections associated with highly pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. Int J Med Microbiol,2018,308(8):1067-1072.
- [14] Hershko-Shalev T,Odenheimer-Bergman A,Elgrably-Weiss M,et al. Gifsy-1 prophage IsrK with dual function as small and messenger RNA modulates vital bacterial machineries[J]. PLoS Genet 2016,12(4):e1005975.
- [15] Benkovic SJ,Spiering MM. Understanding DNA replication by the bacteriophage T4 replisome[J]. J Biol Chem,2017,292(45):18434-18442.
- [14] 赵越,徐双悦,韩蔚民,等. TIPE2 在 T 细胞介导的心脏移植急性排斥反应中的潜在作用[J]. 实用器官移植电子杂志,2018,6(02):98-102.
- [15] 康赐明,陈远志,王一文,等. 稳定表达可视化 hFeRn 的 MDCK 细胞株构建[J]. 生物技术,2017,27(02):123-128.
- [16] 梁盈. 维甲酸诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化过程中核基质蛋白的变化研究[D]. 厦门:厦门大学,2008.
- [17] 马雪霞,汪兆艳,王倩,等. 不同厚度神经球冰冻切片免疫荧光细胞化学染色结果的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2018,34(06):495-498.
- [18] 吴志伟,林居强,黄义梅,等. 鼻咽癌增殖与转移机制荧光检测的研究进展[J]. 光电子激光,2018,29(08):917-924.
- [19] 冯婧文,杨少斌,王兆松,等. 不同固定剂及渗透方法对免疫荧光技术中 EGFR 内吞转运观察效果的影响[J]. 天津医科大学学报,2015,21(03):264-267.
- [20] 郭继强,韩亚萍,李芳,等. 流式细胞术三种染色方法检测体外纯化扩增的 NK 细胞的细胞毒作用比较[J]. 中国实验血液学杂志,2016,24(06):1691-1697.
- [21] 张志霞,高莉,刘倩倩,等. 适用于流式细胞术的三角褐指藻核 DNA 染色方法[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(06):1270-1274.
- [22] 刘良忠,胡建娥,常世川,等. 简化法与传统方法进行淋巴细胞胞内细胞因子染色效果的比较[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(05):633-637.

#### (上接第 370 页)