

一种改良的肌细胞骨架染色方法

程云会, 韩梅*, 温进坤, 张永钢, 刘智敏

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要: 为了观察肌细胞骨架, 对传统考马斯亮蓝染色法进行改良, 并与免疫荧光染色法进行了比较。培养的血管平滑肌细胞先用多聚甲醛预固定后再进行考马斯亮蓝染色, 可使细胞骨架非常清晰的显色, 解决了传统考马斯亮蓝染色易使肌细胞变形、脱片的问题, 其效果与免疫荧光染色相近。因此, 多聚甲醛预固定-考马斯亮蓝染色法是一种适于肌细胞骨架染色的简便方法。

关键词: 细胞骨架; 考马斯亮蓝染色; 平滑肌细胞

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02

细胞骨架(cytoskeleton)指细胞质内由蛋白纤维交织而成的立体网格结构, 包括微丝、微管和中间纤维三种形式^[1]。近年的研究证实, 细胞骨架的生物学意义已远远超出了最初作为细胞形态结构基础的“骨架”概念, 几乎参与细胞所有重要的生命活动, 如细胞增殖和分化、信号转导及细胞运动等。细胞染色是观察细胞骨架形态的重要手段, 常用的细胞骨架染色方法有多种^[2-4], 其中考马斯亮蓝染色法因具有简便、易行等特点而应用最广^[5]。但该方法用于肌细胞染色时, 因 Triton X-100 可刺激细胞强烈收缩而使骨架形态发生变化, 不仅影响了结果的判定, 而且常造成细胞变形、脱片。我室尝试采用多聚甲醛预固定-考马斯亮蓝染色法, 对培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)进行染色, 取得了理想的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠, 4 周龄, 由河北省实验动物中心提供; 考马斯亮蓝 R₂₅₀、多聚甲醛、Triton X-100、抗平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin)单克隆抗体购于 Sigma 公司; FITC 标记的羊抗兔二抗由北京中山公司提供; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 试剂配制

1.2.1 0.2% 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 溶液: 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 0.2g, 甲醇 46.5ml, 冰醋酸 7.0ml, 蒸馏水 46.5ml。

1.2.2 2% 和 4% 多聚甲醛固定液, 用 0.1mol/L, pH7.3 磷酸盐缓冲液配制。

1.2.3 1% Triton X-100 抽提液, 用 PBS 配制。

1.3 染色方法

取 SD 大鼠胸腹主动脉分离、培养 VSMC, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。传代时将 VSMC 接种于盖玻片上, 待生长至 80% 汇合时, 取出用 PBS 洗 2 次, 每次 5min; 2% 多聚甲醛预固定 5s; PBS 清洗 1min; 1% Triton X-100 4℃处理 30min; 0.01mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5min; 4% 多聚甲醛室温固定 20min; 0.2% 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色 30min; 蒸馏水漂洗 3 次, 每次 5min; 自然晾干; 二甲苯透明; 加拿大树胶封片后于显微镜下观察。

2 结果与讨论

本文在传统的细胞骨架考马斯亮蓝染色法基础上, 增加 2% 多聚甲醛预固定步骤, 使 VSMC 在 Triton X-100 处理过程中保持形态不变。利用骨架蛋白不溶于 Triton X-100 的特性, 去除胞浆中的非骨架蛋白成分后, 再用非特异性蛋白染色剂考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色, 使细胞骨架非常清晰地显色。在高倍视野下, 可清楚地观察到 VSMC 内细胞骨架的蓝色束状结构, 走向与细胞长轴平行(图 1.A), 与免疫荧光标记观察到的结果类似(图 1.B)。传统的考马斯亮蓝染色法将爬片培养的细胞直接用 Triton X-100 处理, 后者可引起 VSMC 强烈收缩, 造成脱片,

收稿日期: 2003-07-29; 修回日期: 2003-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(30270499)和河北省自然科学基金(303454)资助课题

* 通讯作者, E-mail: WJK@hebm.edu.cn

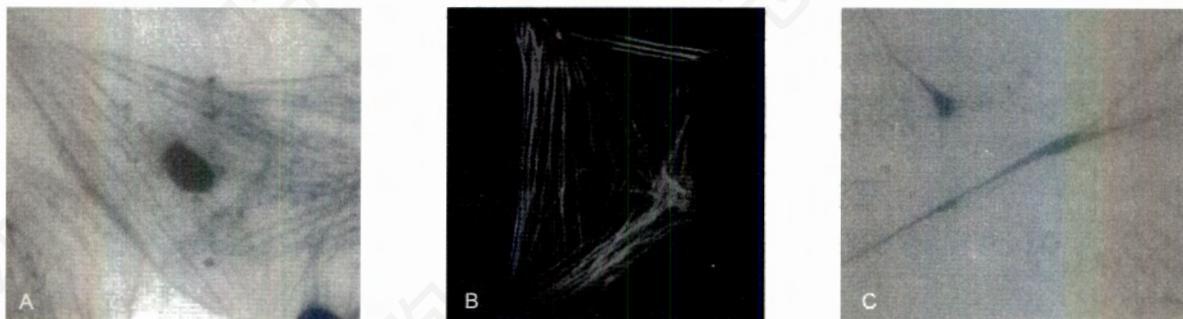


图1 不同方法观察血管平滑肌细胞骨架(A, 改良考马斯亮蓝法染色; B, 免疫荧光标记法染色; C, 传统的考马斯亮蓝染色)

残存的细胞多收缩呈束状, 细胞骨架无法观察(图1C)。因 α -actin是构成VSMC细胞骨架的主要结构蛋白, 故用抗SM α -actin抗体进行免疫荧光标记也是观察细胞骨架结构常用的方法, 但其成本较高, 且不能显示出骨架中的非 α -actin成份。本文采用多聚甲醛对细胞进行瞬间预固定, 可有效解决细胞变形、脱片的问题, 使细胞能够保持天然状态。恰当掌握多聚甲醛预固定的时间是获得理想结果的关键。若将2%多聚甲醛预固定时间延长至1min以上, 则因胞浆中非骨架蛋白变性而不能充分融出, 致使背景不清, 骨架结构难以辨认。该方法简便、快速, 不需昂贵的抗体和仪器, 仅用普通光镜即可观察, 其效果可与免疫荧光标记相媲美, 不失为一种观察细胞骨架的好方法。应用该方法时要注意: (1) 在玻片上培养的细胞以80%汇合度为宜; (2) 2%多聚甲醛固定时间以3~5s为宜; (3) 配制的考马斯亮蓝R₂₅₀染色液必须过滤后才能使用; (4) 染色后要

用蒸馏水充分洗涤, 自然晾干较好, 不宜采用常规酒精梯度脱水方法。

参 考 文 献

- [1] WEBER K L, BEMENT W M. F-actin serves as a template for cyokeratin organization in cell free extracts [J]. *J Cell Sci*, 2002, **115**(7): 1373 - 1382.
- [2] PENA S D. A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblasts with Coomassie blue R250 [J]. *Cell Biol Int Rep*, 1980, **4**(2): 149 - 153.
- [3] MANCINI R, PICCOLO E, MARRIGGIO S, *et al.* Reorganization of actin cytoskeleton by the phosphoinositide metabolite glycerophosphoinositol 4-phosphate [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, **14**(2): 503 - 515.
- [4] ZHANG J C, KIM S, HELMKE B P, *et al.* Analysis of SM22 α -deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(4): 1336 - 1344.
- [5] 马文丽. 细胞骨架的光镜制样法[M]. 章静波主编. *细胞生物学实用方法与技术*, 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995: 35 - 37.

A Modified Method for Cytoskeleton Staining of Muscle Cells

CHENG Yun Hui, HAN Mei*, WEN Jin Kun, ZHANG Yong Gang, LIU Zhi Min

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: In this study, we improved classical staining method for cytoskeleton with coomassie brilliant blue R250 and compared it with immunofluorescence. The cultured vascular smooth muscle cells were transiently prefixed with paraformaldehyde, then stained with coomassie brilliant blue as routine procedures. The cytoskeleton stained by the modified method was clear and kept its nature shape. The paraformaldehyde prefixed-coomassie brilliant blue staining is a convenient cytoskeleton staining method for muscle cells.

Key words: cytoskeleton; coomassie brilliant blue staining; smooth muscle cells

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (303454)

*Corresponding author, E-mail: WJK@hebm.edu.cn