

甲醇固定导致绿色荧光蛋白的荧光消失

李荣芳^{1,2} 袁 慧¹ 刘定干^{2*}

(¹ 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128; ² 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 发现用甲醇固定转染了绿色荧光蛋白(GFP)基因的细胞会导致 GFP 的荧光消失, 而当用聚甲醛固定时, GFP 的荧光就没有失去。因此建议避免用甲醇对有 GFP 表达的细胞进行免疫组化前的固定。

关键词 甲醇; 绿色荧光蛋白

绿色荧光蛋白(GFP)用作报告基因, 广泛用于基因转染和表达研究。

在细胞免疫组化实验中, 细胞固定是必不可少的步骤。固定的作用主要是最大限度地保存细胞的抗原性和防止抗原弥散。4% 多聚甲醛和 100% 甲醇是两种常规的广泛应用的固定剂。有文献报道说甲醇可以用于含 GFP 的细胞固定, 并显示 GFP 的荧光^[1]。

我们利用脂质体的一过性转染, 将带有增强的绿色荧光蛋白(EGFP)基因的质粒作为报告质粒, 把我们感兴趣的抑癌核酸元件导入人肝癌细胞株 SMMC-7721, 然后进行免疫化学反应, 试图观察该元件表达后对某些细胞骨架蛋白的分布影响。但是, 出乎意料的是, 在进行免疫化学反应前, 如果使用了 100% 甲醇作为固定剂, 则在反应完成后观察时, 完全观察不到 EGFP 的特征荧光, 而其他免疫染色的荧光仍然存在(图 1)。而当使用聚甲醛为固定剂时, EGFP 的

荧光就没有失去(图 2)。

接下来我们又具体观察了在免疫组化各步反应中, GFP 荧光强度的变化。由图 3 可见, 多聚甲醛固定的细胞, 在整个免疫组化过程中, 其 EGFP 的荧光强度几乎保持不变; 而与多聚甲醛固定不同, 甲醇固定的细胞其 EGFP 的荧光强度在固定和通透后与初始相比没有明显变化, 但在抗反应过后其荧光强度开始减弱, 最终在实验完成(图 1)后消失。这说明甲醇可能促进 GFP 荧光的淬灭。

鉴于此, 我们建议, 对于使用了脂质体为转染剂的、含 GFP 的细胞及其他类似细胞, 如需进一步做免疫化学染色, 最好不用甲醇来固定细胞, 以免 GFP 荧光的丢失。

参考文献(References)

- [1] Zhang G et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **227**: 707

Fluorescence of Green Fluorescent Protein was Disappeared in Cells Fixed with Methanol

Rong-Fang Li^{1,2}, Hui Yuan¹, Ding-Gan Liu²

(¹College of Animal Medical, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract It was found that the fluorescence of GFP in cells transfected with green fluorescent protein (GFP) gene disappeared when those cells were fixed with methanol, whereas those fixed with paraformaldehyde remained fluorescent brightly. Therefore it is suggested that methanol be avoided in fixing cells expressing GFP for immunohistochemistry.

Key words methanol; green fluorescent protein

收稿日期: 2006-07-13 接受日期: 2006-12-21

* 通讯作者: Tel: 021-54921135, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

Received: July 13, 2006 Accepted: December 21, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921135, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

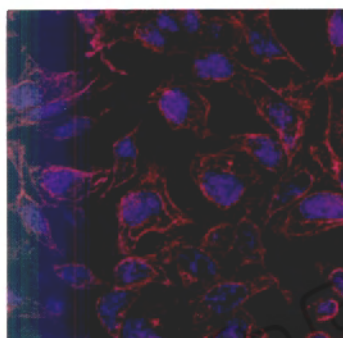


图1 使用100%甲醇作为固定剂的细胞免疫荧光染色结果(在confocal荧光显微镜下观察)

细胞核(蓝色)和细胞角蛋白18(红色)的荧光清晰可见,但GFP的荧光(绿色)不能观察到。

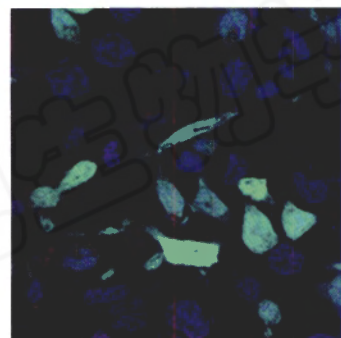


图2 使用聚甲醛为固定剂的细胞免疫荧光染色结果(在confocal荧光显微镜下观察)

细胞核(蓝色)和细胞角蛋白18(红色),可观察到GFP的明亮的绿色荧光。

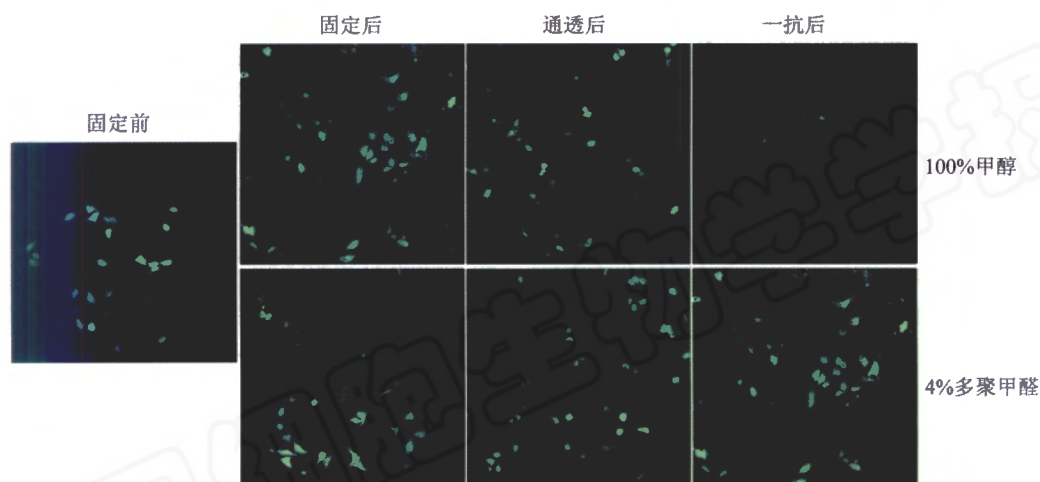


图3 在荧光显微镜下观察到的免疫组化过程中GFP荧光强度的变化

细胞生物学杂志

双月刊 1979年创刊

第29卷 第2期 2007年4月

Chinese Journal of Cell Biology

Bimonthly Established in 1979

Vol. 29 No. 2 April 2007

主 办 中国科学院上海生命科学研究
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会
协 办 南方医科大学珠江医院肿瘤中心
编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
岳阳路319号31B楼405室, 上海200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54922810
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: //www.cjcb.org
主 编 郭礼和
出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020
印 刷 上海图字印刷有限公司
发 行 上海市报刊发行局
订 阅 全国各地邮局
广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by Oncology Center, Zhujiang Hospital,
The Southern Medical University

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
Room 405, Building 31B, 319 Yue-Yang Road,
Shanghai 200031, China

Tel: 86-21-54920950 Fax: 86-21-54922810

E-mail: cjcb@sibs.ac.cn Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices

公开发行

国内统一刊号: CN 31-1478/Q

邮发代号: 4-296

定价: 30.00