

细胞骨架染色中不同固定方法的探讨

张 维 蹇爱荣 高 翔 胡丽芳 瓮媛媛 韩 晶 商 澎*

(西北工业大学生命科学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 探讨不同细胞固定方法对细胞骨架染色的影响, 以期发现适合于微丝与微管细胞骨架染色的固定方法。本文分别采用 0.5% 戊二醛、95% 乙醇、4% 甲醛及无水冷丙酮等四种固定液对人骨肉瘤细胞 MG-63 进行固定, 然后分别对微丝和微管进行染色、封片, 采用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞微丝及微管骨架的形态。同时采用图像分析方法对细胞骨架微丝、微管荧光图像进行定量分析。结果表明, 0.5% 戊二醛固定的细胞, 微丝呈清晰的束状纤维, 微管呈有规律的束状纤维; 95% 乙醇固定的细胞, 微丝纤维连贯性差, 微管纤维非常清晰; 4% 甲醛固定的细胞, 微丝纤维之间比较模糊, 微管纤维呈圆弧状, 联贯性较差; 无水冷丙酮固定的细胞, 微丝明显皱缩, 呈模糊状, 微管清晰可见, 连贯性较好。因此, 不同固定液固定的原理不同, 要根据实验目的, 选择合适的固定方法。

关键词 细胞骨架; 固定方法; 激光共聚焦显微术; 人骨肉瘤细胞

细胞骨架^[1]是指真核细胞中蛋白质纤维网架体系, 包括三种类型的蛋白质纤维, 即微丝、微管和中等纤维。细胞骨架不仅在维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性中起重要作用, 而且与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂、基因表达、细胞分化等生命活动密切相关。细胞固定^[2-4]是使细胞内的物质尽量保持原有形态、结构和位置的过程。常用的细胞固定液有戊二醛、多聚甲醛、乙醇、甲醛及丙酮等。不同固定液固定细胞的效果不同, 因此在研究中应根据实验样本及目的来选择合适的固定液。

本研究中采用四种不同的固定液对人骨肉瘤细胞 MG-63 进行固定, 观察细胞骨架染色后的荧光图像, 比较四种固定方法之间的差异, 以获得最佳的细胞骨架形貌图像。研究结果表明, 不同固定液固定细胞后的形貌区别较为明显。因此, 为把细胞中各种成分完整保存并且清晰显示出来, 应该了解各种固定液的性能及使用方法, 并有针对性地选择固定液以观察特定细胞的骨架形貌。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MEM培养基(Hyclone, 美国 Thermo Fisher 公司), 胎牛血清(Hyclone, 美国 Thermo Fisher 公司), 鼠抗人 Anti- α -tubulin (Calbiochem, 德国 Merck 公司),

rhodamine-Phalloidin (美国 Invitrogen 公司), 羊抗鼠 IgG-phodamine (upstate, 美国 Millipore 公司), 羊抗鼠 IgG-FITC (Calbiochem, 德国 Merck 公司), 抗荧光淬灭甘油(江苏碧云天生物技术研究所), 30 mm 培养皿 (Costar, 美国 Corning 公司)。HERA cell 150 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司), 激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司), Polymax 1040 振荡混匀器(德国 Heidolph 公司)。

1.2 固定方法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞 MG-63 购自中国科学院上海细胞库, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基在 100 ml 细胞培养瓶中, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件的细胞培养箱中进行培养。取对数生长期的 MG-63 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞, 用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液配成单个细胞悬液, 以每皿 1×10⁵ 个细胞接种于放有预处理盖玻片的 30 mm 培养皿中, 每皿体积 2 ml。将培养皿放入到上述条件的培养箱中培养 24 h。

1.2.2 激光共聚焦显微术 (1)细胞固定 取出细胞爬片, 光学显微镜下观察细胞形态, 用 1×PBS 轻轻

收稿日期: 2009-08-07 接受日期: 2010-01-06

国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2008AA12A218)和国家自然科学基金(No.30840030)资助项目

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, Fax: 029-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

洗涤后,分别采用0.5%的戊二醛、95%乙醇、4%甲醛及无水丙酮对细胞爬片进行固定^[3,4]。具体固定方法如下:1)0.5%戊二醛固定:将细胞爬片采用含0.5% Triton X-100的MTSB缓冲液浸润30 s,缓冲液中含BRB80(80 mmol/L PIPES pH 6.8, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 4 °C保存)和2 mmol/L EGTA,再用0.5%戊二醛室温固定10 min,最后浸入含0.1%硼氢化钠的PBS中室温淬灭7 min;2)95%乙醇固定:将细胞爬片用95%乙醇室温固定30 min;3)4%甲醛固定:将细胞爬片用含4%甲醛的CBS缓冲液(10 mmol/L MES pH 6.1, 138 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L EGTA, 0.32 mol/L 蔗糖, 4 °C保存)室温固定30 min;4)无水丙酮固定:将细胞爬片用无水冷丙酮(-20 °C)室温固定30 min。

(2)细胞骨架染色 1)微丝:MG-63细胞爬片经不同固定液固定后,用TBS洗涤3次,每次5 min;使用含0.5% Triton X-100的TBS浸润10 min;用含0.1% Triton X-100的TBS洗涤3次,每次5 min;用含3% BSA的PBS室温封闭10 min;加rhodamine-Phalloidin室温避光温育1 h,用含0.1% Triton X-100的TBS洗涤3次,每次5 min;最后用抗荧光淬灭甘油封片,激光共聚焦扫描显微镜进行扫描成像。2)微管:MG-63细胞爬片经不同固定液固定后,抗体温育前的操作步骤同微丝染色方法相同。用鼠抗人anti- α -tubulin将封闭后的细胞爬片室温温育1 h,再用含0.1% Triton X-100的TBS洗涤3次,每次5 min;使用羊抗鼠IgG-phodamine或羊抗鼠IgG-FITC室温避光温育1 h;含0.1% Triton X-100的TBS洗涤3次,每次5 min;最后用抗荧光淬灭甘油封片,激光共聚焦扫描显微镜进行扫描成像。

1.2.3 细胞骨架相对定量分析方法 细胞染色荧光图像用图像分析软件Image J对微丝骨架和微管骨架进行分形维数分析^[5,6],具体方法如下。从细胞骨架激光共聚焦显微图像中分割出每张图像的单细胞,并转换为灰度图像;用Image J软件将该灰度图像转为计算机可识别的二位图像;用Image J软件工具栏中计算分形的Fractal box counting进行分析,计算机自动以横坐标log(box size)及纵坐标log(count)值作图,该图斜率即为分型维数D。至少分析10个细胞分形维数,计算平均分型维数D,并进行统计学分析。

以GraphPad Prism 5.0数据统计软件进行统计学分析,分析得到的数据以均值 \pm 标准差表示, $P<0.05$

认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 不同固定液固定后对MG-63细胞微丝的形态观察

不同固定液固定细胞微丝后的细胞染色图像相比较,0.5%戊二醛固定的细胞,微丝呈现非常清晰的束状肌丝,在细胞质的外周形成完整的三维网络体系(图1A);95%乙醇固定的细胞,微丝变细且连贯性较差,纤维之间的区分不明显(图1B);4%甲醛固定的细胞,微丝纤维之间的区分较为模糊(图1C);而无水丙酮固定的细胞,细胞明显皱缩,微丝呈模糊状,几乎无法观察(图1D)。

2.2 Image J软件分析MG-63细胞骨架微丝维数结果

采用Image J软件对MG-63细胞微丝骨架图像进行分形维数分析,结果表明,MG-63细胞经无水丙酮($D=1.3182\pm 0.0466$)固定后染色分析,细胞微丝骨架分形维数明显较其它三种固定方法下降,差异具有显著性($P<0.05$);95%乙醇($D=1.6925\pm 0.0197$)固定细胞后染色分析,微丝骨架分形维数略高于0.5%戊二醛($D=1.5925\pm 0.0401$)与4%甲醛($D=1.5992\pm 0.0272$)固定的细胞,统计分析表明差异无显著性(图2)。

2.3 不同固定液固定后对MG-63细胞微管的形态观察

不同固定液固定细胞微管后的细胞染色图像相比较,0.5%戊二醛固定后微管呈有规律的束状纤维,围绕在细胞核周围,层次清晰,立体感较强(图3A);95%乙醇固定的细胞,微管的纤维非常清晰(图3B);4%甲醛固定后微管呈圆弧状,围绕在细胞核周围,但连贯性比较差(图3C);无水丙酮固定的细胞,微管清晰可见,连贯性较好(图3D)。

2.4 Image J软件分析MG-63细胞骨架微管维数结果

采用Image J软件对MG-63细胞微管骨架图像进行分形维数分析,结果表明:MG-63细胞经4%甲醛($D=1.4397\pm 0.0155$)固定后染色分析,细胞骨架分形维数明显下降,且差异有显著性($P<0.05$);无水丙酮($D=1.6902\pm 0.0106$)固定细胞后染色分析,骨架分形维数高于其他三组,且差异有显著性($P<0.05$);0.5%戊二醛($D=1.5544\pm 0.0151$)与95%乙醇($D=1.5460\pm 0.0232$)固定的细胞分形维数较接近,统计分析表明差异无显著性(图4)。

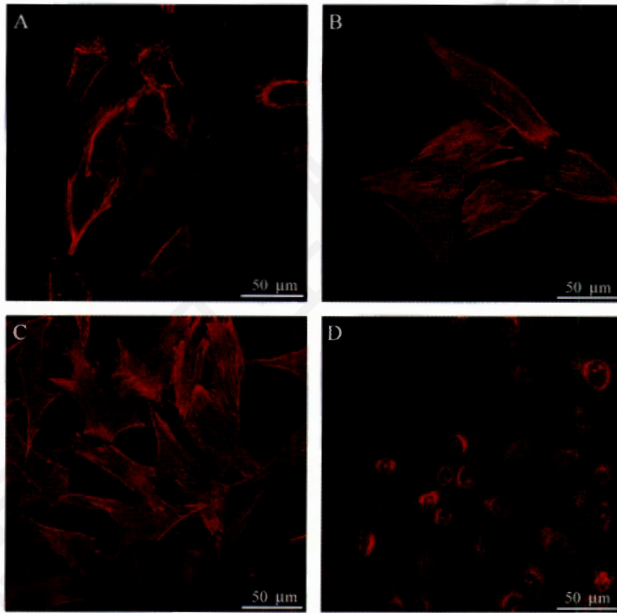


Fig.1 Stationary phase cells of different fixed fluorescent images of F-actin staining

A: 0.5% glutaraldehyde fixed F-actin of MG-63 cells; B: 95% ethanol fixed F-actin of MG-63 cells; C: 4% formaldehyde fixed microfilament F-actin of MG-63 cells; D: acetone fixed microfilament F-actin of MG-63 cells.

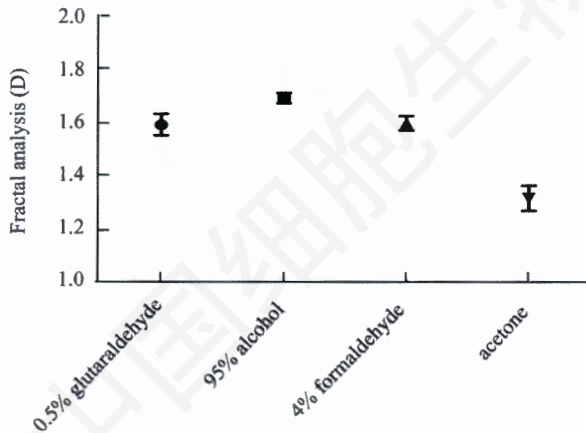


Fig.2 Image J software analysis D fractal dimension of MG-63 cell F-actin

3 讨论

激光共聚焦实验结果表明,对于细胞微丝骨架的染色,0.5%戊二醛固定液相对于其它三种固定液而言更适合。95%乙醇与4%甲醛固定效果略差,而无水冷丙酮(-20℃)则不适合于固定细胞微丝骨架。而对于细胞微管骨架的染色,0.5%戊二醛的固定效果最好,95%乙醇与无水冷丙酮(-20℃)次之,而4%甲醛则完全不适用于微管骨架的固定。其原因可能

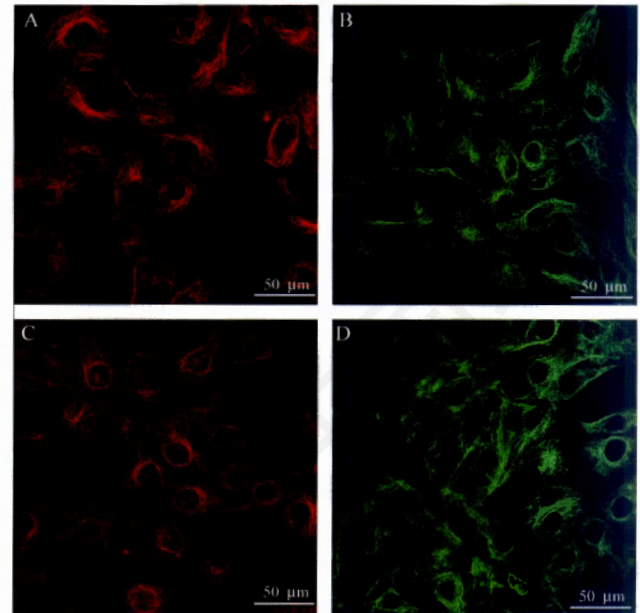


Fig.3 Stationary phase cells of different fixed fluorescent images of microtubule staining

A: 0.5% glutaraldehyde fixed microtubule of MG-63 cells; B: 95% ethanol fixed microtubule of MG-63 cell; C: 4% formaldehyde fixed microtubule of MG-63 cell; D: MG-63 cells using acetone fixed microtubule.

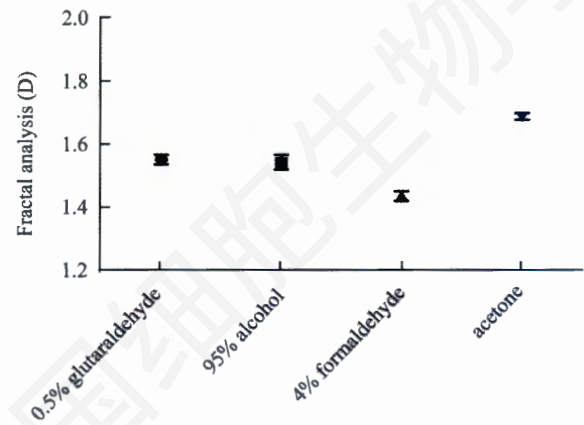


Fig.4 Image J software analysis D fractal dimension of MG-63 cell microtubule

是戊二醛对细胞的穿透力较强,能迅速均匀地渗入到细胞内部,稳定细胞内各种成分,对细胞产生收缩及膨胀作用,不产生人工假象及变形,因此能较好地固定细胞骨架。95%乙醇对低分子量蛋白质保存效果较差,使蛋白质变性的作用较轻,固定后可再溶解,对细胞的收缩性较大,固定细胞可沉淀白蛋白、球蛋白和核蛋白,对细胞核骨架的染色较差。甲醛固定均匀,穿透力强,固定细胞时可形成分子间的交联,影响

蛋白构型而使之固定,对细胞收缩性小、损伤少,可有效保存细胞固有物质;但甲醛的杂质含量较多,影响反应,而且甲醛中含有微量甲酸,导致固定液酸变、影响染色,同时可产生福尔马林色素,影响实验结果的观察。无水冷丙酮(-20℃)固定细胞在固定后对抗原性的保存好,但细胞有明显的皱缩、硬化作用^[7-11],常用于一般的免疫组化、免疫荧光及细胞凋亡检测。但是,在细胞骨架染色中如果用-20℃冷丙酮固定活细胞,可能导致在低温应激条件下细胞骨架发生重排。

细胞骨架分布有一定的规则性和方向性,复杂程度高。为了定量描述细胞骨架的变化,本研究中采用分形维数来分析不同固定液对细胞骨架图像的影响。分形维数反映了复杂形体占有空间的有效性,它是复杂形体不规则性的量度,现在已经成为定量分析图像变化的有力工具之一,已被应用于生物学研究中,如细胞骨架的图像分析,心肌细胞微管图像的灰度特征分析等^[12]。本研究中共聚焦显微术结果与图像分形维数结果基本一致。但是95%乙醇固定的细胞微丝骨架以及无水丙酮固定的细胞微管骨架形态与分形维数结果稍有差异,其原因可能与细胞的相互重叠有关。细胞骨架的分形维数主要是表述图像空间纹理不同灰度级间的相关特性,将细胞骨架视为具有近似的分形特征,在适当的尺度范围内用分形理论对其进行分析^[13]。因此,使用分形维数可辅助分析细胞形态变化,但图像中相互叠加的细胞会影响到该图像的不规则性,即影响到分形维数的数值,图像的不规则性越高,分形维数的数值就越大,所以图像的精细度与分形维数可能不完全一致。

本研究通过比较0.5%戊二醛、95%乙醇、4%甲醛及无水冷丙酮等四种固定液对人骨肉瘤细胞MG-63的微丝骨架和微管骨架的固定及染色效果,并结合染色图像分形维数的定量分析,基本上明确了在细胞微丝骨架和微管骨架染色过程中上述四种常用固定液的固定效果及其差异,为开展同类研究提供借鉴,

同时也可与细胞形态学观察相关的研究提供参考。

综上所述,不同固定液对细胞的化学成分、酶类及细胞结构固定效果不同。因此,选择合适的固定液是达到固定目的的基础。应该根据实验目的,筛选合适的固定液以获得最佳的荧光图像。

参考文献(References)

- 1 Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol* 1963; 17(1): 19-58.
- 2 McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1974; 22(12): 1077-83.
- 3 Thomason DB, Anderson O, Menon V. Fractal analysis of cytoskeleton rearrangement in cardiac muscle during head-down tilt. *J Appl Physiol* 1996; 81(4): 1522-27.
- 4 Lieleg O, Schmoller KM, Claessens MM, Bausch AR. Cytoskeletal polymer networks: viscoelastic properties are determined by the microscopic interaction potential of cross-links. *Biophys J* 2009; 96(11): 4725-32.
- 5 Chinga G, Dougherty R. Quantification of surface structures. *Proceedings, Image J User and Developer Conference, 1st Luxembourg* 2006; 117-22.
- 6 陈晓军, 何泽涌. 不同固定液、染色法显示结缔组织肥大细胞效果的比较. *解剖学杂志* 1990; 13(4): 287-91.
- 7 高美软, 黄雄飞. 不同固定液对冷冻切片HE染色影响的比较. *福建医科大学学报* 2001; 30(4): 367.
- 8 钱鑫萍, 杨雪飞. 细胞骨架的显微镜观察实验方法改进研究. *安徽农业科学* 2008; 36(22): 9410-12.
- 9 王义权, 周开业, 徐珞珊, 徐国钧. 不同固定剂保存动物组织标本对RAPD反应的影响. *动物学杂志* 1999; 34(1): 33-7.
- 10 Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* 2003; 116(22): 4615-28.
- 11 Palade GE. Study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med* 1952; 95(3): 285-98.
- 12 姚宇华, 严洪, 熊江辉. 基于分形特征的模拟失重条件下细胞骨架的图像分析. *中国图象图形学报* 2004; 9(2): 230-3.
- 13 姚宇华, 熊江辉, 梁仲刚, 严洪, 李莹辉. 心肌细胞微管图像的灰度特征分析. *航天医学与医学工程* 2004; 17(5): 322-5.

A Study of Different Fixatives in Cytoskeleton Staining

Wei Zhang, Ai-Rong Qian, Xiang Gao, Li-Fang Hu, Yuan-Yuan Weng, Jing Han, Peng Shang*

*(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics,
Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)*

Abstract The purpose of this study is to discuss the effects of different fixatives on cytoskeleton staining and to find out the suitable fixative methods of F-actin and microtubule staining. Four fixatives, 0.5% glutaraldehyde, 95% alcohol, 4% formaldehyde and acetone, were used to fix MG-63 cells respectively, and then F-actin and microtubule were stained, F-actin and microtubule images captured by confocal laser scanning microscopy were observed and quantitatively analyzed. The results showed that F-actin filaments and microtubules of the MG-63 cells fixed by 0.5% glutaraldehyde were bunched. The coherence of F-actin filaments of the MG-63 cells fixed by 95% alcohol was poor but microtubules were very distinct. F-actin filaments of the cells fixed by 4% formaldehyde were blurred, and microtubules were around the nucleus and became discontinuous. F-actin filaments of the cells fixed by acetone were dramatically disrupted but microtubules were very clear. The principle of the different fixative was different, so it is necessary to select the suitable fixative method according to the purpose of the experiment.

Key words cytoskeleton; fixative method; confocal laser scanning microscopy; human osteosarcoma cell line

Received: August 7, 2009 Accepted: January 6, 2010

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2008AA12A218) and the National Natural Science Foundation of China (No.30840030)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, Fax: 86-29-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn