

基于免疫荧光法对人工红细胞膜骨架蛋白 spectrin 的定位分析

王莹¹ 王翔^{1*} 李遥金² 刘峰¹ 肖科¹ 熊延连¹

(¹教育部生物流变科学与技术重点实验室, 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044;

²第三军医大学西南医院, 重庆 400038)

摘要 本文建立免疫荧光方法对人工红细胞膜蛋白进行荧光定位, 从膜结构蛋白角度分析本实验室构建的人工红细胞, 也为血液代用品的评价提供了新的途径。以荧光标记兔抗人免疫球蛋白为抗体, 采用间接免疫荧光染色法对红细胞膜蛋白 spectrin α 1 原位标记, 在激光共聚焦显微镜下以 488 nm 蓝光激发荧光, 通过对比天然红细胞和人工红细胞的 spectrin 分布, 分析人工红细胞的构象和重建的过程。与天然红细胞类似, 人工红细胞在膜上有血影蛋白分布, 本实验荧光原位标记结果进一步揭示了人工红细胞的体外构建过程。

关键词 免疫荧光法; 人工红细胞; 血影蛋白; 定位

免疫荧光(Immunofluorescence, IFT)作为一门新兴技术, 具有灵敏度高、特异性好、显色特别、检测速度快和在细胞水平定位准确等传统技术不可比拟的优势, 已在现代生物学和医学领域得到广泛应用^[1-3]。

血影蛋白(spectrin)又称收缩蛋白, 由 α 和 β 亚基构成, 具有多个肌动蛋白连接位点。据报道^[4-7], 血影蛋白能为膜双层结构提供力学支持并在成纤维细胞、神经细胞、肌细胞、淋巴细胞等中参与信号转导。血影蛋白是红细胞膜蛋白最主要的组成成分之一, 约占膜提取蛋白总量的 25%~30%, 在维持红细胞形态、保持细胞膜完整性以及调控红细胞携氧等方面发挥着至关重要的作用^[8]。本课题组提出的基于细胞骨架的红细胞重建, 以引入膜骨架蛋白使其自组装为特点, 形成具有天然红细胞力学特性的人工红细胞。因此 spectrin 作为红细胞膜骨架主要蛋白, 对其进行原位分析在人工红细胞膜结构鉴定中具有关键作用。

本文运用间接免疫荧光法, 对天然红细胞和人工红细胞膜 spectrin 蛋白进行原位标记分析, 旨在阐明人工红细胞和天然红细胞在形态及结构等方面的异同。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 天然红细胞来自查体合格的成年人外周血。

人工红细胞 本实验室自制。

1.1.2 抗体 兔抗人 spectrin α 1 (H-110) 多克隆 IgG 抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司, 兔 IgG 抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司, 标记异硫氰酸酯荧光素 (FITC) 的山羊抗兔多克隆 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞收集 天然红细胞 取全血 100 μ l 加入 1 ml PBS 缓冲液(pH 7.4)缓慢混匀, 900 r/min 离心 3 min, 弃上清。重复洗涤两次。收集红细胞备用。

人工红细胞 取人工红细胞悬液 200 μ l 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。PBS 缓冲液重复洗涤两次。收集细胞备用。

1.2.2 细胞的免疫荧光标记 天然红细胞向样品加入 500 μ l 2% PFA 和 500 μ l 0.0075% 戊二醛, 室温固定 30 min。等渗 PBS 洗涤一次, 加入 0.03% Triton X-100 1 ml, 处理 1 min, 3 700 r/min 离心 5 min, 弃上清。PBS 洗涤一次。5% BSA 1 ml 室温封闭 40 min。Spectrin 抗体溶液(1:100) 500 μ l 室温摇床孵育 4 h, 使抗体和红细胞 spectrin 特异位点充分结合。PBS 洗涤两次, 加入 FITC 标记的山羊抗兔荧光

收稿日期: 2010-02-03 接受日期: 2010-05-21

国家自然科学基金(No.10572159), 重庆市科委科技计划项目攻关项目(No.2006ba5010), 高等学校学科创新引智计划(No.B06023)和重庆大学大型仪器设备开放基金资助项目

*通讯作者。Tel:023-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com.cn

抗体(1:100) 500 μ l, 室温摇床孵育 1 h 后, PBS 离心洗涤 3 次, 弃上清, 制成 0.2 ml 细胞悬液。

人工红细胞除省去 0.03% Triton X-100 处理步骤, 其他操作过程均与天然红细胞相同。

负对照除一抗使用兔 IgG 抗体外, 其余与前述实验组相同。

1.2.3 观察 将样品滴片, 于 OLYMPUS IX71 荧光显微镜(激发波长 492 nm, \times 100 油镜)下观察结果。

将细胞涂片置于 TCS SP5/Leica DMI6000 型激光共聚焦显微镜上, 使用 488 nm 激光激发荧光进行检测, 单层扫描图像从屏幕上显示后被照相机拍摄。

2 结果

用兔 IgG 抗体替换兔抗人 spectrin α 1 抗体进行染色作为负对照实验, 以 488 nm 氩离子激光激发未见明显荧光信号(数据未列出), 说明实验结果可靠, spectrin 的染色是特异的。

用兔抗人 spectrin α 1 为一抗, FITC 偶联山羊抗兔 IgG 为二抗进行间接免疫荧光标记实验。在荧光倒置显微镜和激光共聚焦显微镜下观察结果。图 1A 为未经处理的天然红细胞在显微镜下直接观察的结果, 可明显看出双凹碟盘状结构。经过 2% PFA+0.0075% 戊二醛固定和 0.03% Triton X-100 处理后(图 1B), 细胞结构仍然保持完整, 透明度增大。图 1C 为荧光染色后的红细胞, 其绿色荧光信号在细胞周缘明亮中间较暗, 并且呈不均匀的点状分布。

图 2 分别为天然红细胞和人工红细胞经 FITC 染色后激光共聚焦单层扫描图像, 其中 A 为明场, B 为 488 nm 氩离子激光激发荧光图像, C 为叠加场。从

图中可以看出, 人工红细胞能与天然红细胞一样被 spectrin α 1 抗体特异性荧光标记, 天然红细胞绿色荧光信号在细胞周边呈点状明亮分布, 人工红细胞荧光信号则比较均匀。天然红细胞大小比较均一, 约为 7~8 μ m, 人工红细胞直径分布更广。

同时, 激光共聚焦显微镜下可清晰观察到人工红细胞在自组装中的膜融合过程(见图 3), 膜双分子层汇聚后封闭成环, 该过程为人工红细胞基于力学原理重建的重要依据。

3 讨论

成熟红细胞不具细胞核, 其力学特性主要由细胞膜骨架提供。在低渗或去垢剂(如 Triton X-100)等条件下极易破溶。这在保持红细胞完整形态下对膜蛋白原位标记造成了障碍。本研究中, 固定液的选择显得尤为重要, 以 2% 多聚甲醛单独固定, 经 Triton X-100 处理时红细胞立即破溶, 通过向固定液中加入 0.0075% 戊二醛, 可缓解细胞的破溶, 其原理可能是戊二醛的醛基(-CHO)与红细胞膜蛋白上的氨基(-NH₂)交联^[9], 从而加强了红细胞膜的机械性能。

spectrin α 1 抗体与人血影蛋白的结合位点为 541~650 位氨基酸残基, 位于胞质端, 抗体需穿过细胞膜方可与抗原充分结合。Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚) 作为一种非离子型表面活性剂, 它能溶解脂质, 以增加抗体对细胞膜的通透性。介于红细胞无核结构的特殊性, 本实验中 Triton X-100 的工作浓度为 0.03%, 远低于普通细胞通透性处理中通常使用的浓度 1% 或 0.3%。且处理时间应严格控制, 一般不宜超过 3min, 红细胞开始发生溶血时应马上离心分离。

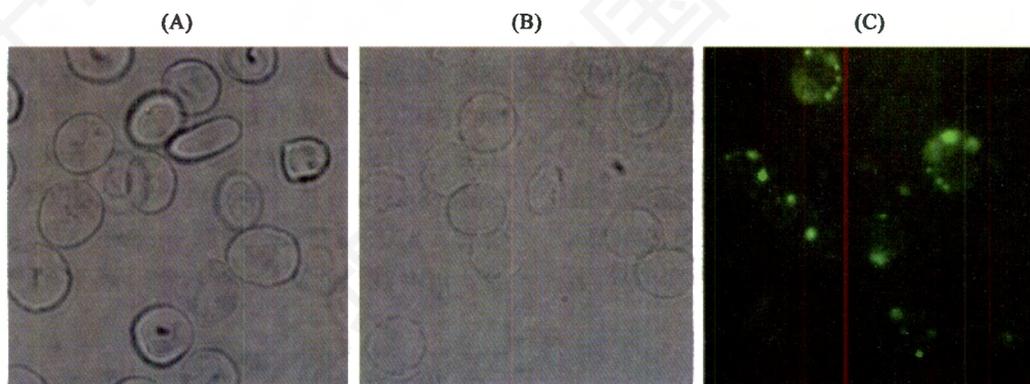


Fig.1 Immunofluorescence stained spectrin α 1 of natural RBC in front and behind

A: natural RBC (inverted phase-contrast microscope) after centrifuged and purified; B: RBC fixed by 2%PFA+0.0075% glutaraldehyde (GA) and treated by 0.03% Triton X-100 (inverted phase-contrast microscope); C: the result of spectrin α 1 stained by FITC (inverted phase-contrast microscope).

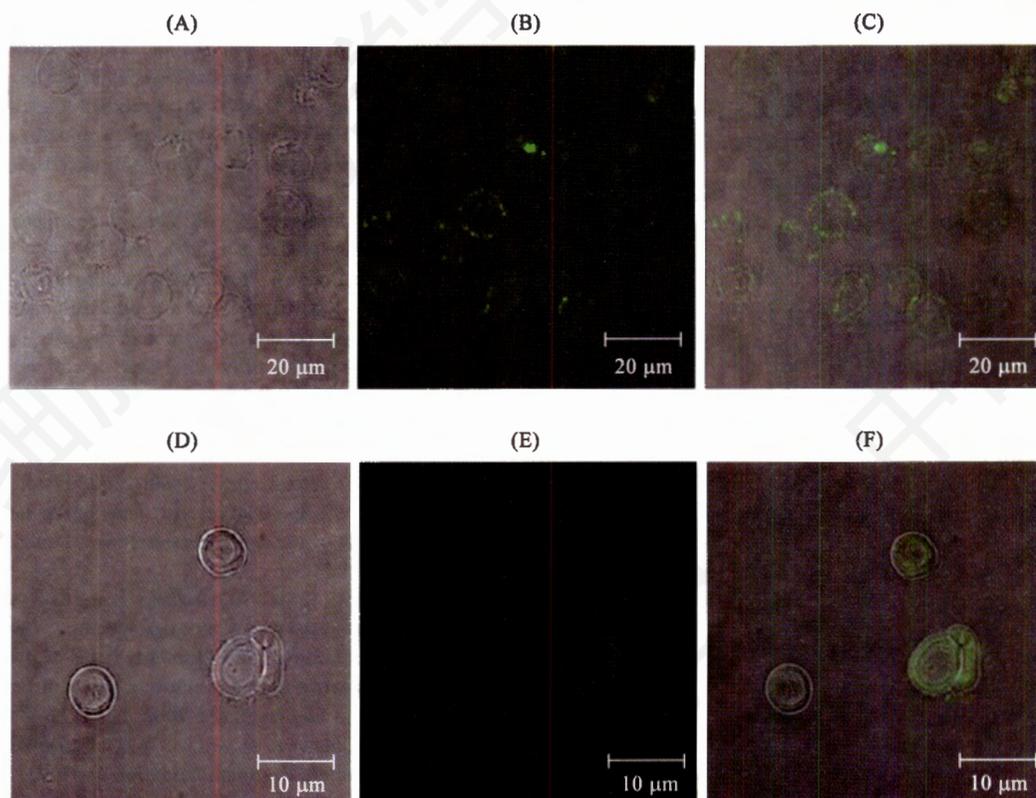


Fig.2 Laser scanning confocal microscopy of natural and artificial red blood cells spectrin α fluorescence staining images

A: bright field image of stained natural red blood cells; B: fluorescence image of natural red labeled by spectrin α FITC; C: image addition result of natural red blood cells under bright field and with fluorescence labeled; D: bright field image of artificial red blood cells after stained; E: fluorescence images of artificial red blood cells labeled by spectrin α FITC; F: image addition result of artificial red blood cells under bright field and with fluorescence labeled.

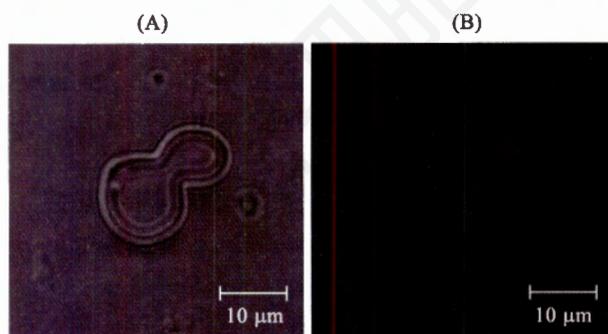


Fig.3 Laser scanning confocal microscope imagine of artificial blood cell under reconstructing

A: the brightfield imagine of RBC under reconstructing; B: FITC labeled spectrin α fluorescence imagine of blood cell under reconstructing.

本实验结果显示, 人工红细胞能够被 spectrin α 抗体特异性标记, 证明了血影蛋白被成功重建到了人工红细胞, 参与形成了膜结构。天然红细胞需用 Triton X-100 处理增加膜的通透性, 方可使抗体进入

胞质端与抗原结合, 而人工红细胞无需 Triton X-100 处理即可标记, 这说明了血影蛋白在其表面也有分布。原因可能是膜蛋白在重新形成人工红细胞膜过程中结合在了磷脂双分子层的外侧或者是结合过程中发生了翻转。对比天然红细胞和人工红细胞的荧光信号可以发现, 天然红细胞荧光信号在膜上呈规则的点状分布, 而人工红细胞则呈均匀分布。这可能是由于血影蛋白在膜骨架中以头碰头的方式形成六边形的网状结构^[10,11], 而在人工红细胞中血影蛋白则随机插入磷脂双分子层的结果。

本研究实现了在保持红细胞形态和结构完整的条件下对其特定膜蛋白的免疫荧光标记, 可显示目标蛋白在细胞中的原位分布状况。运用间接免疫荧光法对天然红细胞和人工红细胞的膜蛋白分布进行原位对比分析, 以此研究人工红细胞的结构及重建过程, 为基于膜骨架蛋白的重建人工红细胞相关研究提供了一条新颖的技术道路, 该方法在膜蛋白结构和功能研究方面也具有广泛的应用价值。

红细胞膜蛋白的免疫荧光标记为解析人工红细胞膜蛋白结构提供了直观的信息,通过对不同种膜蛋白进行标记,荧光亮度可在一定程度上反应每种膜蛋白的含量,荧光的分布可以反应出蛋白-磷脂、蛋白-蛋白之间的结合关系。细胞重建或者说膜双分子层的重建是一个复杂而有序的生物学过程,该方法的运用可实现对细胞重建的不同阶段的蛋白定位,从而为细胞重建原理及过程解析提供重要依据。

如图3所示,本实验观测到人工红细胞膜双分子层融合的过程,这是人工红细胞膜结构重建过程的直观证据。另一方面,通过对不同种属或不同发育阶段红细胞的膜蛋白定位(如 spectrin 和带3蛋白)可从红细胞的角度对不同种属生物间的同源性、差异性以及生物进化过程中的保守性、变异性进行研究。

参考文献(References)

- 1 Barbani MT, Hrisoho MG. Rapid detection of respiratory picornaviruses in nasopharyngeal aspirates by immunofluorescence assay. *Clinical Virology* 2009; 45: 245-8.
- 2 Stadlera C, Skogsa M, Brismarb H. A single fixation protocol for proteome-wide immunofluorescence localization studies. *Proteomics. Journal of Proteomics* 2010; 73: 1067-78.
- 3 Serra M, Brito C, Costa E, Sousa MFQ, Alves PM. Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC Biotechnology* 2009; 9(82): 1-14.
- 4 Jiliu Xu, Dorota Z, Jason S, Leszek K. Monoclonal antibodies to alpha I spectrin Src homology 3 domain associate with macropinocytic vesicles in nonerythroid cells. *Brain Res* 2001; 898: 171-7.
- 5 Ma DM, Morrow JS. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *Cell Sci* 2000; 113: 2331-43.
- 6 Ziemnicka-Kotula D, Xu J, Gu H, Potempska A, Kim KS, Jenkins EC, et al. Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton. *Biol Chem* 1998; 273: 13681-92.
- 7 Xu J, Ziemnicka D, Merz GS, Kotula L. Human spectrin Src homology 3 domain binding protein 1 regulates macropinocytosis in NIH 3T3 cells. *Cell Sci* 2000; 21: 3805-14.
- 8 Marchesi VT. Spectrin: present status of a putative Cyto-skeletal protein of the red cell membrane. *Membrane Biol* 1979; 51: 101-31.
- 9 McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12: 147-79.
- 10 Dao M, Li J, Suresh S. Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte. *Materials Science and Engineering C* 2006; 26: 1232-44.
- 11 Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2006; 37:180-7.

Immunofluorescence Technique for Location Analysis of Artificial Red Blood Cells Cytoskeletal Proteins-Spectrin

Ying Wang¹, Xiang Wang^{1*}, Yao-Jin Li², Feng Liu¹, Ke Xiao¹, Yan-Lian Xiong¹

(¹Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ²Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract In this paper, we reported a new way to locate membrane protein of artificial red blood cells (RBC) and also provided a new method to estimate blood substitute by using immunofluorescence technique. By applying this method, we analyzed the artificial RBC reconstructed by our laboratory from the view of membrane structural proteins. The conformation of artificial RBC and its reconstructing processes were analyzed by the comparison of distribution of spectrin in both natural RBC and artificial RBC, while spectrin α I was coloured *in situ* by indirect immunofluorescence method using fluorescence labeled rabbit-anti-human immunoglobulina and the fluorescence detected with laser scanning confocal microscope (LSCM) was excited by blue light of 488nm wavelength. It is similar to natural RBC, spectrin also distributed in the cytomembrane of RBC. Besides, our results further revealed the reconstructing processes of artificial RBC *in vitro*.

Key words immunofluorescence method; membrane protein; artificial red blood cells; localization

Received: February 3, 2010 Accepted: May 21, 2010

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.NSFC 10572159), Chongqing Science & Technology Council Research Project (No.CSTC 2006ba5010), "111 Project" entitled "Biomechanics & Tissue Repair Engineering" (No.B06023) and Sharing Fund of Chongqing University's Large-Scale Equipment

*Corresponding author. Tel: 86-23-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com.cn