

## 全内反射双通道观察双标记荧光染色的非洲绿猴肾细胞

刘晓晨<sup>1</sup>, 关立照<sup>2</sup>, 马万云<sup>1\*</sup>, 张宏权<sup>2</sup>

1. 清华大学物理系, 原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084

2. 北京大学医学部人体解剖与组织胚胎学系分子细胞生物学与肿瘤生物学实验室, 北京 100191

**摘要** 在像增强型电荷耦合器件 (ICCD) 荧光显微成像装置上用双通道成像方法观察了非洲绿猴肾细胞 (COS-7) 中由 EGFP 转染的肌球蛋白 Myosin 15a, 以及 Rhodamine 标记的细胞微丝。为观察微丝尖端的肌球蛋白 Myosin 15a, 采用了高灵敏、低损伤的全内反射激发荧光显微成像技术, 并在双通道中选用合适滤光片组合消除两种荧光染料间的光谱串扰。实验观测到非洲绿猴肾细胞内过表达的肌球蛋白 Myosin 15a 和伸长的微丝的分布情况, 尤其是清晰观察到 Myosin 15a 在微丝上的分布。为全内反射双通道荧光成像技术在生命科学中的应用展示了广阔的前景。

**关键词** 全内反射荧光 (TIRF); 双通道; 肌球蛋白; 微丝

**中图分类号:** TH742; O439 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)10-2676-04

### 引言

肌球蛋白 (Myosin) 是肌原纤维粗丝的组成单位, 在肌肉运动中起重要作用。已有文献表明<sup>[1, 2]</sup>, 肌球蛋白家族成员 Myosin 10 可通过与整合素 (integrin) 相互作用, 整合素 (integrin) 重新定位并促进微丝 (或丝状尾足, filopodia) 形成。过表达的肌球蛋白 Myosin 10 在细胞体内有分布, 在细胞微丝尖端也有分布。肌球蛋白 Myosin 家族成员有多种, 因此, 观察肌球蛋白在细胞内分布的情况对研究肌球蛋白和整合素相互作用有重要意义。在培养细胞时, 细胞微丝附着在培养皿底, 因此微丝尖端的肌球蛋白也附着在皿底, 且微丝尖端的肌球蛋白很小, 信号很弱, 需要高灵敏、低损伤的成像手段。常规宽场荧光显微镜由于细胞内激发背景中大量荧光分子干扰, 图像信噪比差, 极难观察细胞微丝尖端上的肌球蛋白 Myosin。

全内反射荧光成像技术 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 利用入射光发生全内反射的隐失波 (或消逝波 evanescent wave) 激发荧光分子, 隐失波强度在光疏介质中随界面距离以指数关系衰减, 一般仅能激发界面附近厚 200 nm 左右的薄层区域, 即只有此 200 nm 左右薄层区域内荧光分子才能被激发, 更深层的荧光分子不会激发, 从而避免了深层荧光分子的荧光干扰, 使图像信噪比和灵敏度都得到很

大提高<sup>[3, 4]</sup>, 非常适合进行界面成像观察。近年来 TIRF 技术在生命科学研究中, 尤其是在界面附近探测得到了广泛应用, 比如 DNA 分子观测、细胞囊泡释放观测、膜上蛋白观测等<sup>[5-7]</sup>。

本文用 EGFP 转染非洲绿猴肾细胞肌球蛋白中的另一家族蛋白 Myosin-15a, 在本实验室搭建的增强型电荷耦合器件 (intensified charge couple device, ICCD) 荧光显微成像装置<sup>[8]</sup>上, 采用 TIRF 成像方法观察转染 EGFP 的肌球蛋白 Myosin-15a 在非洲绿猴肾细胞中的分布。为说明肌球蛋白和微丝相对位置关系, 同时用荧光染料 Rhodamine 标记细胞微丝, 使用双通道对 EGFP 和 Rhodamine 两种不同荧光染料染色标记的非洲绿猴肾细胞同时成像。

### 1 方法

#### 1.1 材料与试剂

质粒 pEGFP-C2 购自美国 Clontech 公司, 胰酶购自美国 Amresco 公司, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, BSA, 多聚甲醛, Triton-X100, 均购自美国 Sigma 公司。Rhodamine Collagen 和 I 型胶原 Collagen type I 均由关立照提供, 转染试剂 Fugene HD 购自瑞士 Roche 公司。Opti-MEM, DMEM, FCS, RPMI 1640 均购自美国 GIBCO 公司。CaCl<sub>2</sub> 等其他化学试剂均购自中国北京化工厂。直径 6 cm 的细胞培养皿购自丹麦 Nunc

收稿日期: 2009-12-10, 修订日期: 2010-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (10874099, 90919012, 30830048) 和教育部博士点基金项目 (20090002110065) 资助

作者简介: 刘晓晨, 女, 1983 年生, 清华大学物理系原子分子纳米科学教育部重点实验室博士生 e-mail: liuxc06@mails.tsinghua.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: mawy@tsinghua.edu.cn

公司。PBS 购自瑞典 Medicago AB 公司。

## 1.2 细胞样品制备

COS-7 细胞传在细胞培养皿中, 24 h 内  $5 \mu\text{g}$  质粒 pEGFP-Myosin 15a,  $10 \mu\text{L}$  转染试剂 Fugene 6, Opti-MEM 300  $\mu\text{L}$  混匀, 室温下孵育 20~30 min。弃掉细胞培养皿中原培养基, 加入无血清培养基 1.5 mL, 再加入孵育好的质粒转染试剂混合物混匀,  $37^\circ\text{C}$  培养 7~8 h 后补约 2 mL 全培(DMEM +10%FCS)。

转染 pEGFP-Myosin 15a 的细胞 36 h 后, 将细胞用胰酶消化, 用 cell adhesion(RPMI 1640,  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ ,  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnCl}_2$ , 0.5% BSA) 重悬, 接种在用浓度  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 I 型胶原(Collagen type I)  $37^\circ\text{C}$  下包被 30 min, PBS 洗 2 次后的玻片上, 培养 3 h。吸弃 cell adhesion, PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 2 次。0.5% Triton-X100 作用细胞 10 min, PBS 洗 2 次。Rhodamine 标记的鬼笔环肽 phalloidin(1:2 000 稀释) 常温染色 30 min, PBS 洗 2 次。将玻片倒扣在载玻片上, 细胞面朝下, 用 fluorescent mounting buffer 封片, 放  $4^\circ\text{C}$  保存

备用。phalloidin 鬼笔环肽在微丝上, 所以荧光染料 Rhodamine 标记的是微丝。

## 1.3 成像系统

采用 TE2000 倒置显微镜(Nikon, 日本), 配合  $60\times$  N. A. 1.45 的 TIRF 专用油浸物镜进行 TIRF 成像, 激发光源采用氩离子激光器(Melles Griot, 美国; 型号为 35LAL415), 输出波长 488 nm。汞灯(Nikon, 日本)额定功率 100 W, 显微镜内滤光片 D1: Polychroic 82100bs(Chroma, 美国)和 F: Emitter 82101m(Chroma, 美国)。激光通过光纤引入显微镜, 调节使其沿物镜边缘入射, 可在样品界面发生全内反射产生隐失波并激发诱导样品发光。激发和成像系统装置图如图 1(a)所示, 虚线方框内为 TIRF 光路图。汞灯宽场激发滤光片 E:  $(555 \pm 12.5) \text{ nm}$ (Chroma, 美国), 激发光路如图 1(b)虚线方框内所示, 采集成像光路与图 1(a)中采集成像光路相同。荧光信号由 MetaMorph 软件(Universal Imaging, 美国)控制 ICCD(Roper Science, 美国; 型号为 I-PentaMAX Gen 4)采集成像。双通道荧光成像系统装置图如图 1 所示。

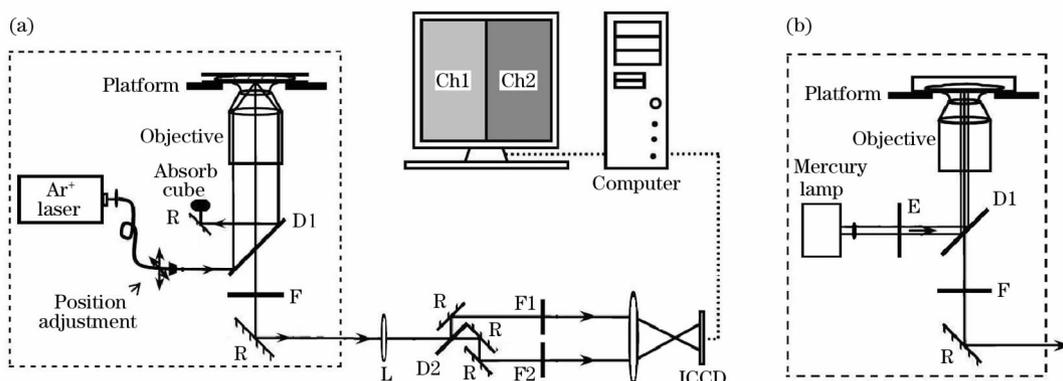


Fig. 1 Schematic illustration of the two-channel fluorescence imaging method. R= Reflector F= (Emission) Filter D= Dichroic (Filter) E=Exciter (Filter) L=Lens. (a) Schematic illustration of the two-channel TIRF fluorescence imaging method (b) Schematic illustration of the wide-field excitation

Dual-View 双波长分光器(Optical Insights, 美国)滤光片选择 D2: 565 nm DCXR, 通道 1(Ch1)滤光片 F1:  $(535 \pm 15) \text{ nm}$ (Chroma, 美国), 通道 2(Ch2)滤光片 F2:  $(585 \pm 15) \text{ nm}$ (Chroma, 美国)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双通道荧光成像

EGFP 和 Rhodamine 的吸收谱和发射谱见图 2(a)和(b)。我们选择 488 nm 激发 EGFP, 汞灯  $(555 \pm 12.5) \text{ nm}$  激发 Rhodamine, 对 EGFP 和 Rhodamine 双染色的非洲绿猴肾细胞双通道成像。荧光显微镜中使用滤光片组 D1 和 F[光谱图见图 2(c)], Dual-View 双波长分光器通道 1(Ch1)接收的荧光发射光谱范围在  $520 \sim 532 \text{ nm}$ , 由于只有 EGFP 荧光分子具有该波段的发射荧光, 如图 2(a)中阴影部分所示, 故通道 1(Ch1)接收的信号就是 EGFP 荧光分子的荧光; 通道 2

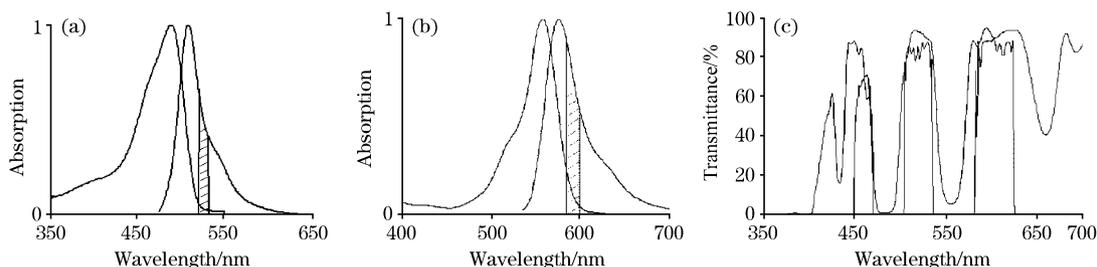
(Ch2)接收的荧光光谱范围在  $585 \sim 600 \text{ nm}$ , Rhodamine 荧光分子在该波段荧光发射光谱明显比 EGFP 的荧光发射光谱强, 如图 2(b)中阴影部分所示, 故通道 2(Ch2)接收的信号绝大部分是 Rhodamine 荧光分子的荧光。

### 2.2 EGFP 和 Rhodamine 染色标记的细胞荧光成像

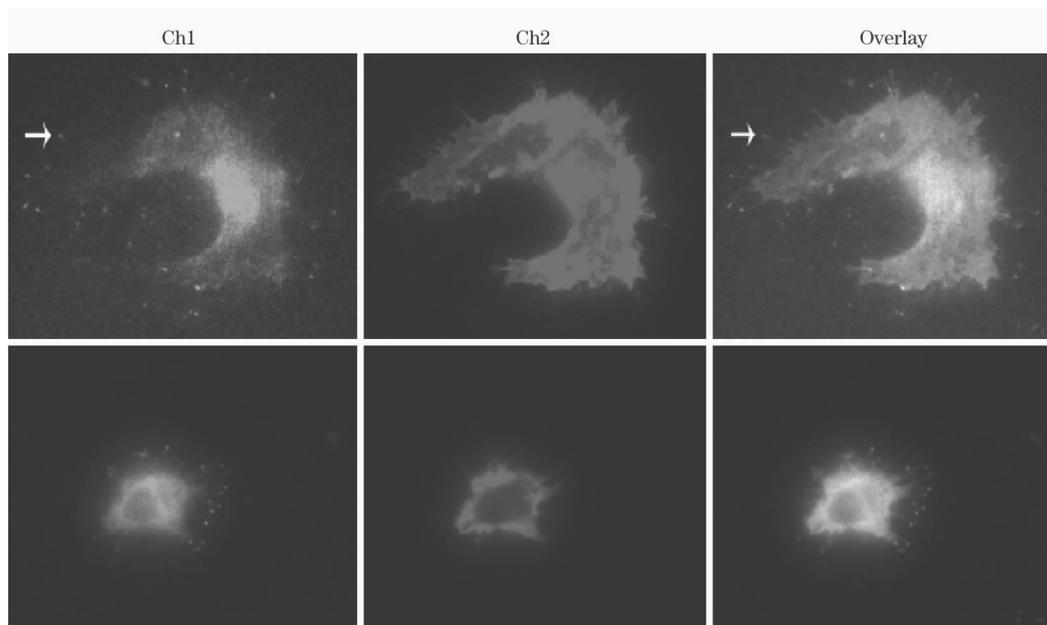
EGFP 和 Rhodamine 双染料染色的两个非洲绿猴肾细胞成像如图 3(图像已用 MetaMorph 软件去卷积处理)。通道 1(Ch1)显示的是 EGFP 荧光信号, 表示肌球蛋白 Myosin 15a 在细胞内的分布, 除在胞体有分布外, 胞体周围也有(图 3 Ch1 中白色箭头指示的绿色亮点)。通道 2(Ch2)显示的是 Rhodamine 荧光信号, 即表示微丝 filopodia 的分布。图 3 中的 Overlay 是 Ch1 和 Ch2 的重叠像。从重叠像可以看到肌球蛋白 Myosin 15a 除分布在胞体外, 还分布在微丝尖端上(图 3 Overlay 中白色箭头指示的绿色亮点)。

实验表明 Myosin 家族中的 Myosin 15a 和微丝在细胞中的分布位置与文献[1]中 Myosin 10 的分布相似, 揭示 Myo-

sin 15a 的作用可能与 Myosin 10 相似。对 Myosin 15a 的生物意义还需要进行更深入的研究。



**Fig. 2 Spectra of the two fluorochromes and D1 F Filter used in the work. (a) Absorption and fluorescence emission spectra of EGFP (b) Absorption and fluorescence emission spectra of Rhodamine (c) Spectra of D1, F Filter used in the work**



**Fig. 3 Fluorescence images of COS-7 cell double-stained by EGFP and Rhodamine. Ch1: Fluorescence of EGFP is shown in green, indicating Myosin 15a; Ch2: Fluorescence of Rhodamine is shown in red, indicating filopodia; Overlay: Overlay images of Ch1, Ch2. (arrows: Myosin 15a localized at the tips of filopodia) Scale bar: 10  $\mu$ m**

近年,多色成像技术(multicolor imaging)迅速发展,并在生命科学中得到广泛应用<sup>[7-10]</sup>,本实验室 ICCD 实时荧光显微系统双通道成像能同时对不同荧光分子进行成像,为下一步跟踪观测多荧光染料标记的活细胞内分子运动打下基础。

### 3 结 论

利用高灵敏成像 TIRF 技术和双通道成像方法,选用合

适滤光片组合消除了 2 种荧光染料间的光谱串扰,实现了 EGFP 和 Rhodamine 双标记染色的非洲绿猴肾细胞成像。清晰观察到过表达的肌球蛋白 Myosin 15a 和微丝在细胞内相对位置分布情况,以及分布在微丝尖端上的肌球蛋白的状况。该方法还可以满足长时间高灵敏观测活细胞的要求,在生命科学中具有重要的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang Hongquan, Berg J S, Li Zhilun, et al. Nature Cell Biology, 2004, 6(6): 523.
- [2] Sousa A D, Cheney R E. Trends in Cell Biology, 2005, 15(10): 533.
- [3] Axelrod D. Traffic, 2001, 2(11): 764.
- [4] Wang Y M, Austin R H, Cox E C. Physical Review Letters, 2006, 97(4): 048302.

- [ 5 ] Bowser D N, Khakh B S. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(1): 4212.
- [ 6 ] Dunne P D, Fernandes R A, McColl J, et al. *Biophysical Journal*, 2009, 97: L05.
- [ 7 ] LIN Dan-ying, LIU Xiao-chen, MA Wan-yun(林丹樱, 刘晓晨, 马万云). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2009, 29(6): 1581.
- [ 8 ] Yamauchi K, Yang M, Jiang P, et al. *Cancer Research*, 2006, 66(8): 4208.
- [ 9 ] Ma B, He F, Jablonska J, et al. *Microscopy Research and Technique*, 2007, 70: 171.
- [10] Garini Yuval, Young T, McNamara G. *Cytometry Part A*, 2006, 69A: 735.

## Observation of Double-Stained African Green Monkey Kidney COS-7 Cells Using Total Internal Reflection Double-Channel Fluorescence Microscopy

LIU Xiao-chen<sup>1</sup>, GUAN Li-zhao<sup>2</sup>, MA Wan-yun<sup>1\*</sup>, ZHANG Hong-quan<sup>2</sup>

1. Key Laboratory for Atomic and Molecular Nanosciences of Ministry of Education, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Laboratory of Molecular Cell Biology and Tumor Biology, Department of Anatomy & Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

**Abstract** Using a Dual-View wavelength splitter, double-stained African green monkey kidney COS-7 cells, transfected with pEGFP-Myosin 15a and costained with Rhodamine-filopodia were observed based on an ICCD(intensified charge couple device) fluorescence micro-imaging systems. Total internal reflection fluorescence microscopy was used to observe the overexpression of Myosin 15a to the tips of the elongation filopodia. An approach to collecting fluorescence in two channels and avoiding spectra crosstalk was employed to observe Myosin 15a and filopodia distribution in African green monkey kidney COS-7 cells. High sensitivity TIRF technology and two channels imaging method provided a wide application in bio-medical studies.

**Keywords** Total internal reflection fluorescence (TIRF); Double-channel; Myosin; Filopodia

(Received Dec. 10, 2009; accepted Mar. 20, 2010)

\* Corresponding author