

## 不同固定剂及渗透方法对免疫荧光技术中 EGFR 内吞转运观察效果的影响

冯婧文, 杨少斌, 王兆松, 赵文斌, 肖春花

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤细胞生物学实验室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060)

**摘要** 目的:探索适合表皮生长因子受体(EGFR)内吞转运免疫荧光观察的固定和渗透方法。方法:采用 OLYMPUS BX61 荧光显微镜及成像系统,对不同固定剂(4%多聚甲醛,甲醇,4%多聚甲醛+甲醇,丙酮,丙酮与甲醇体积比 1:1 的混合液)配合不同渗透方法(0.04% saponin,0.1% TritonX-100)得到的 EGF 刺激后 0 min 和 15 min 两个时间点的 EGFR 免疫荧光图像进行对比分析。结果:0 min 时 EGFR 主要定位于细胞质膜,4%多聚甲醛+甲醇的固定方法,配合使用 0.04% saponin,可以观察到细胞膜上明显、清晰、连续的 EGFR 信号。针对 EGF 刺激 15 min 后内吞进入细胞的 EGFR,不同固定方法对观察效果没有明显影响。但与配合使用 0.04% saponin 相比,0.1% TritonX-100 进行渗透能充分暴露 EGFR 在细胞核内的信号。结论:温和的固定和渗透方法可获得较好的 EGFR 膜定位信号。针对内吞转运中的 EGFR 需要较强的渗透剂,以确定 EGFR 在细胞内准确的定位。

**关键词** 细胞免疫荧光;固定剂;渗透剂;荧光显微镜;表皮生长因子受体

中图分类号 Q503

文献标志码 A

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是原癌基因 c-erbB1 的表达产物,是 ErbB 家族成员之一,该家族成员在细胞的生长、增殖和分化等生理过程中发挥重要的作用。研究结果显示,EGFR 与多种肿瘤的发生发展及预后存在明显的相关性,如肺癌<sup>[1-2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>、头颈部肿瘤<sup>[4]</sup>等,一直是肿瘤研究中的热点。EGFR 信号的下调方式有两种,一种是下调其下游信号,另一种是与相应配体结合后活化的 EGFR 被内吞和降解,后者是最重要的一种负反馈调节机制<sup>[5]</sup>。因此,在针对 EGFR 的研究中,对其表达、定位、内吞降解和循环的观察是不可或缺的。在这一研究过程中,免疫荧光技术是必要的实验手段之一。虽然目前免疫荧光技术已经在医学及生物学等领域得到广泛应用,但仍然需要根据目的蛋白的特性选择合适的固定和渗透方案。为了获得真实可靠的高质量的 EGFR 免疫荧光图像,本实验应用不同的固定和渗透方法组合,针对 EGF 作用下的 0 min 和 15 min 时间点的 EGFR 进行免疫荧光染色,探索一种合适的观察 EGFR 内吞转运的免疫荧光方法,为进一步研究 EGFR 的转运调节奠定基础。

### 1 材料和方法

**1.1 细胞培养** 人宫颈癌上皮细胞 Hela(中科院上海细胞库),使用含体积分数 10%的小牛血清(FBS Hyclone)和 1%的青链霉素的高糖 DMEM/High Glucose(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司)培养基,在体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱 37 °C 传代培养。细胞贴壁后 48 h 状态良好,成亚融合状态。使用 0.05% Trypsin-EDTA 消化细胞 2 min,使用培养基终止消化,离心(1 000 r/min, 3 min),弃上清,培养基重悬细胞,将细胞铺种于事先置入圆玻片的 12 孔板。待次日细胞汇合度达 60%,更换无血清的 DMEM+1%的青链霉素双抗培养基,饥饿细胞 48 h。

**1.2 抗体信息** 膜受体蛋白 EGFR 一抗为 EGFR Antibody (528): sc-120, a mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub> (Santa Cruz Biotechnology 美国);相应的荧光二抗为 Alexa Flour A488, goat anti-mouse IgG(H+L)(Invitrogen 美国)。

**1.3 样品处理** 从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出细胞,弃掉培养基,加含 50 ng/mL EGF 的 DMEM only 在 37 °C 下分别孵育 0 min 和 15 min,采用预冷的 1×PBS 终止刺激,之后清洗、固定细胞。

**1.4 固定、透化和封闭方法** 分别将 1 张 0 min 时间点和 1 张 15 min 时间点的细胞爬片分为一组,每组应用不同的固定方法和透化方法组合。

作者简介 冯婧文(1984-),女,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:肖春花, E-mail: xxcchh2002@163.com。

1.4.1 固定方法 a. 4%多聚甲醛,室温固定 10 min; b. 甲醇, -20℃固定 8 min; c. 4%多聚甲醛室温固定 10 min, 1×PBS 清洗玻片, 3 次, 每次 5 min, 再以甲醇-20℃固定 8 min; d. 丙酮, -20℃固定 6 min; e. 丙酮与甲醇体积比 1:1 混合液, -20℃固定 10 min。

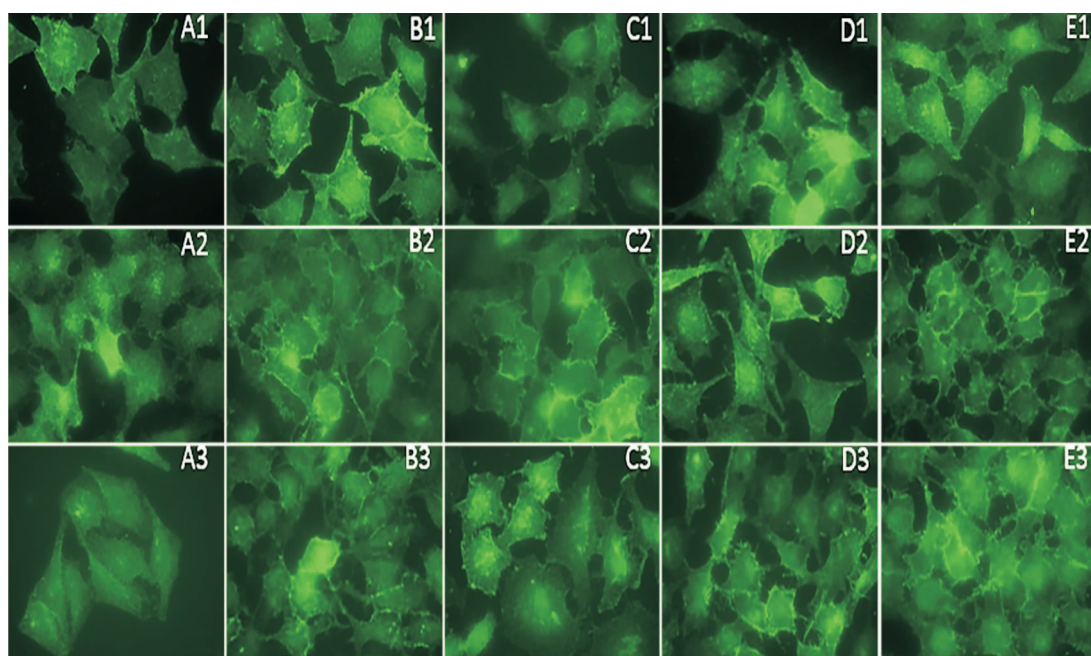
1.4.2 透化和封闭方法 f. 不进行透化, 2% BSA 室温封闭 1 h; g. 含 0.04% saponin 的 2% BSA 室温透化封闭 1 h; h. 0.1% TritonX-100 室温透化 10 min, 1×PBS 清洗 3 次, 每次 5 min 再以 2% BSA 室温封闭 1 h。

1.5 抗体孵育与封片 将所用细胞爬片分为两组: α 组为 0.1% TritonX-100 透化的细胞爬片与未进行透化的细胞爬片, 使用封闭液稀释一抗; β 组为 0.04% saponin 透化的细胞爬片, 使用含 0.04% saponin 的封闭液稀释一抗。一抗的稀释比例为 1:200。一抗孵育 4℃过夜。次日清洗玻片, 对 α 组使用 1×PBS、对 β 组使用含有 0.04% saponin 的 1×PBS。孵育二抗, 1:200 稀释二抗, 稀释液与一抗孵育时相同, 室温下避光孵育 1 h。二抗孵育完毕后, 按照清洗一抗的方式避光清洗玻片, Molecular probes Gold antifade with DAPI 封片剂封片。

1.6 实验结果评价方法 使用 OLYMPUS BX61 荧光显微镜及成像系统(10×目镜和 100×物镜), 在相同设置参数下观察并采集图像。对荧光显微镜下获取的图像的评价指标主要有两个: 一个是形态是否完好; 另一个为荧光信号强度, 两者结合用来判断结果。染色的结果以阳性信号部位着色清晰、背景不着色为佳。

## 2 结果

2.1 不同固定剂配合不同透化方法 EGFR 膜定位效果评价 4% PFA 固定的细胞在不进行渗透时 EGFR 膜定位信号极弱, 配合使用渗透剂得到的 EGFR 信号成弥散状。先以 4% PFA 固定再使用甲醇进行固定和丙酮与甲醇按 1:1 混合固定, 配合 saponin 进行渗透, 得到的 EGFR 信号较清晰, 背景低, 效果最好。单独使用甲醇固定, 细胞内背景高, 荧光信号稍弱且与丙酮相同, 胞膜结构有不同程度破坏, 信号不连续。使用 TritonX-100 渗透, 对 EGFR 的膜信号有一定的破坏(图 1)。



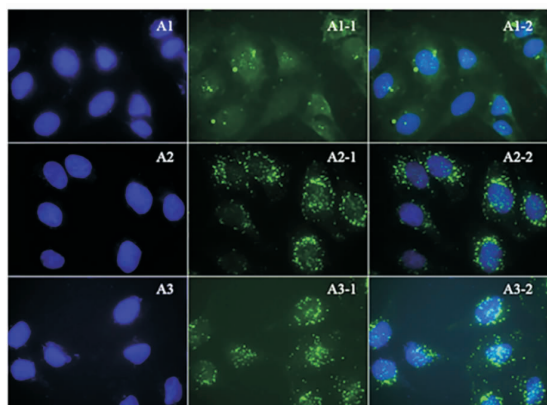
固定与渗透及抗体孵育方法: A1:a+f+α; A2:a+g+β; A3:a+h+α; B1:b+f+α; B2:b+g+β; B3:b+h+α; C1:c+f+α; C2:c+g+β; C3:c+h+α; D1:d+f+α; D2:d+g+β; D3:d+h+α; E1:e+f+α; E2:e+g+β; E3:e+h+α

图1 不同固定及渗透方法对 EGF 刺激 0 min EGFR 免疫荧光效果的影响 (×1 000)

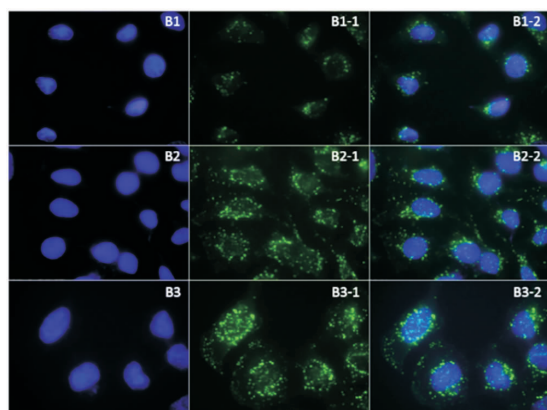
2.2 不同固定剂配合不同透化方法 EGFR 内吞转运染色效果评价 由 4%多聚甲醛固定的细胞, 在不进行渗透时细胞内背景很高, 且囊泡结构染色效果较差。采用其它固定方法在配合相同渗透方法

时, 效果无明显差异, 但结合 TritonX-100 进行渗透的样品组较 saponin 渗透组和不进行渗透组 EGFR 核定位信号显著加强(图 2~6)。

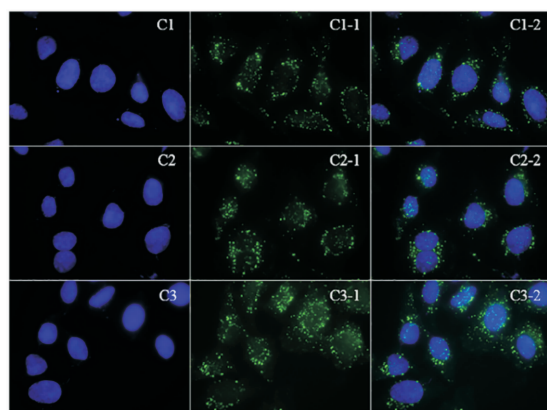




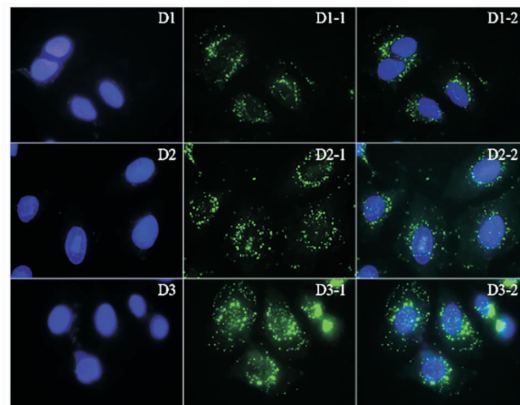
处理方法: A1 组:a+f+ $\alpha$ ; A2 组:a+g+ $\beta$ ; A3 组:a+h+ $\alpha$   
左侧为细胞核 DAPI 着色,中间为 EGFR,右侧为 merge  
图 2 4%多聚甲醛固定配合不同透化方法对 EGF 刺激 15 min 后 EGFR 免疫荧光效果的影响( $\times 1000$ )



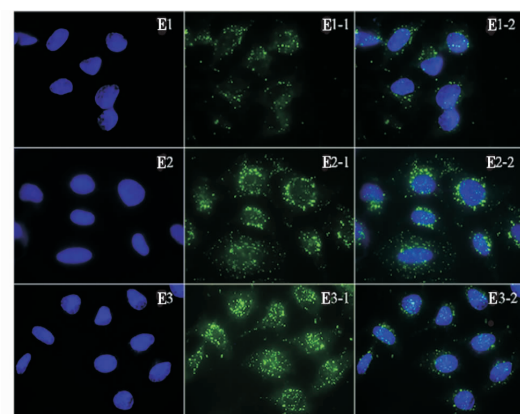
处理方法:B1 组:b+f+ $\alpha$ ; B2 组:b+g+ $\beta$ ; B3 组:b+h+ $\alpha$   
左侧为细胞核 DAPI 着色,中间为 EGFR,右侧为 merge  
图 3 甲醇固定配合不同透化方法对 EGF 刺激 15 min 后 EGFR 免疫荧光效果的影响( $\times 1000$ )



处理方法:C1 组:c+f+ $\alpha$ ; C2 组:c+g+ $\beta$ ; C3 组:c+h+ $\alpha$   
左侧为细胞核 DAPI 着色,中间为 EGFR,右侧为 merge  
图 4 4%多聚甲醛固定后再经甲醇固定配合不同透化方法对 EGF 刺激 15 min 后 EGFR 免疫荧光效果的影响( $\times 1000$ )



处理方法:D1 组:d+f+ $\alpha$ ; D2 组:d+g+ $\beta$ ; D3 组:d+h+ $\alpha$   
左侧为细胞核 DAPI 着色,中间为 EGFR,右侧为 merge  
图 5 丙酮固定配合不同透化方法对 EGF 刺激 15 min 后 EGFR 免疫荧光效果的影响( $\times 1000$ )



处理方法:E1 组:e+f+ $\alpha$ ; E2 组:e+g+ $\beta$ ; E3 组:e+h+ $\alpha$   
左侧为细胞核 DAPI 着色,中间为 EGFR,右侧为 merge  
图 6 丙酮与甲醇按 1:1 混合固定配合不同透化方法对 EGF 刺激 15 min 后 EGFR 免疫荧光效果的影响( $\times 1000$ )

### 3 讨论

细胞免疫荧光技术是利用抗原抗体之间的特异性结合反应,通过荧光素标记的抗体检测抗原蛋白在细胞内定位的常用方法。免疫荧光实验过程中选择合适的固定剂既可以迅速固定细胞、终止酶反应,又可以使细胞结构保持完整,并能避免破坏抗原,使其保留抗原性,同时透化细胞膜甚至核膜促进抗体大分子进入细胞与抗原结合。非离子型表面活性剂 TritonX-100 和 saponin 等,能够破膜、促进抗体进入细胞与抗原结合,同时在清洗玻片时可以起到洗脱非特异性结合的抗体的作用。

多聚甲醛是一种交联剂,通过氨基的自由端与蛋白或多肽链氨基酸侧链的功能基团相互作用,使蛋白多肽分子之间形成亚甲基桥,抗原被固定在原位。这种固定方法比较温和,容易丧失一些成分的

抗原性<sup>[6]</sup>,且在渗透处理过程中可能出现解交联的现象。多聚甲醛本身的透膜作用较弱,不进行渗透,抗体很难进入细胞(图2 A1-1)。作为有机溶剂的甲醇和丙酮,固定细胞的原理是使蛋白变性沉淀在原位<sup>[7]</sup>。经甲醇、丙酮和丙酮与甲醇1:1混合液固定的膜蛋白EGFR表现出信号的不连续性,可能是由于脂溶性固定剂破坏了膜结构(图1D、E)。用相对温和的多聚甲醛固定细胞,维持了细胞结构,再用甲醇处理,使蛋白变性沉淀,经温和透膜的0.04% saponin渗透,去除非特异性结合,胞膜蛋白结构保存最为完好,信号也较强(图1 C2)。

Saponin和TritonX-100均属于非离子型表面活性剂,可以提高真核细胞膜的通透性,相比于TritonX-100,使用saponin完好地保存了质膜的结构(图1 C2)。但是,对核膜的透化效果较差,抗体不能充分进入细胞核与抗原结合,从而使核定位信号减弱并在免疫荧光过程中影响EGFR内吞后的核定位效果观察(图2 A2-1、A3-1,图3 B2-1、B3-1,图4 C2-1、C3-1,图5 D2-1、D3-1,图6 E2-1、E3-1)。

综上所述,免疫荧光需要根据目标蛋白的特性,反复验证寻找一种合理的固定和渗透方案,以反映真实的实验结果,同时注意以下几点:(1)保持细胞或组织形态结构的完整性;(2)保持抗原原有

的定位;(3)在前两者的基础上充分渗透以暴露抗原,利于抗体与抗原结合。通过对不同条件进行比较,最终确定一种最适宜目标蛋白的免疫荧光条件。

#### 参考文献:

- [1] Paez J G, Janne P A, Lee J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004,304(5676): 1497
- [2] Liang W, Zhang Y, Kang S, et al. Impact of EGFR mutation status on tumor response and progression free survival after first-line chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. J Thorac Dis, 2014,6(9): 1239
- [3] Serrano M J, Ortega F G, Alvarez-Cubero M J, et al. EMT and EGFR in CTCs cytokeratin negative non-metastatic breast cancer [J]. Onco-target, 2014,5(17): 7486
- [4] Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, et al. Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in head and neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response[J]. BMC Res Notes, 2014,7: 337
- [5] Henriksen L, Grandal M V, Knudsen S L, et al. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands[J]. PLoS One, 2013,8(3): e5814
- [6] 范瑾瑾, 骆宁, 董秀清, 等. 不同固定剂在激光共聚焦荧光技术中的效果评价[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009,30(5): 600
- [7] 林哲绚, 罗红军, 李慧, 等. 免疫荧光技术中不同固定剂对细胞p65核移位观察效果的影响[J]. 山西医药杂志, 2012,41(3): 211

(2014-10-12 收稿)

文章编号 1006-8147(2015)03-0267-02

## 个案报道

# 原发性甲状腺淋巴瘤1例报道

李静敏, 王华庆

(天津医科大学肿瘤医院淋巴瘤内科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津300060)

关键词 甲状腺淋巴瘤; 恶性肿瘤; 桥本甲状腺炎

中图分类号 R581

文献标志码 B

原发性甲状腺淋巴瘤(PLT)是一种起源于甲状腺内淋巴细胞的恶性肿瘤,甚为少见,约占甲状腺恶性肿瘤的2%~5%,占结外淋巴瘤的2.5%~7.0%<sup>[1]</sup>。临床症状与体征缺乏特征性,确诊常常依赖于术后病理检查,术前易误诊为桥本甲状腺炎(HT)、甲状腺其他疾病或漏诊。本文以1例甲状腺淋巴瘤为例,对该疾病的发病机制、组织学类型、诊断、治疗

及预后进行探讨。

## 1 病历资料

患者,女性,52岁,主因“乏力、盗汗,体检发现甲状腺肿物1月余”于2013年7月14日入院。查体:甲状腺左叶可触及肿大结节,质韧偏硬,无触痛、压痛,活动度欠佳。辅助检查:FT3 3.02 pmol/L、FT4 4.37 pmol/L、TSH 15.43 mIU/L、Anti-TG 98.84 IU/L、Anti-TPO>111.68 IU/L。甲状腺彩超示:甲状腺左叶实性肿物——考虑(1)不典型结节性甲状腺肿;

作者简介 李静敏(1990-),女,硕士在读,研究方向:淋巴瘤内科学;  
通信作者:王华庆, E-mail:huaqingw@163.com。