



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108169474 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201810028580.3

(22)申请日 2018.01.12

(71)申请人 中国科学院成都生物研究所

地址 640041 四川省成都市人民南路四段9号

(72)发明人 胡亚东 刘静 淳泽 赵若茜
郑世刚

(74)专利代理机构 成都坤伦厚朴专利事务所(普通合伙) 51247

代理人 刘坤

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种新型细胞固定剂

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种新型细胞固定剂。采用的技术方案是:将L-抗坏血酸作为一种新型细胞固定剂,应用于免疫荧光技术。本发明首次报道了L-抗坏血酸可以作为细胞固定剂对细胞进行固定。经L-抗坏血酸固定的细胞不仅能完整地保持形态和结构,还可以很好地保存其抗原形态,有利于与相应抗体的进行特异结合。同时,L-抗坏血酸还可对细胞进行一定的通透处理,固定细胞时不需额外添加细胞通透剂。而且,L-抗坏血酸本身无毒无害,易溶于水中,配制及使用过程简单、快速、环保,无有毒有害物质产生。

1. 一种新型细胞固定剂,其特征在于,有效成分为L-抗坏血酸。
2. L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用。
3. 如权利要求2所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:所述应用包括作为一种细胞固定剂。
4. 如权利要求2所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:所述应用还包括作为一种细胞通透剂。
5. 如权利要求2所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:所述L-抗坏血酸需配制为溶液使用,配制使用溶剂为水或PBS缓冲液或生理盐水。
6. 如权利要求5所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:所述L-抗坏血酸溶液的浓度为50mM~1M。
7. 如权利要求6所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:所述L-抗坏血酸溶液的浓度为100mM。
8. 如权利要求7所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:固定和通透贴壁生长细胞的方法为:取细胞爬片,用PBS清洗细胞;而后用100mM的L-抗坏血酸溶液浸泡细胞爬片,置于室温。
9. 如权利要求7所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:固定和通透悬浮生长细胞的方法为:收集悬浮细胞,将细胞用PBS重悬,吸取细胞悬液置于清洁载体上,25~45℃自然烘干,再加入100mM的L-抗坏血酸溶液覆盖细胞,置于室温。
10. 如权利要求8或9所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其特征在于:加入的L-抗坏血酸溶液需将待固定细胞完全覆盖。

一种新型细胞固定剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种新型细胞固定剂。

背景技术

[0002] 免疫荧光技术(Immunofluorescence, IF)是一种基于抗原-抗体反应,以荧光素标记的抗体来追踪细胞内特定抗原(一般为蛋白质)的存在及分布的实验技术,在现代生物学研究领域有着广泛而重要的应用。进行免疫荧光实验时,首先需要将细胞固定,使细胞的蛋白质凝固,终止各种酶促反应,防止细胞自溶或破碎,以保持细胞原有的形态和结构。因此,细胞固定的关键在于:选择合适的细胞固定剂,以保持细胞形态不改变,同时原位保持抗原的三维结构,避免抗原的失活或弥散。

[0003] 细胞固定剂的种类较多,目前常用的细胞固定剂主要有醛类、醇类等,其中,多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)因其良好的细胞和抗原固定性,在免疫荧光实验中最为常用。但多聚甲醛本身具有一定的毒性,加热时产生的甲醛又会对环境造成污染,对实验人员身体造成伤害。因此,针对免疫荧光实验,急需开发新型无毒无害的高效细胞固定剂。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种新型细胞固定剂。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明所采用的技术方案是:一种新型细胞固定剂,其有效成分为L-抗坏血酸。

[0006] 相应的,L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用。

[0007] 优选的,L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,包括作为一种细胞固定剂。

[0008] 优选的,L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,还包括作为一种细胞通透剂。

[0009] 优选的,所述L-抗坏血酸需配制为溶液使用,配制使用溶剂为水或PBS缓冲液或生理盐水。

[0010] 优选的,所述L-抗坏血酸溶液的浓度为50mM~1M。

[0011] 优选的,所述L-抗坏血酸溶液的浓度为100mM。

[0012] 优选的,所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其固定和通透贴壁生长细胞的方法为:取细胞爬片,用PBS清洗细胞;而后用100mM的L-抗坏血酸溶液浸泡细胞爬片,置于室温。

[0013] 优选的,所述的L-抗坏血酸在免疫荧光技术中的应用,其固定和通透悬浮生长细胞的方法为:收集悬浮细胞,将细胞用PBS重悬,吸取细胞悬液置于清洁载体上,25~45℃自然烘干,再加入100mM的L-抗坏血酸溶液覆盖细胞,置于室温。

[0014] 优选的,加入的L-抗坏血酸溶液需将待固定细胞完全覆盖。

[0015] 本发明具有以下有益效果:

[0016] 1、首次报道了由L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, 维生素C)配制的溶液可以作为细胞固定剂对细胞进行固定,配制溶液的溶剂可为水、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer

saline,以下简称PBS)、生理盐水等能溶解L-抗坏血酸,对细胞无毒无害且能帮助维持细胞渗透压的溶液。

[0017] 2、经L-抗坏血酸固定的细胞不仅能够完整地保持其形态和结构,还可以很好地保存抗原,有利于其与相应抗体的特异结合。

[0018] 3、L-抗坏血酸在对细胞进行固定的同时,还可改善细胞膜的通透性,对细胞进行一定的通透处理,无需像其它常规细胞固定剂一样,额外添加细胞通透剂。

[0019] 4、常用的细胞固定剂,如多聚甲醛等,本身具有一定毒性,而L-抗坏血酸对人体无毒副作用,对环境友好。

[0020] 5、常用的细胞固定剂,如多聚甲醛等,在水中的溶解度不高,其配制一般需要加热搅拌以帮助溶解,而加热又往往会促使此类试剂分解出一些毒性更强的物质,如甲醛等;本发明采用的L-抗坏血酸易溶解于水,配制过程简单、快速、环保,无需加热,更没有有毒有害物质产生。

附图说明

- [0021] 图1为免疫荧光技术间接法原理图;
- [0022] 图2为免疫荧光技术实验流程示意图;
- [0023] 图3为不同细胞固定剂对MES23.5细胞内酪氨酸羟化酶的检测结果;
- [0024] 图4为不同细胞固定剂对NB4细胞内 γ -tubulin的检测结果;
- [0025] 图5为不同细胞固定剂对星形胶质细胞内GFAP的检测结果;
- [0026] 图6为不同细胞固定剂对星形胶质细胞内GFAP和神经元内MAP2的检测结果;
- [0027] 图7为不使用细胞通透剂时,不同细胞固定剂对星形胶质细胞内GFAP的检测结果。

具体实施方式

[0028] 免疫荧光技术主要分直接法和间接法两种,主要的区别在于抗原是否直接与标记了荧光素的抗体结合。一般间接法使用较多,故本文使用间接法,具体原理如图1所示,实验流程如图2所示。

[0029] 以下实施例只是为了让本领域技术人员更详细地了解本发明的使用方法和技术效果,不作为对本发明的保护限定。

[0030] 本文使用试剂购买途径:

[0031] (1) N1添加剂、DMEM/F12medium、RPMI medium 1640、双抗(青霉素-链霉素)、磷酸盐缓冲液(PBS)购自Wisent;

[0032] (2) Neurobasal medium、B27添加剂、MEM medium购买自Invitrogen,一抗Mouse anti-Glial fibrillary acidic protein (Anti-GFAP)、Poly-L-Lysine、L-抗坏血酸、多聚甲醛(PFA)、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)购自Sigma;

[0033] (3) 一抗Rabbit anti-Microtubule-associated protein (Anti-MAP2)、一抗Rabbit anti-Tyrosine hydroxylase (Anti-TH)购自Millipore;

[0034] (4) 一抗Rabbit anti- γ -tubulin购自Santa Cruz Biotechnology;

[0035] (5) 荧光标记二抗羊抗兔IgG (TRITC标记)、羊抗兔IgG (FITC标记)、羊抗小鼠IgG (FITC标记)购自北京中杉金桥公司;

[0036] (6) 抗荧光衰减封片剂购自北京普利莱基因技术有限公司；
[0037] (7) 胎牛血清购自兰州百灵, Triton X-100、牛血清白蛋白 (BSA) 购自碧云天公司。
[0038] 实施例一:L-抗坏血酸作为细胞固定剂对细胞系单抗原的检测 (MES23.5细胞)
[0039] 免疫荧光实验的主要目的是检测样品中特定抗原的存在及其分布。因此本发明首先选择了MES23.5细胞作为样品检测其中的特定抗原。MES23.5细胞是大鼠胚胎中脑细胞与小鼠神经母细胞瘤-胶质瘤细胞系N18TG2杂交融合而成的一种杂交瘤细胞,其细胞内含有丰富的酪氨酸羟化酶用于合成多巴胺,为多巴胺能神经元的标志物。
[0040] 1、准备实验细胞
[0041] 本发明所用的多巴胺能神经元细胞系MES23.5来自申请人实验室保藏。
[0042] 2、准备试剂
[0043] DMEM/F12培养基:DMEM/F12medium+5%胎牛血清+1%N1添加剂+1%双抗。
[0044] 3、培养细胞
[0045] 接种于DMEM/F12培养基中,采用二氧化碳培养箱在5%CO₂、37℃的条件下进行贴壁培养。
[0046] 4、制作细胞爬片
[0047] 将圆形盖玻片洗净,高温灭菌后放置于6孔板中。在6孔板中每孔加入2mL的Poly-L-Lysine溶液且没过盖玻片,37℃培养箱中放置24h,使盖玻片表面被Poly-L-Lysine所包被。
[0048] 弃去Poly-L-Lysine溶液,用PBS清洗两遍。将MES23.5细胞种于处理好的6孔板盖玻片上,放入培养箱中培养至细胞长满盖玻片60%区域时,将6孔板取出进行细胞固定。
[0049] 5、固定细胞
[0050] (1) 细胞固定液的配置:
[0051] 实验组:称取L-抗坏血酸固体粉末,溶解于PBS中使其终浓度为100mM。
[0052] 对照组:称取多聚甲醛固体粉末,加热溶解于PBS中得4%多聚甲醛 (w/v)。
[0053] (2) 细胞固定:将上述含有细胞爬片的6孔板取出培养箱,弃去培养基,用PBS清洗细胞3次。分别往6孔板中加入2mL 100mM的L-抗坏血酸溶液(实验组)或4%的多聚甲醛溶液(对照组)浸泡细胞爬片以固定细胞,室温下固定30min。
[0054] 6、细胞通透
[0055] 细胞固定完成后,将6孔板中的细胞固定液弃去,加入PBS进行清洗。清洗时将6孔板置于脱色摇床中低速水平震荡,每次5min,清洗3次。弃去PBS,在6孔板中每孔加入2mL 0.2%Triton X-100溶液 (PBS配制) 进行细胞通透,室温下放置30min。
[0056] 7、样品封闭与抗体结合
[0057] 使用特异抗体Rabbit Anti-TH做为一抗,羊抗兔IgG (FITC标记) 做为二抗,用2% BSA (PBS配制) 分别对其进行稀释备用,稀释浓度参考所使用的一抗及二抗说明书,一般为1:200~1:1000,本实施例为1:500。
[0058] 弃去细胞通透液,PBS清洗3次,每次5min。6孔板中每孔加入2mL5%的脱脂牛奶 (PBS配制) 进行样品封闭,室温放置1h。样品封闭后,将一抗与相应的细胞置于4℃下共同孵育过夜。取出6孔板,弃去一抗,PBS清洗6次,每次5min。再将二抗(荧光素标记)与细胞放置于室温下避光孵育3h。弃去二抗,PBS清洗6次,每次5min,避光操作。

[0059] 8、染核、封片、检测

[0060] 细胞与抗体结合完成后,将1 μ g/mL的DAPI (PBS配制) 与细胞于避光处室温孵育15min,以对细胞核进行染色。弃去DAPI染色液,PBS清洗3次。取15 μ L防荧光淬灭封片剂滴加于盖玻片细胞上,最后将盖玻片倒扣于清洁的载玻片上,完成免疫荧光实验样品的制备,4℃避光保存。使用激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)观察制备好的样品,图像采用ZEN软件进行采集和输出。

[0061] 9、结果如图3所示,其中标尺代表50 μ m。DAPI是一种能够与DNA强力结合的荧光染料,能穿透细胞膜对细胞核进行染色,因此在免疫荧光实验中常用来指引细胞核的位置。酪氨酸羟化酶(TH)被荧光素FITC标记的抗体所特异识别,是MES23.5细胞质胞浆中存在的特异酶。因此成功的免疫荧光实验不仅需要显示出酪氨酸羟化酶存在与否,还需要显示其分布范围。从图3可以看出,使用4%多聚甲醛进行细胞固定后,酪氨酸羟化酶的存在位置为细胞胞浆,与细胞核的位置并不重合(PEF的Merge中,两个箭头指示位置不重合),说明4%多聚甲醛能够对MES23.5细胞中的酪氨酸羟化酶抗原进行良好的检测和定位。使用L-抗坏血酸进行酪氨酸羟化酶检测时,能够得到同样的结果。这表明L-抗坏血酸与多聚甲醛在细胞固定的过程中对蛋白抗原三维结构的保存具有同样的效果。因此对于检测和定位细胞胞浆中的蛋白质酶类,L-抗坏血酸及多聚甲醛均可作为良好的细胞固定剂应用于免疫荧光实验中。

[0062] 实施例二:L-抗坏血酸作为细胞固定剂对细胞系单抗原检测的影响(NB4细胞)

[0063] 微管蛋白是一类细胞骨架蛋白,也是免疫荧光实验中经常检测的抗原蛋白,其中 γ -tubulin作为微管蛋白的一种,主要存在于细胞的中心体中,在微管的组装中起着关键作用。本实施例选择人急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4作为检测细胞,展示L-抗坏血酸作为固定剂对NB4细胞中 γ -tubulin的检测效果。

[0064] 1、准备实验细胞

[0065] 本发明所用的人急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4来自申请人实验室保藏。

[0066] 2、准备试剂

[0067] 1640培养基:RPMI medium 1640+10%胎牛血清+1%双抗。

[0068] 3、培养细胞

[0069] 接种于1640培养基中,采用二氧化碳培养箱在5%CO₂、37℃的条件下进行悬浮培养。

[0070] 细胞培养传代2次后的第二天,于800r/min离心5min,收集细胞进行细胞固定。

[0071] 4、固定细胞

[0072] (1) 细胞固定液的配置:

[0073] 实验组:称取L-抗坏血酸固体粉末,溶解于PBS中使其终浓度为100mM。

[0074] 对照组:称取多聚甲醛固体粉末,加热溶解于PBS中得4%多聚甲醛(w/v)。

[0075] (2) 细胞固定:将上述离心收集到的细胞用PBS重悬,调整细胞浓度至100万个/mL左右,吸取细胞悬液于清洁的盖玻片上(盖玻片预先放置于6孔板中)。将载有细胞悬液的盖玻片放置于37℃烘箱中自然烘干,之后分别往6孔板中加入2mL 100mM的L-抗坏血酸溶液(实验组)或4%的多聚甲醛溶液(对照组)浸泡盖玻片以固定细胞,室温下固定30min。

[0076] 5、细胞通透

[0077] 细胞固定完成后,将6孔板中的细胞固定液弃去,加入PBS进行清洗。清洗时将6孔板置于脱色摇床中低速水平震荡,每次5min,清洗3次。弃去PBS,在6孔板中每孔加入2mL 0.2% Triton X-100溶液 (PBS配制) 进行细胞通透,室温下放置30min。

[0078] 6、样品封闭与抗体结合

[0079] 使用Rabbit Anti- γ -tubulin (1:400) 做为一抗,使用羊抗兔IgG (FITC标记,1:100) 做为二抗。用2% BSA (PBS配制) 对其分别进行稀释,备用。

[0080] 弃去细胞通透液,PBS清洗3次,每次5min。6孔板中每孔加入2mL5%的脱脂牛奶 (PBS配制) 进行样品封闭,室温放置1h。样品封闭后,将一抗与相应的细胞置于4℃下共同孵育过夜。取出6孔板,弃去一抗,PBS清洗6次,每次5min。再将二抗(荧光素标记)与细胞放置于室温下避光孵育3h。弃去二抗,PBS清洗6次,每次5min,避光操作。

[0081] 7、染核、封片、检测

[0082] 细胞与抗体结合完成后,将1 μ g/mL的DAPI (PBS配制) 与细胞于避光处室温孵育15min,以对细胞核进行染色。弃去DAPI染色液,PBS清洗3次。取15 μ L防荧光淬灭封片剂滴加于盖玻片细胞上,最后将盖玻片倒扣于清洁的载玻片上,完成免疫荧光样品的制备,4℃避光保存。使用激光共聚焦显微镜 (Carl Zeiss) 观察制备好的样品,图像采用ZEN软件进行采集和输出。

[0083] 8、结果如图4所示,其中标尺代表50 μ m。可以看出,无论是细胞核还是 γ -tubulin,两种细胞固定剂均不会影响抗体对目标的检测。NB4的细胞核能够被DAPI染色而呈不规则形状或球状, γ -tubulin由于在细胞质中均有存在,且细胞质包裹住了细胞核,因此Anti- γ -tubulin抗体所标记的位置为细胞核外的细胞部分。DAPI及Anti- γ -tubulin抗体标记的位置应该不同,但能互补成一个完整的球状细胞的形状。从图4可看出,L-抗坏血酸和多聚甲醛固定后,DAPI均能对细胞核进行染色,Anti- γ -tubulin抗体也均能对细胞核外的细胞质部分进行标记,并且两者能够重合组成完整的NB4细胞形状。因此,L-抗坏血酸和多聚甲醛均能较好地对细胞进行固定,且不会影响 γ -tubulin这种细胞骨架蛋白的检测,良好地保存了细胞骨架蛋白的三维结构及抗原活性。

[0084] 实施例三:L-抗坏血酸作为细胞固定剂对原代细胞单抗原检测的影响(星形胶质细胞)

[0085] 大鼠大脑皮层原代细胞爬片上的细胞种类较多,主要包括:星形角质细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞等,其中各种细胞的形态和比例又随着培养时间的不同而有所变化。因此,是否能从这一复杂样品中检测到特定细胞内的抗原,是考察L-抗坏血酸是否适用于免疫荧光实验的一个重要指标。星形胶质细胞是大脑皮层细胞中数量相对较多的一种胶质细胞且形态多样,能够特异表达神经胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein,GFAP),所以GFAP是对其进行定性和定量检测的常用标志物。

[0086] 为了更全面地展示L-抗坏血酸作为细胞固定剂对细胞内单抗原免疫荧光检测的影响,本实施例选择了大鼠大脑皮层原代细胞作为样品。

[0087] 1、准备实验细胞

[0088] 原代培养大鼠大脑皮层星型胶质细胞获得方法:取出生后12h内的新生SD大鼠,20%乌拉坦麻醉后取其大脑皮层组织并剥离掉脑膜和血管。将皮层组织剪碎后放入含有木瓜蛋白酶和DNase I的缓冲液中37℃消化20min,之后轻柔吹打使皮层组织内的细胞分散

开,最后将吹散的皮层组织悬液用200目的细胞筛网过滤,滤液即为包含星型胶质细胞的原代大脑皮层细胞悬液。

[0089] 2、准备试剂

[0090] Neurobasal培养基的配制方法:将Neurobasal medium与MEMmedium按1:1混合,再添加5%胎牛血清、1%B27添加剂、0.5%丙酮酸钠、0.5%葡萄糖和1%双抗。

[0091] 3、培养细胞

[0092] 接种于Neurobasal培养基中,采用二氧化碳培养箱在5%CO₂、37℃的条件下进行贴壁培养。

[0093] 4、制作细胞爬片

[0094] 将圆形盖玻片洗净,高温灭菌后放置于6孔板中。在6孔板中每孔加入2mL的Poly-L-Lysine溶液且没过盖玻片,37℃培养箱中放置24h,使盖玻片表面被Poly-L-Lysine所包被。

[0095] 弃去Poly-L-Lysine溶液,用PBS清洗两遍。将MES23.5细胞种于处理好的6孔板盖玻片上,放入培养箱中培养至细胞长满盖玻片60%区域时,将6孔板取出进行细胞固定。

[0096] 5、固定细胞

[0097] (1) 细胞固定液的配置:

[0098] 实验组:称取L-抗坏血酸固体粉末,溶解于PBS中使其终浓度为100mM。

[0099] 对照组:称取多聚甲醛固体粉末,加热溶解于PBS中得4%多聚甲醛(w/v)。

[0100] (2) 细胞固定:将上述含有细胞爬片的6孔板取出培养箱,弃去培养基,用PBS清洗细胞3次。分别往6孔板中加入2mL 100mM的L-抗坏血酸溶液(实验组)或4%的多聚甲醛溶液(对照组)浸泡细胞爬片以固定细胞,室温下固定30min。

[0101] 6、细胞通透

[0102] 细胞固定完成后,将6孔板中的细胞固定液弃去,加入PBS进行清洗。清洗时将6孔板置于脱色摇床中低速水平震荡,每次5min,清洗3次。弃去PBS,在6孔板中每孔加入2mL 0.2%Triton X-100溶液(PBS配制)进行细胞通透,室温下放置30min。

[0103] 7、样品封闭与抗体结合

[0104] 使用Mouse Anti-GFAP(1:400)做为一抗,使用羊抗小鼠IgG(FITC标记,1:100)做为二抗,用2%BSA(PBS配制)分别对一抗和二抗进行稀释。

[0105] 弃去细胞通透液,PBS清洗3次,每次5min。6孔板中每孔加入2mL5%的脱脂牛奶(PBS配制)进行样品封闭,室温放置1h。样品封闭后,将一抗与相应的细胞置于4℃下共同孵育过夜。取出6孔板,弃去一抗,PBS清洗6次,每次5min。再将二抗(荧光素标记)与细胞放置于室温下避光孵育3h。弃去二抗,PBS清洗6次,每次5min,避光操作。

[0106] 8、染核、封片、检测

[0107] 细胞与抗体结合完成后,将1μg/mL的DAPI(PBS配制)与细胞于避光处室温孵育15min,以对细胞核进行染色。弃去DAPI染色液,PBS清洗3次。取15μL防荧光淬灭封片剂滴加于盖玻片细胞上,最后将盖玻片倒扣于清洁的载玻片上,完成免疫荧光样品的制备,4℃避光保存。使用激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)观察制备好的样品,图像采用ZEN软件进行采集和输出。

[0108] 9、结果如图5所示,其中标尺代表50μm。因为DAPI对细胞核染色并无细胞特异性,

所以大鼠皮层细胞中的所有细胞核均被DAPI标记,呈球状;而星形胶质细胞因特异表达GFAP而被标记,呈星形或放射状。GFAP是一种存在于星形胶质细胞质部位的蛋白,因此免疫荧光照片中,其应被定位于细胞质而非细胞核中。图5显示,使用两种不同固定剂的细胞样品,DAPI与GFAP抗体所标记的部位均不重合(图中灰色箭头所示)。此外,大鼠皮层细胞中除了星形角质细胞外,还存在其它类型的细胞,因此被染色的细胞核数目理论上应多于星形角质细胞的数目。白色箭头所示即为检测到的非星形胶质细胞的其它类型细胞,由于DAPI对细胞核的标记无特异性,而GFAP抗原有特异性,因此白色箭头所示细胞仅被检测到了细胞核。上述结果表明L-抗坏血酸作为一种细胞固定剂适用于原代细胞中特异抗原的检测和定位。

[0109] 实施例四:L-抗坏血酸作为细胞固定剂对细胞双抗原检测的影响

[0110] 上述实施例说明,L-抗坏血酸作为细胞固定剂,无论在细胞系还是在原代培养细胞的免疫荧光实验中均能较好地维持抗原三维结构,从而使其能够被特异抗体识别和检测。但免疫荧光实验中经常需要对两种甚至多种抗原进行同时检测,并且相互之间不得产生干扰。为更好地展示L-抗坏血酸在免疫荧光实验中对两种抗原同时检测的影响(双标记),本实施例选择大鼠原代皮层细胞为样品,经L-抗坏血酸固定后同时检测星形胶质细胞和神经元中的两种特异蛋白。

[0111] 微管相关蛋白2(Microtubule-associated protein 2,MAP2)在神经元中特异表达,在生物学研究中被用来作为成熟神经元的标志物,因此在本实施例中选择MAP2蛋白作为标记神经元的特异抗原。

[0112] 1、准备实验细胞

[0113] 原代培养大鼠大脑皮层星型胶质细胞获得方法:取出生后12h内的新生SD大鼠,20%乌拉坦麻醉后取其大脑皮层组织并剥离掉脑膜和血管。将皮层组织剪碎后放入含有木瓜蛋白酶和DNase I的缓冲液中37℃消化20min,之后轻柔吹打使皮层组织内的细胞分散开,最后将吹散的皮层组织悬液用200目的细胞筛网过滤,滤液即为包含星型胶质细胞和神经元等多种脑部细胞的原代大脑皮层细胞悬液。

[0114] 2、培养细胞

[0115] 将上述细胞悬液接种于Neurobasal培养基中,采用二氧化碳培养箱在5%CO₂、37℃的条件下进行贴壁培养。

[0116] 3、制作细胞爬片

[0117] 将圆形盖玻片洗净,高温灭菌后放置于6孔板中。在6孔板中每孔加入2mL的Poly-L-Lysine溶液且没过盖玻片,37℃培养箱中放置24h,使盖玻片表面被Poly-L-Lysine所包被。

[0118] 弃去Poly-L-Lysine溶液,用PBS清洗两遍。将MES23.5细胞种子于处理好的6孔板盖玻片上,放入培养箱中培养至细胞长满盖玻片60%区域时,将6孔板取出进行细胞固定。

[0119] 5、固定细胞

[0120] (1) 细胞固定液的配置:

[0121] 实验组:称取L-抗坏血酸固体粉末,溶解于PBS中使其终浓度为100mM。

[0122] 对照组:称取多聚甲醛固体粉末,加热溶解于PBS中得4%多聚甲醛(w/v)。

[0123] (2) 细胞固定:将上述含有细胞爬片的6孔板取出培养箱,弃去培养基,用PBS清洗

细胞3次。分别往6孔板中加入2mL 100mM的L-抗坏血酸溶液(实验组)或4%的多聚甲醛溶液(对照组)浸泡细胞爬片以固定细胞,室温下固定30min。

[0124] 6、细胞通透

[0125] 细胞固定完成后,将6孔板中的细胞固定液弃去,加入PBS进行清洗。清洗时将6孔板置于脱色摇床中低速水平震荡,每次5min,清洗3次。弃去PBS,在6孔板中每孔加入2mL 0.2%Triton X-100溶液(PBS配制)进行细胞通透,室温下放置30min。

[0126] 7、样品封闭与抗体结合

[0127] 配制两种一抗。一抗(1):Mouse Anti-GFAP(1:400);一抗(2):Rabbit Anti-MAP2(1:500)。用2%BSA(PBS配制)稀释。

[0128] 配制两种二抗。二抗(1):羊抗兔IgG(TRITC标记,1:100);羊抗(2):小鼠IgG(FITC标记,1:100)。用2%BSA(PBS配制)稀释。

[0129] 弃去细胞通透液,PBS清洗3次,每次5min。6孔板中每孔加入2mL5%的脱脂牛奶(PBS配制)进行样品封闭,室温放置1h。

[0130] 样品封闭后,将两种一抗与相应的细胞置于4℃下共同孵育过夜。取出6孔板,弃去一抗,PBS清洗6次,每次5min。再将两种二抗(荧光素标记)与细胞放置于室温下避光孵育3h。弃去二抗,PBS清洗6次,每次5min,避光操作。

[0131] 8、染核、封片、检测

[0132] 细胞与抗体结合完成后,将1μg/mL的DAPI(PBS配制)与细胞于避光处室温孵育15min,以对细胞核进行染色。弃去DAPI热色液,PBS清洗3次。取15μL防荧光淬灭封片剂滴加于盖玻片细胞上,最后将盖玻片倒扣于清洁的载玻片上,完成免疫荧光样品的制备,4℃避光保存。使用激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)观察制备好的样品,图像采用ZEN软件进行采集和输出。

[0133] 9、结果如图6所示,其中标尺代表50μm。可以看出,星形胶质细胞中的GFAP由于被FITC标记的抗体特异识别,在激光共聚焦显微镜下呈星形或放射状;神经元中的MAP2则被TRITC标记的抗体特异识别,细胞呈神经元特有的长轴突多树突形状;样品中所有细胞的细胞核则被DAPI标记为近球状。实验中,同一样品中的星形胶质细胞与神经元同时被各自荧光标记的特异抗体检测并定位,未发生互相干扰的现象,如箭头所示为Anti-MAP2标记的神经元突起,其仅被定位于神经元细胞。使用激光共聚焦显微镜对不同抗体标记的同一样品分别进行拍照,得到的三幅图片进行Merge后,发现细胞核、星形胶质细胞、神经元均可在同一样品中明显进行区分。因此,L-抗坏血酸作为细胞固定剂完全适用于双标记的免疫荧光实验。

[0134] 实施例五:L-抗坏血酸固定细胞时对细胞通透性的影响

[0135] 如图2所示,常规的免疫荧光实验中,细胞经固定剂固定后,需要对细胞进行通透处理,即在细胞膜上进行打孔,以便所加入的抗体及荧光染料进入细胞内与抗原相结合。而L-抗坏血酸作为细胞固定剂时,本身具有细胞通透的作用,无需额外对细胞进行通透处理。为展示L-抗坏血酸对细胞膜通透性的影响,本实施例以长期培养的大鼠星形胶质细胞为材料,比较L-抗坏血酸与多聚甲醛的效果。

[0136] 1、准备实验细胞

[0137] 长期培养的大鼠星形胶质细胞获得方法:取新生12小时内的SD大鼠幼鼠,麻醉处

死后,取幼鼠大脑皮层,用胰酶分解成单细胞后置于DMEM/F12培养基中培养。待细胞长满培养皿底后,通过多次传代在培养皿内富集星形胶质细胞。

[0138] 2、细胞处理

[0139] 使用实施例四的方法,培养细胞,并对其进行固定,但本实例中不使用细胞通透剂Triton X-100对细胞进行通透处理。其中,DAPI可以通过完整的细胞膜,因此其进入细胞核并进行染色的过程不需要对细胞膜进行通透。但GFAP存在于星形胶质细胞的细胞质中,常规的免疫荧光实验中,需要事先将细胞膜进行通透处理,Anti-GFAP的一抗及二抗才能进入细胞对GFAP标记。

[0140] 3、使用实施例四的方法,进行染核、封片、检测。

[0141] 4、结果如图7所示。在未使用细胞通透剂Triton X-100的情况下,细胞经多聚甲醛固定后,最终的激光共聚焦照片无法对原代星形胶质细胞中的GFAP蛋白进行清晰有效的检测。这表明使用多聚甲醛固定细胞后,细胞膜的完整性没有被破坏,所加入的抗体及荧光素无法进入细胞与抗原结合,因此激光共聚焦显微镜无法检测到GFAP蛋白。同样在未使用细胞通透剂的情况下,细胞经L-抗坏血酸固定后,激光共聚焦显微镜能够清晰地显示出星形胶质细胞的GFAP。且GFAP所在的细胞质部位与DAPI所染色的细胞核在分布上并不重合,而是共同互补显示出一个完整细胞的,这与理论上的情况相符。这表明,使用L-抗坏血酸在对细胞进行固定的同时,会一定程度地破坏细胞膜的完整性,使抗体能够进入到细胞内部与抗原特异结合。

[0142] 上述现象表明,L-抗坏血酸作为细胞固定剂用于细胞免疫荧光实验,不仅可固定细胞,还可通透细胞膜,能同时替代传统方法中多聚甲醛(细胞固定剂)和Triton X-100(细胞通透剂)两种试剂。

[0143] 因此,使用L-抗坏血酸作为细胞固定剂进行免疫荧光实验时,不需要再额外使用细胞通透剂。

[0144] 实施例六:不同溶剂溶解L-抗坏血酸,固定和通透细胞的效果

[0145] 1、按实施例五的方法,准备试剂,制作细胞爬片3组。

[0146] 2、固定细胞

[0147] (1) 细胞固定液、通透剂的配置:

[0148] 称取等量的L-抗坏血酸固体粉末,分为3组,分别溶解于PBS、水和生理盐水中,使各组的终浓度为100mM。

[0149] (2) 按照实施例五的方法,对细胞分别进行固定,不进行通透处理。

[0150] 3、按实施例五的方法,对各组细胞分别进行染核、封片、检测。

[0151] 4、各组结果与图7的结果相当,使用不同溶剂配制的L-抗坏血酸溶剂,对细胞的固定作用和通透作用无影响,均能实现发明目的。结果表明,将L-抗坏血酸应用于细胞免疫荧光实验时,所选溶剂几乎无影响,凡是能够溶解L-抗坏血酸,且对待固定的细胞无毒无害,不影响其存活的试剂,都可以采用。

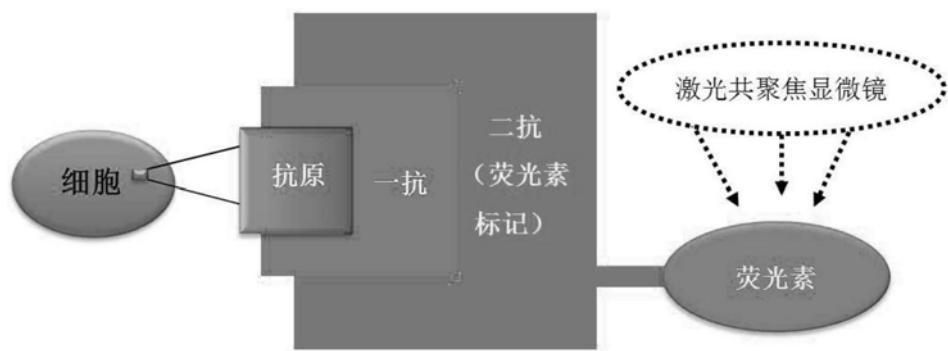


图1

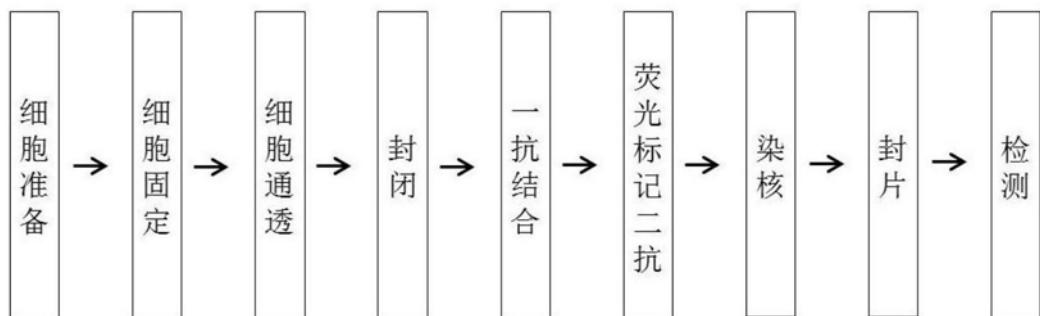


图2

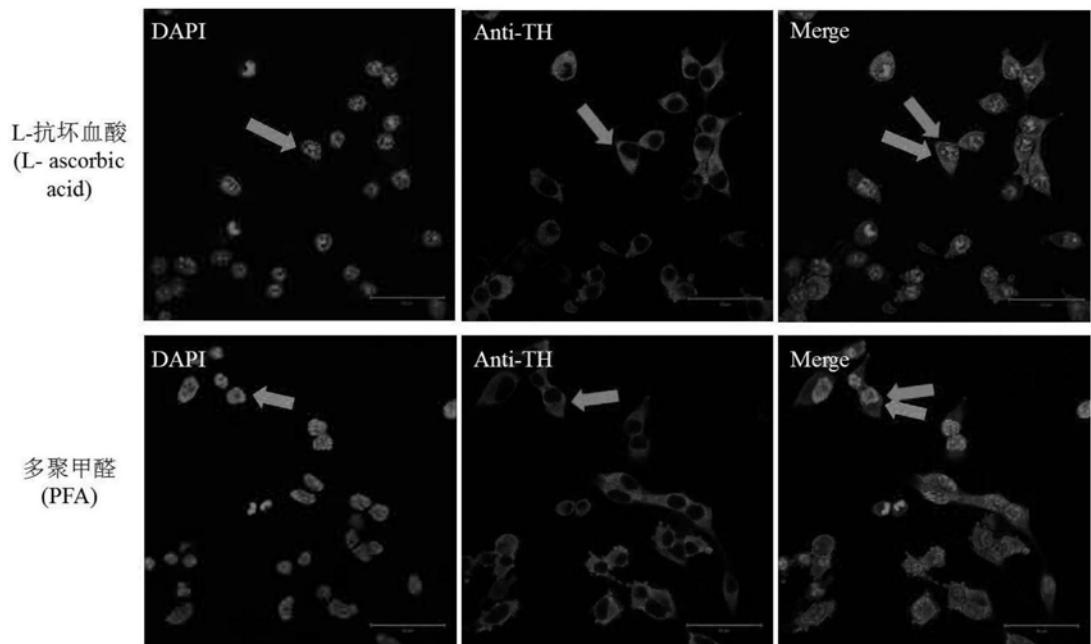


图3

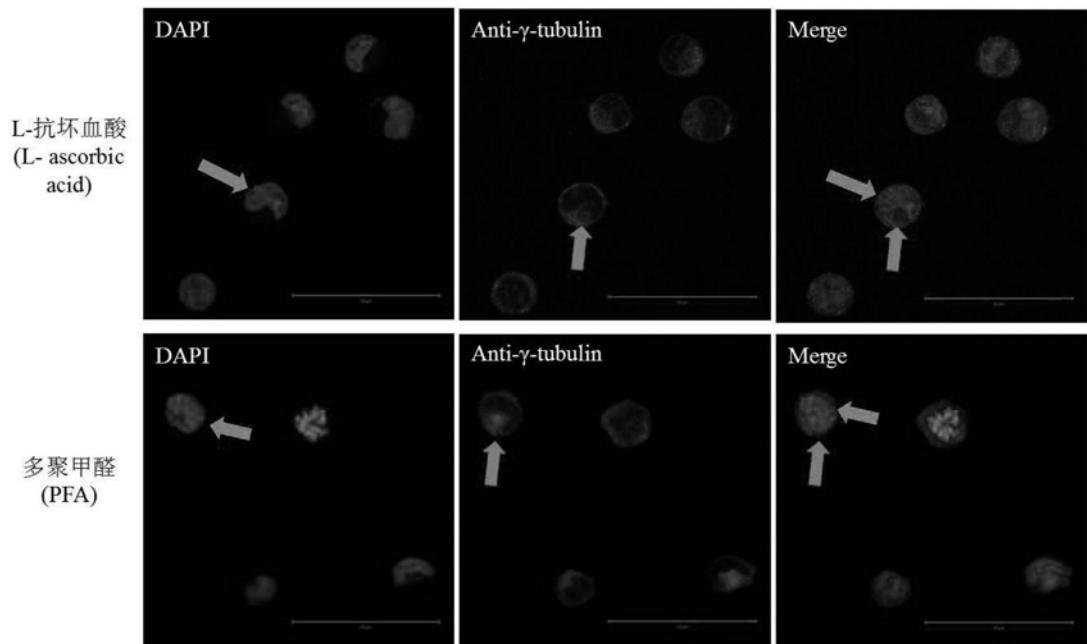


图4

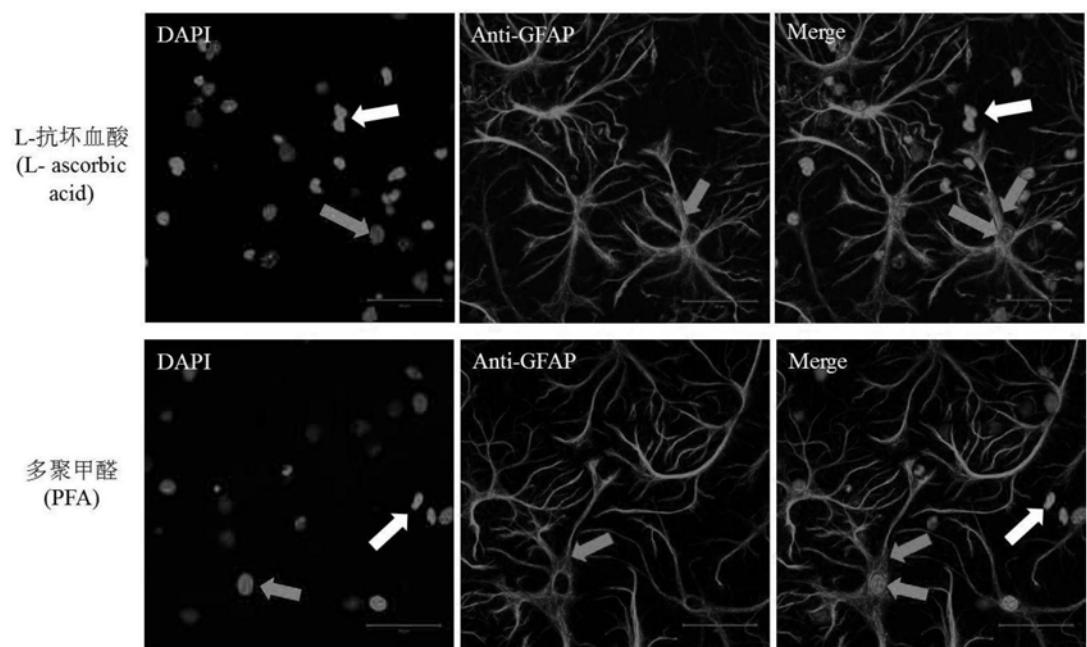


图5

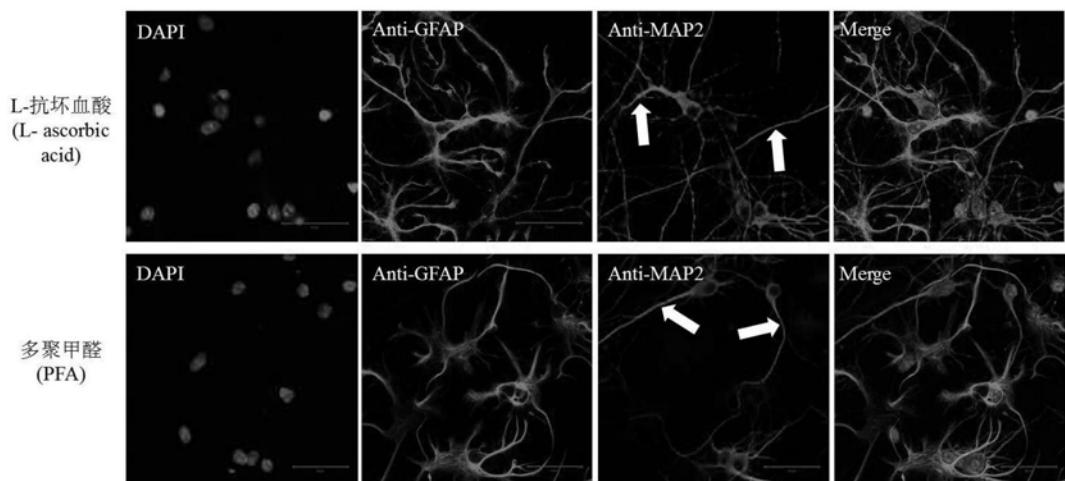


图6

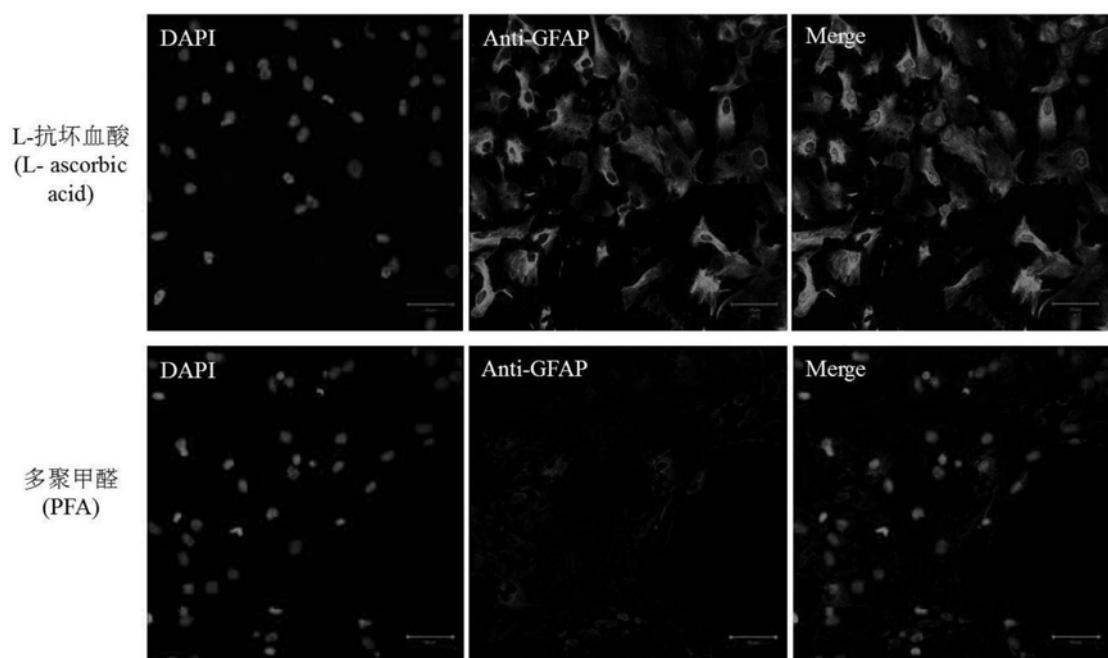


图7

专利名称(译)	一种新型细胞固定剂		
公开(公告)号	CN108169474A	公开(公告)日	2018-06-15
申请号	CN201810028580.3	申请日	2018-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院成都生物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院成都生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院成都生物研究所		
[标]发明人	胡亚东 刘静 淳泽 赵若茜 郑世刚		
发明人	胡亚东 刘静 淳泽 赵若茜 郑世刚		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	刘坤		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种新型细胞固定剂。采用的技术方案是：将L-抗坏血酸作为一种新型细胞固定剂，应用于免疫荧光技术。本发明首次报道了L-抗坏血酸可以作为细胞固定剂对细胞进行固定。经L-抗坏血酸固定的细胞不仅能完整地保持形态和结构，还可以很好地保存其抗原形态，有利于与相应抗体的进行特异结合。同时，L-抗坏血酸还可对细胞进行一定的通透处理，固定细胞时不需额外添加细胞通透剂。而且，L-抗坏血酸本身无毒无害，易溶于水中，配制及使用过程简单、快速、环保，无有毒有害物质产生。

