

肿瘤细胞中表达的 GFP 蛋白的荧光漂白特性的研究

金 鹰, 邢 达*

华南师范大学, 激光生命科学省重点实验室, 广东 广州 510631

摘 要 GFP 作为生物源性荧光探针具有其他荧光标记物所无法比拟的优势, 目前已广泛应用于生物学研究的各个领域。利用常规转染方法将带有 EGFP 基因的质粒载体导入人肺腺癌肿瘤细胞 (ASTC-a1), 并得到 GFP 稳定表达的细胞株。研究中发现, 肿瘤细胞中表达的 GFP 长时间暴露于强激发光中会发生非常强烈的荧光漂白作用, 并且这种漂白作用是不可恢复的。对不同强度的激发光 (饱和光源、阻断片 ND4/ND8/ND16) 对 GFP 的漂白作用进行了研究, 并对冷冻保存样品的光漂白作用进行了初步的探讨。

主题词 绿色荧光蛋白 (GFP); 人肺腺癌细胞; 光漂白

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2004)12-1626-04

随着对基因的表达调控、蛋白质在活细胞自然状态下的变化等重要问题研究的深入, 迫切需要一种操作简便、不用加外源底物, 就能在活细胞中检测的分子探针, 来自水母 (*Aequorea Victoria*) 的绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 及其突变体能在多种细胞中表达, 可以作为一种独特的分子探针, 用于追踪研究活细胞及其细胞器内所发生的动力学过程^[1], GFP 的发现给这些应用带来了方法学上的革命。

虽然 GFP 在分子生物的众多研究领域有着广泛的应用, 但目前看来仍有其不足: (1) 检测灵敏度还有待提高, 而且其荧光信号强度方面的非线性性质使得定量较为困难; (2) 紫外激发对某些 GFP 有光漂白和光破坏作用, 导致荧光信号快速丧失; (3) 多数生物具有微弱的自发荧光现象, 并有着类似的激发和发射波长, 这个荧光背景会影响某些 GFP 的检测。

光漂白 (Photobleaching) 指在光的照射下荧光物质所激发出来的荧光强度随着时间推移逐步减弱乃至消失的现象。荧光物质的光漂白是我们利用荧光法诊断肿瘤时必须考虑的一个重要问题。在肿瘤诊断的图像系统中, 光漂白的存在减少了肿瘤荧光图像的对对比度; 在非图像系统 (光谱分析和比率检测) 中, 光漂白的存在降低了诊断系统的灵敏度^[2]。虽然 GFP (尤其是它的几个突变型) 具有较强的抗光漂白特性^[3], 但在相关的文献中并未作详细的阐述。为此, 本研究对肿瘤细胞内表达的 GFP 在激发光照射下的光漂白特性、不同激发光强度照射对 GFP 光漂白的影响、光漂白后的荧光恢复以及 -20℃ 保存的细胞样品的光漂白进行分析, 以期对活细胞中表达的 GFP 蛋白的荧光特性有进一步的了解。另外, 实

验中采用突变型 EGFP, 克服了紫外激发的强漂白和光破坏作用, 并得到高效、稳定表达的肿瘤细胞株, 解决了自发荧光背景对检测的影响。

1 材料和方法

1.1 质粒扩增及纯化

质粒表达载体 (pEGFP-C1) 购自 Clontech 公司, 宿主菌 (DH5) 购自德国公司, 按常规方法^[4]制备感受态细胞并进行细菌转化。质粒纯化试剂盒购自 Life technologies 公司 (Concert high purity plasmid miniprep), 纯化过程参照各自的操作指南进行。

1.2 细胞培养及转染

细胞培养液为 RPMI 1640 (GIBCO/BRL), 添加 10% FCS (GIBCO/BRL)、2 mmol 谷氨酰胺 (Glutamine), 25 mmol HEPES, 100 units \cdot mL⁻¹ 青霉素和 100 μ g \cdot mL⁻¹ 链霉素。进行转染时, 将 30% ~ 50% 汇聚的肿瘤细胞与 Lipofectin reagent (Life technologies inc.) 和足量质粒载体的悬浮液共培养 6 h, 之后补充适量新鲜培养液。转染 48 h 后用 0.25% Trypsin 收集细胞, 以 1:15 比例在选择性培养基 (1 000 μ g \cdot mL⁻¹ G418, GIBCO/BRL) 进行选择培养。

1.3 筛选稳定高表达的细胞株

经 20 d 选择培养, 形成数十个 G418 抗性克隆, 于倒置荧光镜 (Leitz) 下观测 GFP 表达情况, 共筛选出 3 个 GFP 阳性细胞株, 用毛细管将 GFP 阳性克隆从培养液中分离出来, 注意不能混有其他 G418 抗性的细胞。

1.4 荧光成像系统

待测细胞培养于盖玻片上, 观测前封片处理。观测系统

收稿日期: 2003-04-16, 修订日期: 2003-09-26

基金项目: 国家重大基础研究前期研究专项 (2002CCC00400) 及广东省自然科学基金团队项目 (015012) 资助

作者简介: 金 鹰, 1967 年生, 华南师范大学激光生命研究所在职博士 * 通讯联系人

采用配备汞光源和配套滤镜系统的 Nikon 荧光显微镜 (E-CLIPSE E600) 及 Nikon 数码相机 (CoolPix 995), 滤光块选用 B-2E (EX 450-490, DM 506, BA 520-569)。

1.5 图像量化处理

图像处理采用 Matlab 5.3 和 Origin 5.0 软件进行。

2 结果

2.1 GFP 阳性细胞株的筛选

携带有 Neomycin 抗性基因的质粒载体经扩增和纯化后可以有效地传染人类肺腺癌细胞株。在添加 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ G418 抗生素培养液中进行筛选培养, 得到数十个 G418 抗性克隆可在选择性培养基中正常生长, 经荧光显微镜检测确定 3 株有较强的荧光产生, 并且荧光在各细胞间分布均匀, 标

记基因表达的稳定性较高。经 2 个多月的传代培养, 未发现标记丢失及表达减弱的现象, 光镜下细胞位置与荧光成像细胞完全对应 (见图 1)。

2.2 正常培养肿瘤细胞中 GFP 的光漂白

取适量肿瘤细胞培养于盖玻片上, 生长到一定程度后封片直接置于荧光显微镜下进行成像, 激发光持续照射, 间隔 25 s 成像一次, 连续拍摄 15 张, 此时荧光已相当黯淡, 肉眼已经很难观测到荧光信号, 因此在图 2 中显示了第 1, 4, 7, 10 张照片的荧光成像, 并利用 Matlab 软件对相应照片的荧光图像进行处理, 得出荧光强度的等高线图。曝光条件为: 快门, 8 s; 光圈, 10.5, ISO 100。用 Matlab 对两组照片中每个像素的光强度进行累加处理, 数据通过 Origin 软件处理得到光漂白曲线 (见图 3)。



Fig. 1 The images of tumor cells transfected EGFP under fluorescence and light microscopy (20 \times)

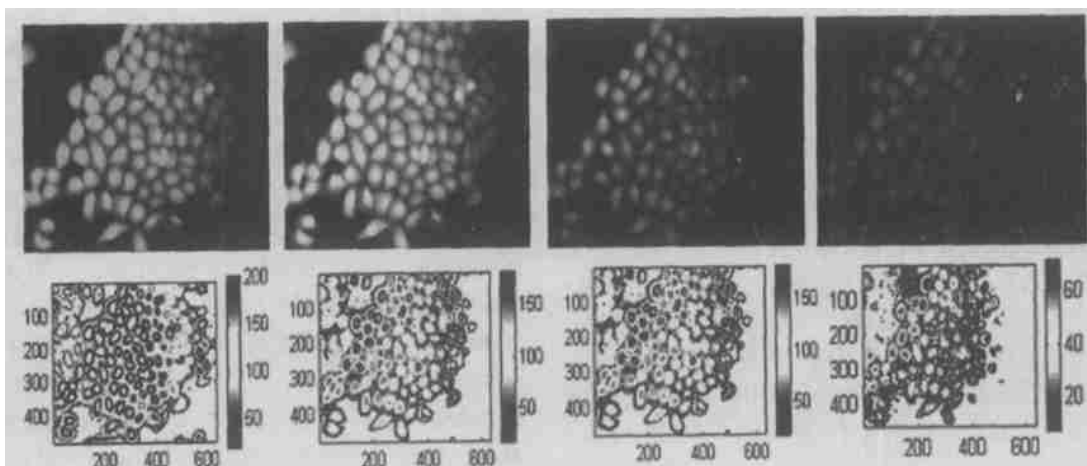


Fig. 2 The 1st, 4th, 7th and 10th ones from a series of fluorescence images of tumor cells transfected EGFP
The contour picture quantifies the fluorescence intensity of pixels in the corresponding image

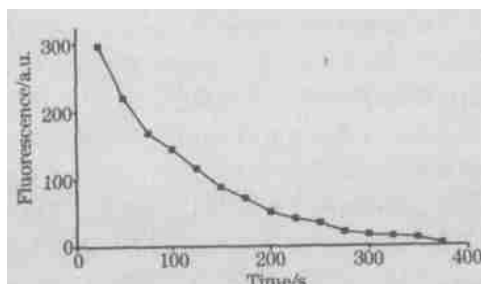


Fig. 3 The fluorescence photobleaching of tumor cells expressed GFP under intense irradiation

2.3 不同强度激发光对肿瘤细胞中表达的 GFP 光漂白的影 响

较强的激发光 (全光源激发) 对 GFP 具有非常强烈的光漂白作用, 因此本实验利用中性阻断片 (ND4, ND8, ND16) 降低激发光的强度, 检验不同强度的激发光对 GFP 光漂白作用的影响 (见图 4)。成像条件: 快门, 8 s; 光圈, 4.7; ISO 100。

2.4 肿瘤细胞中表达的 GFP 蛋白的光漂白恢复

GFP 蛋白经激发光激发后其发色基能否可逆的恢复其

荧光特性对实际应用有相当的意义,本实验对不同时间长度(30, 60, 120 s)的全光源激发后 GFP 的荧光强度进行分析(见图 5),为减低二次漂白的影 响,曝光条件设定为:快门, 1/2 s;光圈, 4.6;ISO 400。

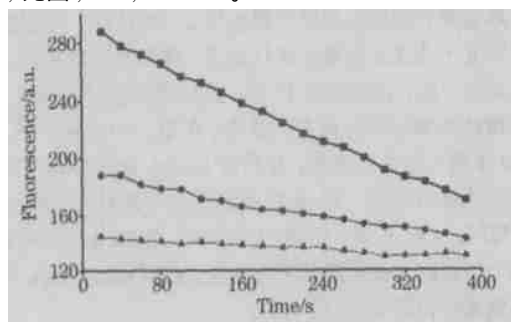


Fig. 4 The fluorescence photobleaching of tumor cells expressed GFP by different intensity of excitation
— —, ND4; — —, ND8; — —, ND16

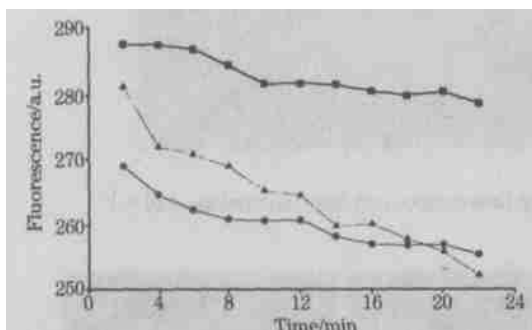


Fig. 5 The fluorescence recovery of GFP expressed in tumor cells after different time of irradiation
— —, 30 s IR; — —, 60 s IR; — —, 120 s IR

2.5 冰冻保存样品中 GFP 的荧光漂白特性

考虑到相关实验中对冰冻切片样品中的 GFP 进行检测,本实验将表达 GFP 的肿瘤细胞置于 -20°C 保存一星期后,在荧光显微镜下观察 GFP 的荧光漂白特性是否发生改变。为保持细胞膜的完整,细胞封片前培养液中添加 20% DMSO 防冻保护液(=1:1)。曝光条件:快门, 1 s;光圈, 4.6;ISO 100。

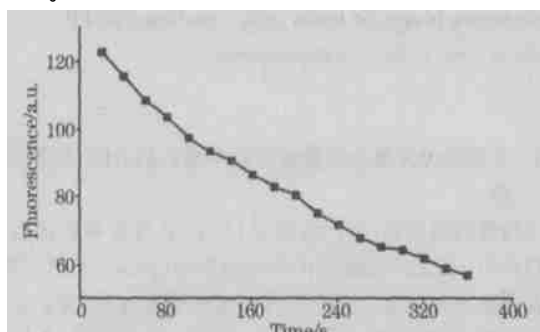


Fig. 6 The photobleaching of GFP expressed in tumor cells after 7 days in -20°C storage

3 讨论

GFP 用作报告基因,在基因转染和表达研究方面有非常广泛的用途,不用破碎细胞和外加底物,通过荧光显微镜就能显示目的基因在细胞中的表达情况,然后克隆扩大培养,通过这种方法挑选稳定表达的细胞系,简单快捷^[5]。本实验利用脂质体转染试剂 Lipofectin reagent 将带有 EGFP 基因的质粒载体导入人肺腺癌细胞株,早期实验中获得阳性细胞株能够表达 GFP 并可观察到强烈的激发荧光,但经过多次传代后阳性细胞率和荧光强度都显著下降^[4],可能的影响因素包括:外源基因是否成功整合到宿主细胞的基因组中,整合位点处的表达效率如何,筛选过程中是否掺杂有 G418 抗性的非表达细胞。目前使用的细胞株由改进的方法获得,经长期传代培养(超过 3 个月)仍保持了与原体细胞相类似的阳性细胞率和荧光特性(见图 1)。以此细胞株为实验材料,进一步研究了肿瘤细胞中活体表达的 GFP 的荧光漂白特征。

荧光成像的质量很大程度上依赖于荧光信号强度,提高激发光强度固然可以提高信号强度,但激发光的强度不是可以无限提高的,当激发光的强度超过一定限度时,光吸收就趋于饱和,并不可逆地破坏激发态分子,这就是光漂白现象^[6]。早期研究表明, GFP 具有很强的抗光漂白能力,特别是利用第二激发峰进行激发时,其发色基具有相当高的稳定性^[7,8]。并且在不同的物种或不同组织中表达的 GFP 具有不同的光漂白稳定性^[1,7]。

我们在实验中发现,较强的激发光和较长的激发时间会对 GFP 产生非常强烈的光漂白作用,当全光源激发时间达到 6 min 时, GFP 的荧光基本消失(见图 2)。对于流式细胞株而言,光漂白问题并不严重,因为光源照射细胞的时间很短;但对于荧光显微镜等来说,当光源长时间照射样品时,光漂白现象就会非常严重。解决光漂白问题最直接的办法是提高测量的灵敏度,以降低激发光的强度^[6,9]。因此,我们在实验中使用不同的阻挡片(ND 4, ND 8, ND 16)对全光源进行衰减,很显然,随着激发光的减弱,其对 GFP 的光漂白作用也明显降低(见图 4)。当然,在这种情况下, GFP 的初始荧光强度也会相应下降,由于实验中使用的细胞株 GFP 的表达量相当高,因此对我们的检测并没有产生很大的影响。

GFP 分子在经过激发光照射后发色基是否遭到不可逆的破坏是我们关心的另一个问题,实验中对表达 GFP 的细胞进行不同时间长度的全光源激发(30, 60, 120 s),之后每隔 2 min 对相同视野进行快速成像,记录荧光强度是否得到恢复(见图 5)。结果表明,各组细胞的荧光强度均呈现下降趋势,起始激发时间越长,荧光强度下降越快,而且这种下降基本上是由二次漂白造成的。经漂白的细胞在第二天观测其荧光强度基本没有变化(未显示结果),说明了荧光漂白的不可恢复性。正是利用荧光分子的这种特性,有研究者发明了光漂白后荧光恢复实验(Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)和光漂白荧光损失实验(Fluorescence Loss In Photobleaching, FLIP),利用强激发光将一微小区域荧光

分子进行不可逆漂白,之后用弱激发光观测周围荧光分子向光漂白区域的扩散,研究被标记分子的动力学变化^[10]。

细胞样品在低温(-20℃)保存1周后,其抗荧光漂白的能力有明显改善,经全光源6 min 激发后,荧光强度虽有明

显下降(见图6),但与图2比较仍能维持较高水平,表明细胞内外的环境条件对GFP的抗光漂白能力有明显的影响,如pH值、氧化还原剂等,具体原因有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al. *Science*, 1994, 263(5148): 802.
- [2] LI Bur-hong, XIE Shu-sen, LU Zu-kang(李步洪, 谢树森, 陆祖康). *Chin. J. Laser Med. Surg.* (中国激光医学杂志), 2001, 10(3): 151.
- [3] Wang S, Hazelrigg T. *Nature*, 1994, 369: 400.
- [4] JIN Ying, XING Da(金 鹰, 邢 达). *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 2002, 29(6): 942.
- [5] Ogawa H, Inouye S et al. *Prec. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92(25): 11899.
- [6] LI Nan, WANG Feng-xiang, ZHOU Chun-xi(李 南, 王凤翔, 周春喜). *Applied Technology of Fluorescent Probe*(荧光探针应用技术). Beijing: Military and Medical Science Publishing Company(北京: 军事医学科学出版社), 1998.
- [7] Wang S, Hazelrigg T. *Nature*, 1994, 369: 400.
- [8] Niswender K D, Blackman S M, Rohde L et al. *J. Microbiol.*, 1995, 180(2): 109.
- [9] YU Chang-qing, HUANG Nai-yan, ZHAO Hai-ying, DOU Xiao-ming, LI Jia-ze(于常青, 黄乃艳, 赵海鹰, 窦晓鸣, 李家泽). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 138.
- [10] Lauf U, Giepmans B G. *Prec. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(16): 10446.

Photobleaching Properties of GFP Expressed in Human Lung Cancer Cells

JIN Ying, XING Da*

Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract The characteristic properties of GFP make this protein a good candidate for use as a molecular reporter to monitor patterns of protein localization, gene expression, and intracellular protein trafficking in living cells. In this study, the dicistronic expression vector (pEGFP-C1) was used to be transfected into human lung cancer cell line (ASTC-a-1) and a positive clone which stably expressed GFP in high level was obtained. The results showed that the green fluorescent protein expressed in tumor cells was also photobleached under intense irradiation (-488 nm) and the degree of photobleaching varied with the intensity of the excitation. In order to analyze the effect of low temperature on the fluorescent sample, the photobleaching of tumor cell slice stored at -20℃ was observed additionally.

Keywords Green Fluorescent Protein (GFP); Human lung cancer cells; Photobleaching

(Received April 16, 2003; accepted Sep. 26, 2003)