

PKH26 和 Hoechst 33258 联合示踪 Uncv 无毛小鼠 *iRhom2* 及其突变体蛋白

游颖¹, 陈丙波^{1*}, 曾林^{2*}

(1. 第三军医大学实验动物中心, 重庆 400038; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 利用 PKH26 和 Hoechst 33258 联合示踪 Uncv 无毛小鼠 *iRhom2* 及其突变体蛋白在 Vero 细胞中的定位。**方法** 用 PKH26 对细胞膜进行染色, 同时用 Hoechst 33258 染料对细胞核进行染色, 置于激光共聚焦显微镜下观察。**结果** 通过激光共聚焦荧光显微镜观察目的蛋白, 发现野生型 *iRhom2* 分布在细胞的胞浆, 而 *iRhom2*^{mut} 于细胞浆内和细胞核内都存在。**结论** 亚细胞定位的不同推测到 *iRhom2* 的 N 末端缺失突变可能对其细胞内的定位有影响。

【关键词】 PKH26; Hoechst 33258; *iRhom2*; 定位

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0040-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 08. 008

PKH26 combined with Hoechst 33258 to trace the *iRhom2* gene and its mutant proteins of Uncv mice in Vero cells

YOU Ying¹, CHEN Bing-bo^{1*}, ZENG Lin^{2*}

(1. Laboratory Animal Center, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Laboratory Animal Center, the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To determine the localization of *iRhom2* and its mutant proteins of Uncv mice in Vero cells by PKH26 combined with Hoechst 33258 staining. **Methods** The cell membrane was stained with PKH26, and the nuclei were stained with Hoechst 33258 dye, and observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** It was found that wild *iRhom2* was distributed in the cytoplasm, and its *iRhom2*^{mut} was present both in cytoplasm and cell nuclei. **Conclusions** The results of our study suggest that a deletion in N-terminal of *iRhom2* affects its subcellular localization.

【Key words】 PKH26; Hoechst 33258; *iRhom2*; localization; Vero cells; Subcellular localization; Uncv mice

军事医学科学院实验动物中心在国内首次发现并成功培育成群的被毛突变小鼠。该被毛异常是由位于常染色体上的单基因突变所引起, 呈不完全显性遗传^[1-3]。通过基因连锁分析最终确定突变基因位于小鼠 11 号染色体的 D11mit338 和

D11mit337 之间, 并通过基因组扫描方式定位了突变基因 *iRhom2*^[4]。UNCV 无毛突变系小鼠的 *iRhom2* 基因的 N 端 309 bp 的缺失, 导致了无毛性状的产生^[5,6]。本课题组前期构建了稳定表达 Uncv 无毛小鼠 *iRhom2* 及其突变体 *iRhom2*^{mut} 蛋白

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(31030058); 国家科技支撑计划(2011BA115B03)。

【作者简介】 游颖(1990 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物分子遗传。E-mail: youying0723@163.com

【通讯作者】 陈丙波(1964 -), 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: chenbb81@126.com; 曾林(1965 -), 男, 研究员, 博士生导师。E-mail: zenglin1965@126.com

的细胞系。在此基础上,本研究采用 PKH26 和 Hoechst33258 联合标记野生型 iRhom2 及 iRhom2^{mut} 的稳定细胞系,通过激光共聚焦荧光显微镜观察目的蛋白的定位情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

细胞膜荧光染料 PKH26 和 Hoechst 33258 细胞核荧光染料均购自美国 Sigma 公司;PBS 购自 Sigma 公司;DMEM 细胞培养基购自 Hyclone 公司;激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PKH26 对细胞膜的染色

胰酶消化细胞形成单细胞悬液;用 DMEM 培养基将细胞洗涤(确保所有操作都在 25℃ 进行);400 rpm 离心 5 min 将细胞团离散开;弃掉上清液,剩余的上清液需小于 25 μL;加入 1 mL 的稀释液,使细胞重新离散;在无菌 EP 管中,用无水乙醇在 25℃ 条件下对 PKH26 染色液进行稀释;快速将细胞和 PKH26 染料混合起来;25℃ 下进行孵育 1~5 min,偶尔摇晃保证其充分混匀;以 1:1 的体积比,加入血清使其正常的反应停止,终止反应时间为 1 min;加入等量的含血清的细胞培养基对中止反应液进行稀释;400 rpm 转 25℃,离心 10 min 后,弃掉离心后的上清;细胞团转入新试管中,进一步洗三次;加 10 mL 细胞培养液,离心,把细胞悬浮至所需要的浓度。

1.2.2 Hoechst 33258 对细胞核的染色

将制备得到的细胞悬液,用醋酸-乙醇固定;用

0.01 mol/L 缓冲液洗涤 5 min;将 Hoechst 33258 染色液配制为工作浓度,在常温下使其与细胞作用 15 min,从而对细胞核进行染色;0.01 mol/L 缓冲液洗涤 3 次,一次约 5 min;将染色好的细胞加入 confocal 皿中,并滴加少量的 PBS,在激光共聚焦荧光显微镜下观察。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察

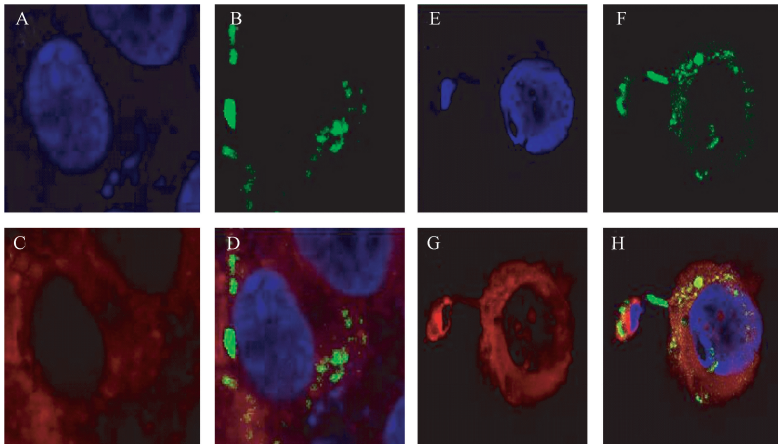
对扫描参数进行设置,这主要包括对 Mode 和 Channel 两种模式的设置。在 Mode 模式下,可以转换镜头,扫描分辨率、速度,选择扫描范围,设置扫描范围复位。进行完相应设置后,开始扫描图像,最后将得到的图片保存备用。

2 结果

PKH26 在波长为 551 nm 的激发光作用下发出红色荧光,Hoechst 33258 在波长为 340 nm 的激发光作用下发出蓝色荧光。在激光共聚焦荧光显微镜下观察,发现野生型组可见到绿色荧光弥漫于红色荧光,突变型组绿色荧光广泛分布于红色荧光中,但在蓝色荧光中也出现少许。提示野生型 iRhom2 分布于细胞浆中,iRhom2^{mut} 分布于细胞浆和细胞核内。(见图 1)

3 讨论

为了确保细胞的正常生理活动,其特定蛋白的合成以及运输都是既定的^[7]。所以,有差别的蛋白质往往分布于细胞的不同部位,它们必须在特定的部位发挥的特定功能。



注:(A,E)Hoechst 33258 染色;(B,F)GFP-蛋白;(C,G)PKH26 染色;(D,H)merge。

图 1 野生型 iRhom2 和 iRhom2^{mut} 蛋白的亚细胞定位

Note. (A,E)Hoechst 33258-stained;(B,F)GFP-Protein;(C,G)PKH26-stained;(D,H)merge.

Fig.1 Subcellular localization of wild iRhom2 and mutant iRhom2 proteins in the Vero cells

蛋白质的亚细胞定位是研究其功能的重要手段,特别是对大型基因组序列的分析来说,一个全自动而且又可靠的蛋白质亚细胞定位预测系统是必要的。预测蛋白定位的途径:一是基于蛋白的 N 端信号的识别,另一个是基于氨基酸的组成^[8,9]。

PKH26 染色液能对多种细胞(动植物细胞和其他胞膜)进行有效标记,同时对细胞的生存活力没有影响,基于此,PKH26 多用于研究细胞的增殖、迁移等^[10-12]。而 Hoechst 33258 核染色液可以经过牢固的细胞膜,从而与 DNA 结合。由于 Hoechst 33258 在 461 nm 处发出靛蓝色的荧光,因此 Hoechst 多被用来标记活细胞的细胞核。由于有效结合 DNA 后,会干扰 DNA 复制以及细胞分裂,所以该染料具有导致癌症和畸形的风险^[13-15]。

本研究采用 PKH26 与 Hoechst 33258 联合染色研究 iRhom2 蛋白的细胞内定位。发现野生型 iRhom2 蛋白位于胞浆,iRhom2^{mut}位于胞浆和胞核。根据本实验结果,预测 iRhom2 的 N 端缺失影响其亚细胞定位。然而,从软件预测结构来看,该缺失突变不影响其亚细胞定位。原因可能是因为 iRhom2^{mut}有小部分转移到了细胞核上,或者 iRhom2^{mut}的亚细胞定位在不同的组织或者细胞类型中是不一样的。同时,iRhom2^{mut}突变基因可能有新功能,通过调节信号通路影响其亚细胞定位,但其具体的机制,有待于后续的探索。

参考文献:

[1] Comisford R, Lubbers ER, Householder LA, et al. Growth hormone receptor antagonist transgenic mice have increased subcutaneous adipose tissue mass, altered glucose homeostasis and no change in white adipose tissue cellular senescence [J]. Gerontology, 2016, 62(2): 163-172.

[2] Li SR, Wang DP, Yu XL, et al. Uncv (uncovered): a new mutation causing hairloss on mouse chromosome 11 [J]. Genet Res, 1999, 73(3): 233-238.

[3] Hassab-El-Naby HM, Tam S, White WL, et al. Mixed tumors of the skin: a histological and immunohistochemical study [J]. Am J Dermatopathol, 1989, 11(5): 413-428.

[4] Foster HL, Small JD, Fox JG, et al. The Mouse in Biomedical Research: Normative biology, immunology, and husbandry [M]. Academic Press, 1982.

[5] Botchkarev VA, Eichmüller S, Johansson O, et al. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin [J]. J Comp Neurol, 1997, 386(3): 379-395.

[6] Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010, 45(2): 146-169.

[7] Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, et al. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals [J]. Bioinformatics, 2002, 18(2): 298-305.

[8] Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization [J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(1): 34-36.

[9] Ohno H, Stewart J, Fournier M C, et al. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins [J]. Science, 1995, 269(5232): 1872-1875.

[10] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma [J]. Cytometry Part A, 2010, 77(6): 502-514.

[11] Li T, Zheng J, Xie Y, et al. Transplantable neural progenitor populations derived from rhesus monkey embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(9): 1295-1303.

[12] Lee-MacAry AE, Ross EL, Davies D, et al. Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide [J]. J Immunol Methods, 2001, 252(1): 83-92.

[13] Orozco A F, Jorgez C J, Horne C, et al. Membrane protected apoptotic trophoblast microparticles contain nucleic acids: relevance to preeclampsia [J]. Am J Pathol, 2008, 173(6): 1595-1608.

[14] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Biomaterials, 2008, 29(15): 2378-2387.

[15] Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells [J]. Gastroenterology, 2008, 135(1): 234-243.

[收稿日期] 2016-12-27