

细胞和组织中两种线粒体标记方法的比较*

龙丹, 周彦妮, 冯莉, 李胜富[△]

四川大学华西医院 卫生部移植工程与移植免疫重点实验室(成都 610041)

【摘要】目的 比较探针和抗线粒体蛋白抗体标记细胞及组织中线粒体的效果, 为相关研究选取适合的标记方法提供参考。**方法** 在经体积分数4%多聚甲醛固定的HepG2细胞中, 分别使用100 nmol/L MitoTracker Deep Red探针和抗葡萄糖调节蛋白75(Grp75)抗体标记线粒体; 在经体积分数4%多聚甲醛固定的HeLa细胞中, 分别使用75 nmol/L、100 nmol/L MitoTracker Deep Red探针和抗Grp75抗体标记线粒体; 取人肝组织冰冻切片, 经4%多聚甲醛固定后, 分别使用150 nmol/L MitoTracker Deep Red和抗Grp75抗体标记线粒体。共聚焦显微镜下观察。**结果** MitoTracker Deep Red探针标记细胞线粒体的效果不如抗Grp75抗体标记清晰, 且在HeLa细胞中有非特异性染色, 抗体标记可更清楚地反映线粒体的点状和管状分布; 在组织中MitoTracker Deep Red探针标记的单个细胞更均匀, 标记线粒体的特异性更高, 效果优于抗体染色。**结论** 在细胞中使用抗Grp75抗体标记线粒体效果更好, 能直观反映线粒体的分裂融合状态; 在组织中使用MitoTracker Deep Red染色效果更佳。

【关键词】 线粒体 MitoTracker Deep Red 葡萄糖调节蛋白75 探针

Comparison Between Different Mitochondrial Staining Methods in Cell and Tissue Samples LONG Dan, ZHOU Yan-ni, FENG Li, LI Sheng-fu[△]. Key Laboratory of Transplant Engineering and Immunology of the Ministry of Health, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: lishengfu@126.com

【Abstract】 Objective To compare the effects of mitochondria staining between specific mitochondrial fluorescent probes and anti-mitochondrial protein antibody in cell and tissue samples. **Methods** The HepG2 cells fixed by 4% paraformaldehyde were stained with MitoTracker Deep Red (100 nmol/L) or anti-Grp75 antibody (75 nmol/L or 100 nmol/L). The human healthy liver tissue samples fixed by 4% paraformaldehyde were stained with 150 nmol/L MitoTracker Deep Red or anti-Grp75 antibody. The above stained cell and tissue samples were observed using confocal microscopy. **Results** We found non-specific staining in HeLa cells and obscure mitochondrial image using MitoTracker Deep Red probes, while clear tubular and punctate distribution using anti-Grp75 antibody. In contrast, we observed more specific and better effects of MitoTracker Deep Red probes-stained liver tissue samples as compared to the antibody. **Conclusion** To visualize mitochondria, the anti-Grp75 antibody staining worked better on cells and the MitoTracker Deep Red probes are more suitable for tissue samples.

【Key words】 Mitochondria MitoTracker Deep Red Grp75 Probe

线粒体作为细胞中唯一的半自主细胞器, 参与细胞多种重要的信号通路, 它的功能与自身的形态和分布密切相关^[1]。已有研究显示: 凋亡发生过程中, 线粒体的分裂融合平衡被打破, 倾向于分裂, 线粒体更多呈点状分布^[2-5]; 且凋亡细胞中, 线粒体募集到核周^[6]; 在小鼠出生前后, 心肌细胞线粒体融合增加以适应出生后氧浓度的变化^[7]。

目前, 越来越多的研究发现核定位蛋白, 如P53、低氧诱导因子-1 α 、PAS结构域抑制蛋白(IPAS)均可进入线粒体行使功能^[8-11]。研究蛋白质的核-线粒体双定位已成为当前的研究热点, 通过免疫荧光检测蛋白质与线粒体的共定位是证实蛋白质进入线粒体的重要手段, 因此寻找适合固定样品中线粒体标记的方法具有重要意义。

使用MitoTracker探针和抗线粒体蛋白抗体标记线粒体是标记固定细胞样品中线粒体的主要方式, 但尚无研究比较2种标记方式的效果差异, 而且在固定的组织中也未对二者进行比较。因此, 本研究选取抗葡萄糖调节蛋白75(Grp75)抗体和可在固定样品中保留信号的MitoTracker Deep Red探针, 比较这2种方法标记固定细胞/组织中线粒体的效果, 为相关研究选择合适的线粒体标记方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞系、组织和主要试剂

人肝癌细胞系(HepG2)购自ATCC; 人宫颈癌细胞系(HeLa)购自中科院上海细胞库; 人肝癌远端组织(与肝癌组织边缘距离超过1 cm的肝组织)取自四川大学华西医

* 国家自然科学基金(No. 81270552)资助

[△] 通信作者, E-mail: lishengfu@126.com

院生物组织样本库。DMEM、MEM购自Gibco; 胎牛血清购自Biological Industries; MitoTracker Deep Red购自Invitrogen; 4',6-二咪基-2-苯吡啶(DAPI)、多聚-D-赖氨酸(PDL)购自Sigma Aldrich; 抗Grp75抗体、山羊抗小鼠IgG(H+L)(DyLight550)购自Abcam。

1.2 细胞培养

HepG2用含10%胎牛血清的DMEM培养基在培养箱中静置培养, HeLa用含10%胎牛血清的MEM培养基在培养箱中静置培养。

1.3 细胞免疫荧光染色

配制试剂: 使用无菌去离子水将MitoTracker Deep Red粉末配制成1 nmol/L储存液, 使用PBS进一步稀释成不同终浓度(75 nmol/L、100 nmol/L或150 nmol/L)的工作液; 使用PBS将Triton X-100稀释到体积分数0.1%; 称取适量BSA加入到PBS中, 使其终浓度为1%(*m/V*); 加入无菌去离子水将PDL粉末配制成0.1 mg/mL的工作液; 加入无菌去离子水将DAPI粉末配制成1 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液。

接种细胞: 将14 mm细胞爬片(NEST)置于24孔板中, 加入PDL包被5 min后用无菌去离子水洗2次并自然干燥2 h; 将细胞消化后并重悬, 按 3×10^4 /孔加入到孔板中, 摇匀后放入培养箱中静置培养。培养24 h后确认细胞贴壁并完全伸展开。

固定、通透及封闭: 弃各孔培养基, PBS洗2次后加入体积分数4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗10 min, 3次; 0.1% Triton X-100通透10 min, PBS洗10 min, 3次; 将细胞爬片置于载玻片上, 放入湿盒中, 使用含1% BSA的PBS于37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min。

MitoTracker Deep Red标记: 将MitoTracker Deep Red工作液(HepG2细胞滴加浓度为100 nmol/L, HeLa细胞滴加浓度为75 nmol/L、100 nmol/L)滴加到细胞爬片上, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 下染色30 min; PBS洗10 min, 3次; 加入DAPI(1 $\mu\text{g/mL}$)染色5 min, PBS洗10 min, 2次; 使用抗荧光淬灭封片剂封片。

抗Grp75抗体标记: 使用含1% BSA的PBS按照1:50稀释抗Grp75一抗抗体储存液, 于湿盒中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS洗10 min, 3次; 使用含1% BSA的PBS按照1:400稀释山羊抗小鼠IgG(H+L)(DyLight550)抗体储存液, 于湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBS洗10 min, 3次; 加入DAPI染色5 min, PBS洗10 min, 2次; 使用抗荧光淬灭封片剂封片。

观察并采集图片: 使用共聚焦显微镜(Nikon)油镜放

大600倍观察染色效果: 首先使用405 nm通道找到细胞核(DAPI染色后镜下呈蓝色), 并调整细准焦螺旋至最清晰, 即为合适的焦距, 再使用647 nm或550 nm通道观察MitoTracker Deep Red或抗Grp75抗体染色的线粒体, 选取细胞焦面一致的视野采图。

由于本技术的主要目的不是看线粒体荧光的强弱, 而是看线粒体的形态结构, 特别是线粒体的管状、丝状结构, 以直观反映线粒体的分裂融合状态, 故此次实验均未做荧光定量分析。

1.4 组织免疫荧光染色

固定、通透及封闭: 将冻存组织于低温下切片后, 使用组化笔圈组织, 滴加体积分数4%多聚甲醛于常温下固定10 min, PBS洗10 min, 3次; 滴加0.1% Triton X-100通透10 min, PBS洗10 min, 3次; 使用含1% BSA的PBS于湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min。

MitoTracker Deep Red标记: 将用PBS配制的MitoTracker Deep Red工作液(150 nmol/L)滴加到组织上, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 染色30 min; PBS洗3 min, 3次; 加入DAPI(1 $\mu\text{g/mL}$)染色5 min, PBS洗3 min, 2次。

抗Grp75抗体标记: 使用含1% BSA的PBS按照1:50稀释抗Grp75一抗抗体储存液, 于湿盒中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS洗3 min, 3次; 使用含1% BSA的PBS按照1:400稀释山羊抗小鼠IgG(H+L)(DyLight550)抗体储存液, 于湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBS洗3 min, 3次; 加入DAPI(1 $\mu\text{g/mL}$)染色5 min, PBS洗3 min, 2次; 使用抗荧光淬灭封片剂封片并在共聚焦显微镜(Nikon)下使用油镜放大600倍观察染色情况。

2 结果

2.1 细胞中比较荧光探针和抗体标记线粒体效果

HepG2细胞中, 2种标记方式核内均无非特异性信号, 标记的线粒体分布近似, 均可观察到管状和点状分布, 可反映线粒体的聚集, 但探针标记的线粒体信号整体更弱, 且不如抗体标记清晰, 点状和管状结构不如抗体明显(图1)。为进一步比较探针和抗体的标记效果, 我们同样在HeLa细胞中进行了染色。结果显示: 使用100 nmol/L探针染色, 核内有可见信号, 降低探针浓度至75 nmol/L, 虽然避免了核内非特异性染色, 但整体信号极弱; 相较之下, 使用抗体染色信号强, 且可明显观察到线粒体的点状分布(图2)。

2.2 组织中比较荧光探针和抗体标记线粒体效果

如图3所示: 探针染色后与核仅少数重合(图中粉

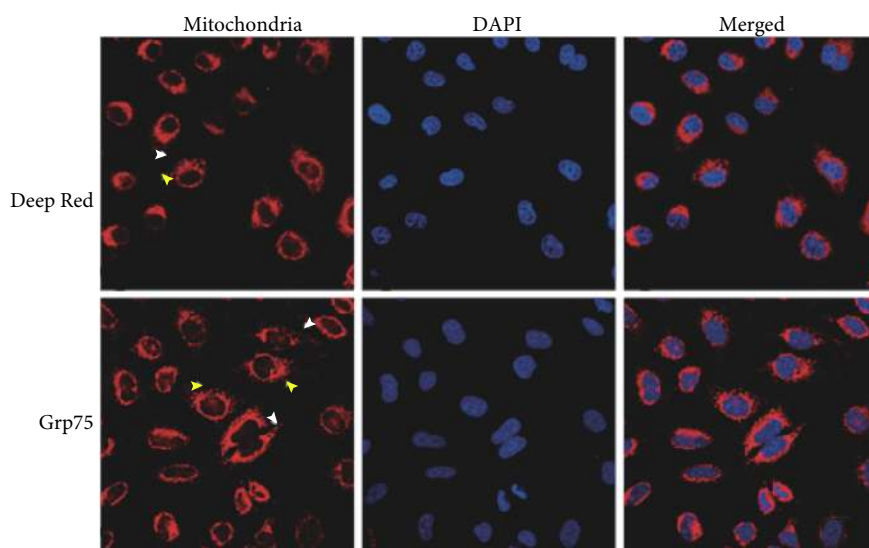


图 1 使用荧光探针和抗体标记HepG2线粒体。×600

Fig 1 Mitochondria in HepG2 cells stained with fluorescent probes or antibodies. ×600

Mitochondria (red) were stained with 100 nmol/L MitoTracker Deep Red or anti-Grp75 antibody. Nuclei were stained with DAPI (blue). White arrows: Tubular distribution; Yellow arrows: Punctate distribution

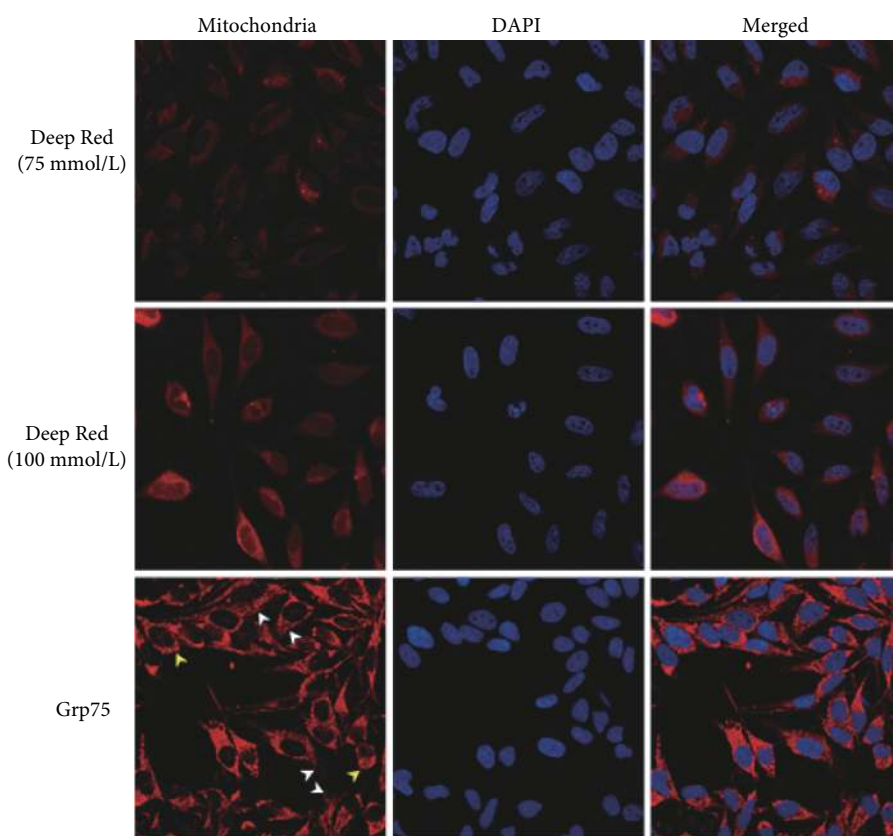


图 2 使用荧光探针和抗体标记HeLa线粒体。×600

Fig 2 Mitochondria in HeLa cells stained with fluorescent probes or antibodies. ×600

Mitochondria (red) were stained with 75 nmol/L or 100 nmol/L MitoTracker Deep Red or anti-Grp75 antibody. Nuclei were stained with DAPI (blue). The white arrows indicate tubular distribution, the yellow arrows indicating punctate distribution

色), 抗体染色后与核重合较多, 提示: 在固定组织中2种标记方式均有非特异性染色, 探针特异性更高; 2种标记

方式染色效果不同, MitoTracker探针标记的单个细胞更均匀, 抗体染色不均匀。

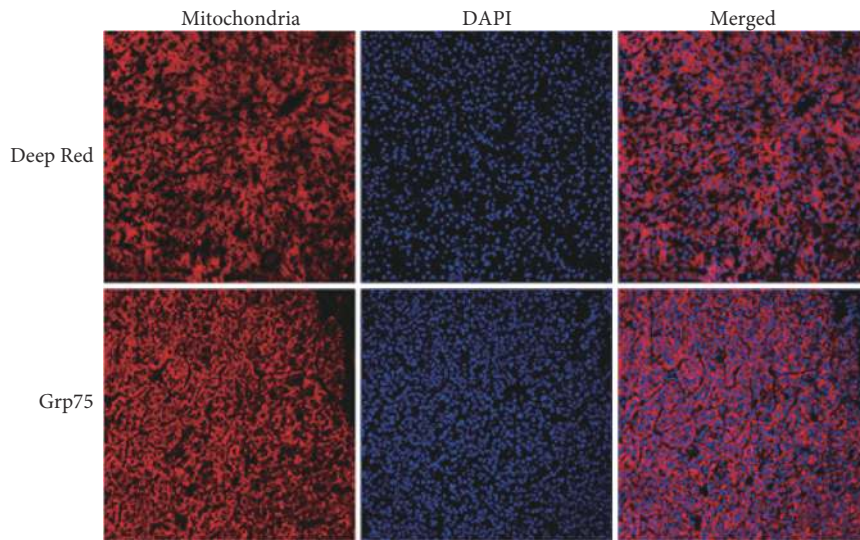


图3 使用探针和抗体染色人肝组织线粒体。×600

Fig 3 Mitochondria in human liver tissues stained with fluorescent probes or antibodies. ×600

Mitochondria (red) were stained with 150 nmol/L MitoTracker Deep Red or anti-Grp75 antibody. Nuclei were stained with DAPI (blue). The merge area was pink

3 讨论

目前,检测线粒体形态和分布的手段包括透射电镜和免疫荧光这类直接观察的方法,也可使用免疫印迹检测相关蛋白的表达变化^[2-5]。若采用免疫荧光法观测线粒体的形态和分布可使用线粒体特异的荧光探针。常用于线粒体标记的探针包括经典的罗丹明123、JC-1和MitoTracker®系列。罗丹明123是一种阳离子染料,可依赖线粒体膜电位进入线粒体基质,荧光减弱或消失,当线粒体膜电位在应激条件下下降,罗丹明123由线粒体重新释放到细胞质中发出黄绿色荧光^[12]。JC-1同样依赖于线粒体膜电位进入线粒体基质,形成聚合物,发红色荧光,当线粒体膜电位下降,位于细胞质的JC-1呈单体形式,发绿色荧光^[13]。由于这两种染料对线粒体膜电位的敏感性,在相关研究中,二者主要适用于检测线粒体膜电位变化。此外,这两种探针仅可染色活细胞,无法在细胞固定后(膜电位被破坏)保留,因而不能用于需要标记固定细胞中的线粒体的研究。MitoTracker®系列探针是Molecular Probes公司基于碱性染料研发的线粒体特异性荧光染料,包含轻度巯基化的氯甲基活性部分,与半胱氨酸残基的游离硫醇基反应,从而与基质蛋白实现共价结合^[14]。此系列探针有不同颜色,包括红色荧光染料MitoTracker Red CMXRos、MitoTracker Red CM-H2XRos和MitoTracker Red,绿色荧光染料MitoTracker Green,远红外荧光染料MitoTracker Deep Red。与罗丹明123和JC-1不同的是,这些探针除MitoTracker Green外均可在固定后保留信号,因而不仅常在相关研究用于标

记活细胞中的线粒体,指征线粒体量、动态变化和分布,也应用于固定细胞中的双荧光标记实验,是目前线粒体标记最常用的探针。另一种常用的非探针标记方式是利用抗线粒体蛋白抗体结合相应荧光二抗实现对线粒体的特异性标记。此种标记方式需要选取在线粒体中稳定表达且仅在线粒体内表达的蛋白,研究中常选用的Grp75是一种表达于线粒体基质的热休克蛋白^[15-16]。

本研究比较了细胞和组织中使用线粒体特异性探针MitoTracker Deep Red和线粒体标志蛋白Grp75的抗体标记线粒体的效果,结果提示:使用抗Grp75抗体染色的细胞线粒体具有点状和管状形态,与报道的线粒体处于分裂/融合动态平衡相符^[17];而使用探针染色线粒体多呈片状或云雾状。尽管在HepG2细胞中观测到点状和管状,但其形态仍不如抗体染色清晰。值得注意的是,相同操作下,使用MitoTracker Deep Red染色HeLa细胞线粒体效果远不如染色HepG2细胞线粒体,不仅未能观测到点状和管状分布,核内也有可见信号。而降低探针工作浓度虽然避免了核内信号,但整体信号极弱。在多次独立重复实验中,MitoTracker Deep Red染色HeLa细胞线粒体效果相近,我们推测这可能与HeLa细胞线粒体分布分散有关。从图1和图2看,无论探针还是抗体染色,HepG2的线粒体信号均聚集在核周,而HeLa的线粒体信号则较为分散,因而HepG2中线粒体的信号更强,MitoTracker Deep Red染色效果明显,而HeLa中信号弱,提示:MitoTracker Deep Red在不同细胞中标记线粒体效果或有差异,抗Grp75抗体标记效果则相对稳定。因此,根据我们的研究结果,在固定细胞中检测蛋白质与线粒体共定位的实验,

我们更推荐使用抗线粒体蛋白抗体的标记方法。

与细胞样品中的结果不同,在组织中使用MitoTracker Deep Red染色特异性更好,效果更佳。需要说明的是,由于组织本身特性,我们无法通过高倍镜观测到组织中单个细胞线粒体分布的管状和点状形态,因此并不能判断哪种标记方式更能反映线粒体真实的分布。我们前期研究曾成功使用MitoTracker Deep Red在小鼠肝组织中标记线粒体检测蛋白质与线粒体的共定位^[18]。因此,根据上述结果,我们认为:在细胞样品中,使用抗Grp75抗体标记线粒体效果更好,而在组织中则使用MitoTracker Deep Red效果更佳。我们推测:这可能与组织结构、胞外基质成分复杂,易造成抗体(包括一抗和二抗)的非特异性吸附,从而导致非特异性染色有关。

在实际操作中,MitoTracker Deep Red全程需要避光操作,使用浓度不能太高,以免引起非特异性染色,同时需现配现用;抗Grp75抗体的使用浓度也不能太高,以免引起非特异性染色。

尽管本研究显示使用荧光探针MitoTracker Deep Red标记细胞样品中的效果欠佳,但作为线粒体特异的探针,MitoTracker Deep Red与MitoTracker Green等广泛应用于活细胞线粒体染色,不仅适用于免疫荧光,同样适用于流式细胞术^[19],应用范围广泛;且其成本相较于抗体低廉,无需使用二抗,操作更简便快速,尤其在需检测细胞中线粒体分裂/融合动态变化时,探针是更好的选择。但哪种荧光探针更能直观并真实地反映线粒体分布与动态变化仍需后续实验进一步验证。线粒体作为一种参与多种生理、病理过程的重要细胞器广受关注,本研究结果为需荧光标记线粒体的相关研究在选择适用实验方案时提供了更多依据和参考。

参 考 文 献

- [1] TILOKANI L, NAGASHIMA S, PAUPE V, *et al.* Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, 2018, 62(3): 341–360.
- [2] GOU H, ZHAO M, XU H, *et al.* CSFV induced mitochondrial fission and mitophagy to inhibit apoptosis. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39382–39400.
- [3] LI M X, DEWSON G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000prime Reports*, 2015, 7: 42[2019-04-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6097715/>. doi: 10.12703/P7-42.
- [4] MORCIANO G, PEDRIALI G, SBANO L, *et al.* Intersection of mitochondrial fission and fusion machinery with apoptotic pathways: role of Mcl-1. *Biol Cell*, 2016, 108(10): 279–293.
- [5] GRUMBACH I M, NGUYEN E K. Metabolic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(6): 991–997.
- [6] PUCCI B, BERTANI F, KARPINICH N O, *et al.* Detailing the role of Bax translocation, cytochrome c release, and perinuclear clustering of the mitochondria in the killing of HeLa cells by TNF. *J Cell Physiol*, 2008, 217(2): 442–449.
- [7] NEARY M T, NG K E, LUDTMANN M H, *et al.* Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74: 340–352.
- [8] BAKHANASHVILI M, GRINBERG S, BONDA E, *et al.* p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death Differ*, 2008, 15(12): 1865–1874.
- [9] MURPHY M E, LEU J I, GEORGE D L. p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis. *Cell Cycle*, 2004, 3(7): 836–839.
- [10] MYLONIS I, KOURTI M, SAMIOTAKI M, *et al.* Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci*, 2017, 130(2): 466–479.
- [11] TORII S, GOTO Y, ISHIZAWA T, *et al.* Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ*, 2011, 18(11): 1711–1725.
- [12] JOHNSON L V, WALSH M L, CHEN L B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77(2): 990–994.
- [13] SALVIOLI S, ARDIZZONI A, FRANCESCHI C, *et al.* JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, 1997, 411(1): 77–82.
- [14] CHAZOTTE B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harbor Protoc*, 2011, 2011(8): 990–992.
- [15] BHATTACHARVVA T, KARNEZIS A N, MURPHY S P, *et al.* Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J Biol Chem*, 1995, 270(4): 1705–1710.
- [16] DAHLSEID J N, LILL R, GREEN J M, *et al.* PBP74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein. *Mol Biol Cell*, 1994, 5(11): 1265–1275.
- [17] LEE H, YOON Y. Mitochondrial fission and fusion. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(6): 1725–1735.
- [18] LI H S, ZHOU Y N, LI L, *et al.* HIF-1alpha protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol*, 2019: 101109–101123[2019-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101109>.
- [19] GAUTAM N, SANKARAN S, YASON J A, *et al.* A high content imaging flow cytometry approach to study mitochondria in T cells: MitoTracker Green FM dye concentration optimization. *Methods*, 2018, 134–135: 11–19.

(2019-05-17收稿, 2019-11-16修回)

编辑 吕 熙