

# 基于激光共聚焦显微镜研究细胞核标识技术

成旭<sup>1,2\*</sup>, 叶志安<sup>1,2\*</sup>, 杨芝芝<sup>1</sup>, 王永强<sup>1,2#</sup>, 林乐航<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中山大学孙逸仙纪念医院基础与转化医学研究中心、广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室, 广东 广州

<sup>2</sup>中山大学孙逸仙纪念医院南海精准免疫临床转化创新中心, 广东 佛山

收稿日期: 2022年9月28日; 录用日期: 2022年11月27日; 发布日期: 2022年12月7日

## 摘要

本文利用激光扫描共聚焦显微镜研究实验室常用细胞核标记方法, 对细胞成像相关实验技术进行进一步优化。首先用DNA荧光标记法、组蛋白荧光标记法以及微分干涉术(DIC)分别对贴壁培养的细胞进行成像; 然后结合核仁蛋白标记和核内非编码RNA杂交标记对细胞核结构进行解析, 进一步挖掘常规核染色标记所能带来的深度信息; 最后针对实验平台日常细胞影像实验需求进行研究, 对几类常用核标识技术的优势与不足进行讨论。基于影像实验数据, 可以发现染色质相关荧光标记不仅仅可用于细胞核标识, 其展示的核内染色质密度分布同时暗含了细胞核的亚结构信息, 我们在此予以初步实验论述。另外, 利用共聚焦DIC成像同样能清晰识别细胞核及其内部核仁结构, 因而DIC在一定程度上与染色质荧光标记成像是等效的。总之, 本文对常用几种细胞核标识技术进行了全面介绍, 有望为细胞成像相关实验的研究与分析提供新的思路。

## 关键词

激光扫描共聚焦显微镜, 细胞核, 染色质, 微分干涉术

# Nucleus Identification Technology Based on Laser Confocal Microscopy

Xu Cheng<sup>1,2\*</sup>, Zhi'an Ye<sup>1,2\*</sup>, Zhizhi Yang<sup>1</sup>, Yongqiang Wang<sup>1,2#</sup>, Lehang Lin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Malignant Tumor Epigenetics and Gene Regulation, Basic and Translational Medicine Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>Nanhai Translational Innovation Center of Precision Immunology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Foshan Guangdong

\*共同第一作者。

#通讯作者。

## Abstract

In this paper, we use the laser scanning confocal microscopy research laboratory commonly used nuclear labeling method to further optimize the experimental technology related to cell imaging. First, the adherent cultured cells were imaged by DNA fluorescent labeling, histone fluorescent labeling and differential interferometry (DIC). Then combined with nucleolar protein markers and nuclear non-coding RNA hybrid markers to analyze the nuclear structure, and further explore the depth information brought by conventional nuclear staining markers; finally, according to the needs of daily cell imaging experiments on the experimental platform, the advantages and disadvantages of several types of commonly used nuclear labeling techniques are discussed. Based on the image experimental data, it can be found that chromatin-related fluorescent markers can not only be used for nuclear identification, but also the chromatin density distribution in the nucleus implies the substructure information of the nucleus. In addition, confocal DIC imaging can also clearly identify the nucleus and its internal nucleolar structure, so DIC is equivalent to chromatin fluorescent labeling imaging to a certain extent. In conclusion, this paper provides a comprehensive introduction to several commonly used nuclear labeling techniques, which is expected to provide new ideas for the research and analysis of cell imaging-related experiments.

## Keywords

Laser Scanning Confocal Microscopy, Nucleus, Chromatin, Differential Interference Method

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

激光共聚焦显微技术在生命科学领域广泛应用,该技术不仅用于细胞及亚细胞相关细微结构的观察,同时还用于三维重构、时间序列动态成像和大视野图像拼接等,在生命科学相关研究中发挥有重要作用 [1] [2] [3] [4] [5]。

细胞是生命体结构和功能的最小单元,一直以来都是生命科学研究的重点。细胞核是细胞的功能调节控制中心,其存储了细胞中绝大部分的遗传信息,是细胞最重要的结构。细胞核中拥有诸多化学物质,其中染色质最为重要,其化学构成为 DNA 和组蛋白。常用的细胞核标记技术多是基于对染色质的特异标记,其中以 DNA 标记法最为流行。常用 DNA 染料包括有 DAPI、PI 和 hoechst 33342 等,其相关标记原理是基于染料在 DNA 螺旋中的物理镶嵌,再经由荧光检测而实现对全核 DNA 成像 [6] [7] [8] [9]。由于细胞 DNA 总量比较大,而又高度集中于细胞核这一狭小区域,因而这些染料的荧光标记区域就可以近似为细胞核。自 1962 年下村修等人在维多利亚水母中发现绿色荧光蛋白(GFP)以来,经科学家的不断研究发展,GFP 基因已被广泛用作报告基因,用于监测基因表达和蛋白质定位 [10] [11] [12]。这种针对组蛋白的 GFP 标记与 DNA 染色标记类似,也可以对细胞核染色质密度分布和定位进行标识,成为一种有效的核标记方法。除此之外本文还介绍基于 DIC 成像的细胞核标识方法,通过微分干涉术对细胞核进行特征性标识。在使用激光扫描共聚焦显微技术基础上,本文针对不同的细胞核标识方法进行综合分析论述,

有望为细胞核亚定位以及细胞多色成像实验提供更有利的帮助。

## 2. 材料以及方法

### 2.1. 试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶购于美国 Gibco 公司；4%多聚 Open Access 甲醛购于 Thermo Fisher Scientific 公司；U6 和 MALAT1 探针订购于吉玛基因公司；Fibrillarin 和 Nucleophosmin 1 抗体采购于 Abcam 公司。

### 2.2. 细胞培养

H2B-GFP 荧光标记细胞由胡开顺博士友情提供，使用 10%胎牛血清混合 DMEM Medium 培养基培养，培养箱温度为 37℃、CO<sub>2</sub> 浓度为 5%，计数  $1 \times 10^5$  个细胞接种于共聚焦皿中，细胞密度 50%~70% 备用。

### 2.3. 荧光成像与分析

使用激光共聚焦显微镜(LCSM 800, Zeiss, Germany)记录图像，该显微照片配备了平面复消色差  $\times 40/1.4$  NA 油浸物镜。实验用激光器波长分别为 405 nm、488 nm 和 561 nm。

## 3. 结果

### 3.1. DAPI 标记条件下的细胞核结构解析

DAPI、PI 和 hoechst 是常用的几种核标记染料，都是以 DNA 标记为基础。DAPI 于 1971 年由 Otto Dann 等人首次发明，是 DNA 特异性标记染料，可以在 A-T 富含区域富集[13]。DAPI 荧光成像结果显示为 DNA 在细胞中的密度分布，于细胞而言可近似为细胞核的等价标记。通过对细胞核 DAPI 荧光成像结果的观察，可以轻易发现 DAPI 荧光强弱的不均质性(图 1)，说明 DNA 在核内不同位点的密度有差异。核仁是间期细胞核内特殊结构，是核糖体 RNA 合成中心，其 DNA 密度比较低，因此 DAPI 标记条件下会呈现明显的负染色。通过对核仁表达蛋白 Fibrillarin 和 Nucleophosmin 1 进行特异性标记，进一步确认了 DAPI 负染色核仁标识的正确性(图 1(A))。另外，在核仁外其他细胞核区域也有 DNA 密度差异，在小鼠细胞核中的这种差异异常明显，其高密度区已被证明与高度重复卫星 DNA 序列相关[14]。我们进一步的实验结果表明，细胞核 DNA 低密度区域可能有较高的转录活跃度，非编码 RNA U6 和 MALAT1 原位杂交结果显示，这些杂交荧光信号完美镶嵌于 DAPI 弱荧光间区(图 1(B)，图 1(C))。以上数据表明，DAPI 标记条件下不仅可以识别细胞核，同时可以对核内细节结构进行分辨，为可能的亚核定位分析提供依据。

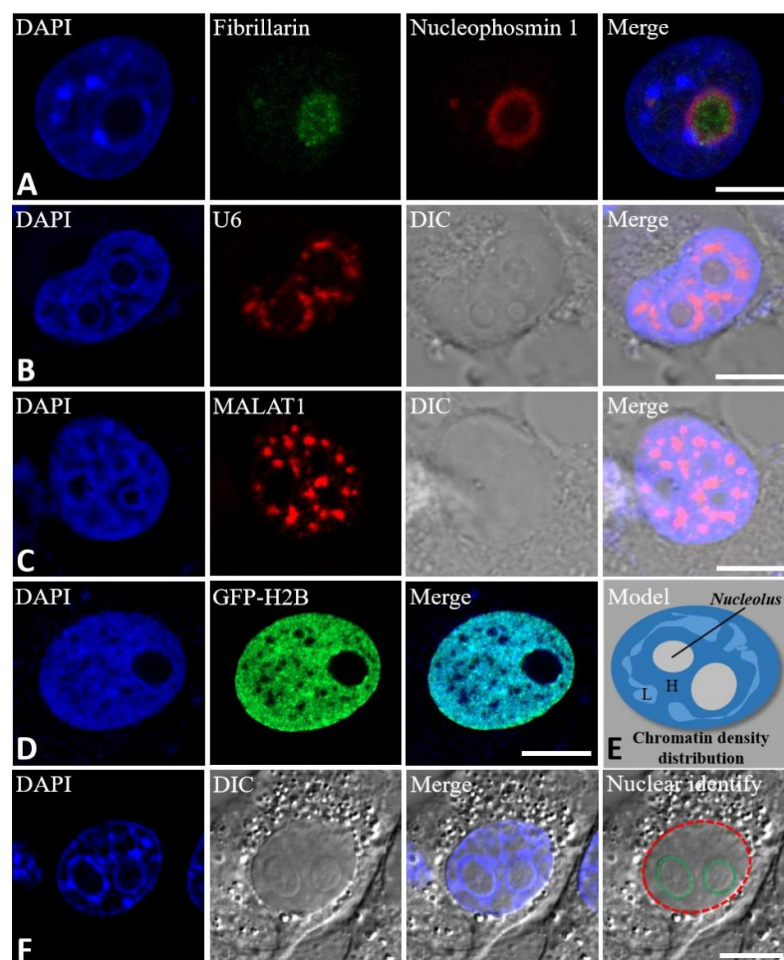
### 3.2. 基于 GFP-H2B 标记研究细胞核结构

染色质的化学组成以 DNA 和组蛋白为主，前文我们介绍了基于 DNA 标识对核结构的研究，同样对组蛋白进行荧光标记成像理论也可得到类似结果。首先构建 GFP-H2B 稳转标记细胞系，随后通过共定位实验表明 GFP-H2B 信号与 DAPI 信号具有一致性(图 1(D)) [15]，因此认为针对组蛋白的标记也可近似为细胞核的等价标记。利用组蛋白荧光标记技术，可以对特定细胞组蛋白进行荧光报告基因改造，建立活细胞观察模型，进而可以对活细胞染色质行为的动力学监测[15]。

### 3.3. 无特殊标记条件下进行核标识

在细胞成像实验中，多数情况下对细胞核的标记是不可或缺的，因而关注多色成像条件下的核标记很有必要。常用细胞核荧光标记有个重要问题是，该标记会占用一个优势荧光通道，考虑到激光扫描共

聚焦显微镜激光器配置有限和荧光光谱串扰的情况, 综合而言对细胞核进行无标记成像就可以发挥其优势, 进一步满足特殊条件下的成像需求。在无标记条件下, 细胞核质之间存在微弱的折射率差异[16], 造成在微距离上存在的光程差, 因而可经干涉信号捕捉分析, 实现核质高对比度。激光扫描共聚焦显微镜安装有微分干涉成像系统(DIC), 可以进行微分距离干涉成像分析。通过实验发现, 在 DIC 成像模式下细胞核质间有明显的界限, 并且核仁也清晰可见, 这些结构可以通过 DAPI 荧光信号予以验证(图 1(F))。DIC 成像是基于无标记条件进行, 因而有助于在活细胞水平研究细胞核相关动力学, 同时其可以在特定条件下允许实验人员替代核的荧光标记, 节省出一个可用标记通道, 将有利于多色荧光标记实验。



**Figure 1.** Multi method identification and imaging of nucleus. A. DAPI and nucleolar associated protein labeling imaging were performed on 4T1 cells; B. *In situ* labeling and imaging of U6 (small nuclear RNA) in MCF-7 cells; C. *In situ* labeling and imaging of MALAT1 (long chain non coding RNA) in MCF-7 cells; D. MCF-7 cells stably transformed GFP-H2B, and verified the consistency with DAPI fluorescence label; E. Density distribution diagram of chromatin in nucleus, where “L” is used for “low-density area” and “H” is used for “high-density area”; F. Differential interference imaging and identification of nuclear related structures were performed on cells. The red dotted line area was the nucleus, and the green dotted line area was the nucleolus. Bars, 5  $\mu\text{m}$

**图 1.** 细胞核多方法学标识以及成像。(A) 对 4T1 细胞进行 DAPI 以及核仁相关蛋白标记成像; (B) 对 MCF-7 细胞 U6 小核 RNA 进行原位标记及成像; (C) 对 MCF-7 细胞 MALAT1 长链非编码 RNA 进行原位标记及成像; (D) MCF-7 细胞稳转 GFP-H2B, 并验证与 DAPI 荧光的标识一致性; (E) 细胞核内染色质密度分布示意图, 其中“L”代表低密度区, “H”代表高密度区; (F) 对细胞进行微分干涉成像以及细胞核相关结构识别, 其中红色虚线区域为细胞核, 绿色虚线区域为核仁。标尺 = 5  $\mu\text{m}$



## 4. 讨论

在培养皿中细胞以单层贴壁生长为主, 在显微镜下往往显示为透明, 极大地限制了常规光学显微镜的分辨能力。随着相差显微技术的发明、荧光显微镜的问世, 这一难题逐步得到解决。现如今针对细胞及亚细胞的显微观察工具日趋成熟, 如何合理使用相关技术成为相关实验技术人员的首要任务。荧光标记技术以及相关检测技术的革新不断提升显微镜的分辨能力, 是推动生命科学快速发展的重要动力, 其中激光扫描共聚焦显微镜起到了关键性作用。激光扫描共聚焦显微镜使用激光器为光源, 因为激光具有极好的相干性、单色性, 所以在多色成像以及干涉成像方面具有先天优势。

细胞是生命科学研究的重要载体, 而细胞核是其内部最明显、最重要的细胞器, 有关细胞核的标识技术具有不可忽略的作用。对染色质的荧光标记可以近似为细胞核标识, 同时依据标识强度可以对细胞核染色质的分布情况进一步解析, 也就便于进一步解析细胞核内亚结构, 例如核仁、异染色质和常染色质区域的标注(图 1(A)~(E))。基于染色质标记可以特异性识别细胞核, 检测结果也更加精细, 但是会占用一个独立荧光通道, 在一定程度上会限制多色成像。我们认为可以利用 DIC 进行细胞核结构标识, 从而保留一个优势荧光通道, 将有利于在共聚焦显微镜的多色成像。由于激光具有好的单色性, 并且扫描精度高, 在共聚焦显微镜下进行的细胞核 DIC 成像也有了更好的视图分辨解析能力(图 1(F))。除此之外, DIC 成像可以避免外加标记物对细胞本身存在的干扰, 尤其是在活细胞水平的实验中。

总之, 本文基于使用激光共聚焦显微镜研究分析了常用细胞核标记技术, 系统总结了几类细胞核标识技术的原理、优势和不足, 为细胞成像相关实验的研究与应用提供新的思路。

## 基金项目

中国博士后科学基金(2021M693627)。

## 参考文献

- [1] White, J.G., Amos, W.B. and Fordham, M. (1987) An Evaluation of Confocal versus Conventional Imaging of Biological Structures by Fluorescence Light Microscopy. *The Journal of Cell Biology*, **105**, 41-48. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.41>
- [2] Keddie, J.L., Gorce, J.P., Mallegol, J. and McDonald, P.J. (2004) Understanding Water-Borne Coatings: New Techniques to Answer Old Questions. *Surface Coatings International Part A: Coatings Journal*, **87**, 70-73.
- [3] Kubinova, L., Janacek, J., Karen, P., Radochova, B., Difato, F. and Krekule, I. (2004) Confocal Stereology and Image Analysis: Methods for Estimating Geometrical Characteristics of Cells and Tissues from Three-Dimensional Confocal Images. *Physiological Research*, **53**, S47-S55.
- [4] Wang, D.-M., Wang, X.-C. and Zhang, W.-C. (2000) Revealing the F-Actin Networks in Interphase Nuclei of Garlic Clove Cells by Confocal Fluorescence Microscopy. *Journal of Integrative Plant Biology*, **42**, 1167-1171.
- [5] Lamprecht, A., Schäfer, U.F. and Lehr, C.-M. (2000) Characterization of Microcapsules by Confocal Laser Scanning Microscopy: Structure, Capsule Wall Composition and Encapsulation Rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **49**, 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(99\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(99)00063-6)
- [6] Kapuscinski, J. (1995) DAPI: A DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry*, **70**, 220-233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- [7] Krishan, A. (1975) Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. *The Journal of Cell Biology*, **66**, 188-193. <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>
- [8] Bucevičius, J., Lukinavičius, G. and Gerasimaitė, R. (2018) The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors*, **6**, Article No. 18. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>
- [9] Otto, F. (1990) DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 33, Elsevier, Amsterdam, 105-110. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)
- [10] Prasher, D.C. (1995) Using GFP to See the Light. *Trends in Genetics*, **11**, 320-323. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89090-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89090-3)
- [11] Yeh, E., Gustafson, K. and Boulianne, G.L. (1995) Green Fluorescent Protein as a Vital Marker and Reporter of Gene

- 
- Expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7036-7040. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7036>
- [12] Spergel, D.J., Krüth, U., Shimshek, D.R., Sprengel, R. and Seeburg, P.H. (2001) Using Reporter Genes to Label Selected Neuronal Populations in Transgenic Mice for Gene Promoter, Anatomical, and Physiological Studies. *Progress in Neurobiology*, **63**, 673-686. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00038-1)
- [13] Zeman, L.J. and Lusena, C.V. (1975) Preferential Digestion of (A + T)-Rich Stretches of Yeast Mitochondrial DNA in Isolated Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, **57**, 561-567. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02331.x>
- [14] Wang, Y., Huang, Z., Hu, K., Peng, J., Yao, W., Deng, W., Zuo, J., Zhang, Y. and Yin, D. (2021) A Convenient Method for Distinguishing Human and Mouse Cells *in Situ*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **53**, 124-127. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa137>
- [15] 王永强, 姚伟城, 邓伟溪, 彭江云. 乳腺癌细胞休眠期至分裂间期染色质行为动力学特征分析[J]. 岭南现代临床外科, 2020, 20(5): 545-549.
- [16] 白祥云. 基于光镊系统的肺癌细胞折射率理论计算与仿真分析[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2012.