

盘基网柄菌野生型 KAx-3 发育过程中 自发荧光的观察

薛德明

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 社会性变形虫盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 是研究发育和致病机理的重要模式生物之一。发育过程中自发荧光的研究有利于流式细胞仪检测时确定基础荧光阈值、细胞分选和判定荧光标记实验的准确性。本文用荧光显微镜对盘基网柄菌野生型 KAx-3 不同发育阶段在 4 种不同波长的激发光 (蓝光、绿光、黄光和紫外线) 照射下的自发荧光现象进行了观察。结果表明, 在蓝光激发下, 子实体阶段孢子囊自发荧光最强, 单细胞期最弱; 在绿光和黄光激发下, 蛞蝓体阶段无自发荧光产生; 在紫外线激发下, 单细胞期最弱, 自发荧光强弱会发生变化; 蓝光激发会产生绿色荧光, 绿光和黄光激发产生红色荧光, 紫外线激发产生蓝色荧光。以上结果说明盘基网柄菌自发荧光光谱具有多样性。

关键词: 盘基网柄菌野生型 KAx-3; 发育; 自发荧光

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)01-56-06

Autofluorescence of KAx-3 Cells during Development in Wild Type *Dictyostelium discoideum*

XUE De-Ming

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The social amoeba *Dictyostelium discoideum* is increasingly being used as a simple model for the investigation of problems that are relevant to development and pathogenesis. The investigation of autofluorescence during development is helpful to identifying basic fluorescent threshold, accuracy of experiment marked with fluorescent dye, and cellular sorting with flow cytometry. The autofluorescence of KAx-3 cells at different developmental phases was observed with fluorescent microscope in wild type *D. discoideum*. The results showed that the autofluorescence of spore capsule at fruiting body was strongest, while the autofluorescence was weakest at unicellular phase under excitement of wide blue (abbr: WB). There was no autofluorescence at slug under excitement of wide green (abbr: WG) and wide interference yellow (abbr: WIY). The autofluorescence at unicellular phase was weakest under excitement of wide ultraviolet ray (abbr: WU). The autofluorescent intensity was changed during development. Green, red, and blue colors of autofluorescences were separately excited by WB, WG and WIY, and WU. The results indicate the diversity autofluorescence spectrum of KAx-3 cells in wild type *D. discoideum*.

Key words: *Dictyostelium discoideum* wild type strain KAx-3; Development; Autofluorescence

作者简介 薛德明,男,博士研究生;研究方向:盘基网柄菌发育生物学;E-mail: xuedeming2003@yahoo.com.cn。

收稿日期:2010-07-02,修回日期:2010-11-07

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是一种结构简单的社会性变形虫,在进化地位上位于后生动物和真菌分枝之前^[1],属于粘菌虫类(the phylum Mycetozoa)。营养充足时,盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞通过有丝分裂产生子细胞,处于未分化单细胞状态。缺乏营养时,细胞停止分裂,进入基因差次表达和形态发生的发育程序;细胞对 cAMP 信号分子会产生趋化作用,大约 10^5 个细胞聚集在一起,形成细胞丘,然后形成蛞蝓体,最后发育成子实体,形成 2 种细胞类型——孢子细胞和柄细胞;柄细胞为死细胞,发育过程中由前柄细胞经凋亡形成;孢子细胞在营养充足的条件下,通过萌发形成单细胞状态。盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞与人类有着相同或相似的信号通路和同源蛋白^[2],因此,盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞是研究细胞分化和致病机理的模式生物之一。自发荧光是一种物理现象,当用一种波长的光照射某种物质时,这种物质会在极短的时间内发射出较照射波长更长的光(可见光),这种光就被称为自发荧光。组织经物理或化学胁迫后发出的自发荧光,称为诱导自发荧光;而固有的非胁迫的自发荧光称为自然自发荧光。多细胞生物发育过程中自发荧光的研究有利于流式细胞仪检测时确定基础荧光阈值、细胞分选和判定荧光标记实验的准确性。现今关于生物组织细胞自发荧光的研究多集中在植物学领域,在医学领域则主要集中在视网膜疾病和恶性肿瘤的辅助诊断方面,有关动物组织细胞的自发荧光研究得比较少^[3-5],关于盘基网柄菌自发荧光的报道更少^[6],未见关于其发育过程中自发荧光的报道。本文就盘基网柄菌发育过程中自发荧光进行了观察,以期为盘基网柄菌发育研究提供基础性资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞由加拿大多伦多大学医学院生化实验室 Siu 博士惠赠,细胞培养于 HL-5(配方:月示脲 10 g,酵母提取物 5 g,葡萄糖 10 g,磷酸氢二钠 0.35 g,

磷酸二氢钾 0.35 g,加蒸馏水定容至 1 L)液体培养基中。

1.2 方法 收集对数生长期细胞,4℃ 1 800 r/min 离心 10 min,弃培养液;把 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(配方:0.2 mol/L 磷酸二氢钠 73.5 ml,0.2 mol/L 磷酸氢二钠 26.5 ml,pH = 6.4)稀释 60 倍后悬浮细胞,4℃ 1 800 r/min 离心 10 min,弃上清液,进行 2 次;用 PDF 缓冲液(配方:氯化钾 1.5 g,氯化镁 0.5 g,磷酸氢二钾 1.6 g,磷酸二氢钾 1.6 g,硫酸链霉素 0.5 g,加蒸馏水至 1 L,pH = 6.4)悬浮细胞,4℃ 1 800 r/min 离心 10 min,弃上清液;悬浮细胞在 PDF 缓冲液中,用血球计数板计数,使其终浓度达到 2×10^{11} 个细胞/L。

将上述已计数的细胞悬液以每板 500 μ l 的量均匀铺在含有 2% 琼脂培养皿里,铺成直径约为 4 cm 的圆形,铺 4 块板,置于 25℃ 使其发育;每隔 2 h 观察一次。细胞丘期、蛞蝓体期和子实体期每板各观察 12 个样品。

在 OLYMPUS 荧光显微镜 BX51TF 明视场(bright field,BF)、4 种激发光(蓝光,wide blue,缩写为 WB,波长范围 460 ~ 490 nm;绿光,wide green,缩写为 WG,波长范围 510 ~ 550 nm;黄光,wide interference yellow,缩写为 WIY,波长范围 545 ~ 580 nm;紫外线,wide ultraviolet ray,缩写为 WU,波长范围 330 ~ 385 nm)下观察,CoolSNAP-ProCF 数码相机成像。

2 结 果

盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞在营养缺乏的条件下,完成整个发育;发育经过单细胞、细胞聚集、细胞丘、蛞蝓体和子实体 5 个阶段,需要 28 h 完成整个发育。其中单细胞期细胞会伸出伪足发生定向移动,形成细胞聚集;蛞蝓体会移动,尾端常常在琼脂板上留下移动的痕迹。对于其自发荧光的观察,分以下几个阶段。

2.1 单细胞期 去除营养 0 h 的盘基网柄菌野生型 KAx-3 细胞为散在的单细胞,在铺有琼脂的培养皿上,明视场下可见一个个单细胞颗粒(图版 I: 1)。相同视野下,蓝色波段激发可

见细胞发出很弱的绿色荧光(图版 I: 2);绿色和黄色波段激发产生红色荧光,可见红光强弱不一,有的细胞较强,有的较弱,有的几乎不发光(图版 I: 3,4);紫外波段激发细胞发出较弱蓝色荧光(图版 I: 5)。

2.2 细胞丘期 16 h,明视场下可见圆形或近似圆形细胞丘的出现,细胞丘中细胞颗粒间轮廓消失,外周部分着色较深,中间部分着色较浅(图版 I: 6)。相同视野下,蓝色波段激发可见细胞丘中间部分发出较强绿色荧光,质地较为均一,外周部分未发荧光(图版 I: 7);绿色和黄色波段激发细胞丘发出红色荧光,质地不均一,有些部分荧光较强,有些部分荧光较弱,有些部分不发荧光(图版 I: 8,9);紫外波段激发细胞丘中间部分发出较强蓝色荧光,质地较为均一,外周部分未发荧光(图版 I: 10)。

2.3 蛞蝓体期 22 h,明视场下可见细胞丘发育成蛞蝓体样外形,能够在琼脂上爬动,可见其后部留下的明显爬行痕迹(图版 I: 11)。相同视野下,蓝色波段激发可见蛞蝓体发出较弱的绿色荧光,前端荧光较强,似一顶帽子,前段中有一部分不发荧光(图版 I: 12);紫外波段激发蛞蝓体发出较强蓝色荧光,前段中有一部分荧光较弱(图版 I: 13)。

2.4 子实体期 28 h,明视场下可见蛞蝓体发育成子实体,子实体由柄和孢子2部分组成,很多孢子被包裹在孢子囊中(图版 I: 14)。相同视野下,蓝色波段激发可见孢子囊发出强黄绿色荧光,柄不发荧光(图版 I: 15);绿色和黄色波段激发孢子囊发出较强红色荧光,柄不发荧光(图版 I: 16,17);紫外波段激发孢子囊发出较强蓝色荧光,柄不发荧光(图版 I: 18)。

综合上述结果,在蓝光激发下,子实体阶段孢子囊自发荧光最强,单细胞期最弱;在绿光和黄光激发下,蛞蝓体阶段无自发荧光产生;在紫外激发下,单细胞期最弱。盘基网柄菌野生型 KAx-3 在发育过程的不同阶段,同一波长激发光激发出的自发荧光强度会发生变化,荧光的性质(波长,即颜色)没有发生变化。

3 讨论

目前,以盘基网柄菌为模型,用绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白融合蛋白研究基因原位表达已成为热点之一;绿色荧光蛋白中的发色团可被 450 ~ 490 nm 的蓝光激发,发出绿色荧光^[7];红色荧光蛋白中的发色团可被 548 ~ 598 nm 波长光(绿光和黄光位于该波长范围内)激发,发出红色荧光^[8];本文中的 460 ~ 490 nm 蓝光激发,产生绿色荧光,激发光波长与绿色荧光蛋白激发光波长基本一致,产生的荧光都在绿光波长范围内;510 ~ 550 nm 绿光和 545 ~ 580 nm 黄光激发,产生红色荧光,激发光波长与红色荧光蛋白激发光波长范围绝大部分重叠,产生的荧光都在红光波长范围内。因此,自发荧光对绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白标定的实验结果和流式细胞的检测结果会产生干扰,很有必要对其自发荧光进行研究。在荧光标定的实验中,科学地设立对照是不可缺少的步骤。

Engel 等^[6]对盘基网柄菌野生型 AX3 营养期未分化单细胞的自发荧光光谱特征进行了研究,发现其自发荧光覆盖的波长范围是 500 ~ 650 nm,峰值在 510 nm 处,绿色荧光蛋白融合蛋白的波长包括在其中,因此,自发荧光干扰了绿色荧光蛋白的准确检测;针对这种情况,用实验证明了在缓冲液中孵育、光漂白和使用低强度的激发光可以减少自发荧光的干扰,提高信噪比。本文分别用蓝光(WB)、绿光(WG)、黄光(WIY)和紫外线(WU)4个波段作为激发光对盘基网柄菌野生型 KAx-3 不同发育阶段的自发荧光进行了观察,所观察自发荧光的波长在蓝光、绿光和红光波长范围内,与 Engel 等^[6]的结果相比有很大部分的重叠。细胞丘阶段细胞的自发荧光强度存在很大差别,因此认为细胞丘阶段自发荧光的特点用流式细胞仪进行细胞分选研究细胞分化程度具有可行性。

Aubin 和 Benson 等认为,在 500 ~ 650 nm 间产生自发荧光,应该归因于黄素核苷酸、黄素蛋白、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),细胞中 pH、

黏性和黄素单核苷酸(FMN)结合蛋白或多肽等因素的变化都会影响到自发荧光^[9-10]。Prasher 等从水母(*Aequorea victoria*)中克隆出绿色荧光蛋白(GFP),Matz 等从珊瑚中发现红色荧光蛋白 drFP583(DsRed)^[11-12],Wall 等认为荧光蛋白表达后发生自体催化,将发色团的 3 个氨基酸环化氧化成一个 π 共轭体系,进一步氧化增加一个酰基,形成成熟发色团,在激发光的作用下,发出荧光^[13]。至于盘基网柄菌野生型 KAx-3 在发育过程中是什么化学成分导致其自发荧光的,有待进一步研究。

本实验盘基网柄菌是在培养皿内铺的琼脂板上发育的,琼脂板表面不在一个水平面上,铺在琼脂板上的盘基网柄菌单细胞不大可能都处于同一个水平面上,因此显微镜聚焦时有一些细胞在焦平面上,有一些不在焦平面上;尽管是单细胞期,有的处于 G₁ 期,有的处于 S 期,有的处于 G₂ 期,还有的处于 M 期,这些可能是单细胞期黄光和绿光激发产生的红色荧光强弱不一,有些几乎不发光的因素。

在发育过程中,蛞蝓体前段出现明显的前柄细胞区,主要由 PstA 和 PstO 细胞组成^[14]。蓝色波段激发可见蛞蝓体前段中有一部分不发荧光,子实体阶段柄不发荧光,柄由死细胞组成,可能说明在蛞蝓体阶段有一部分前柄细胞已经开始死亡。

参 考 文 献

- [1] Baldauf S L, Roger A J, Wenk-Siefert I, et al. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 2000, 290(5493): 972-977.
- [2] Williams R S B, Boeckeler K, Gräf R, et al. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12(9): 415-424.
- [3] 徐旭士,张超英,刘清梅,等. 真菌的自发荧光现象的研究. *激光生物学报*, 2002, 11(2): 109-113.
- [4] 陈辉. 眼底自发荧光技术在眼科中的应用. *国际眼科杂志*, 2004, 4(3): 488-491.
- [5] 翟力平,李世荣. 激光诱发自体荧光诊断恶性肿瘤的研究进展. *中国激光医学杂志*, 1996, 5(4): 226-229.
- [6] Engel R, Haastert P J M V, Visser A J W G. Spectral characterization of *Dictyostelium* autofluorescence. *Microscopy Research and Technique*, 2006, 69(3): 168-174.
- [7] 梁智辉,朱慧芬,陈九武. 流式细胞术基本原理与实用技术. 武汉: 华中科技大学出版社, 2008: 109.
- [8] 樊晋宇,崔宗强,张先恩. 红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(10): 1112-1120.
- [9] Aubin J. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem*, 1979, 27(1): 36-43.
- [10] Benson R, Meyer R, Zaruba M, et al. Cellular autofluorescence—is it due to flavins? *J Histochem Cytochem*, 1979, 27(1): 44-48.
- [11] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111(2): 229-233.
- [12] Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 969-973.
- [13] Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(12): 1133-1138.
- [14] Weeks G. Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(6): 625-630.

图 版 说 明

1. 单细胞期,明视场成像; 2. 单细胞期,蓝光激发出很弱的绿色荧光(曝光时间: 1.3 s); 3. 单细胞期,绿光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 4. 单细胞期,黄光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 5. 单细胞期,紫外激发出很弱的蓝色荧光(曝光时间: 1.3 s); 6. 细胞丘期,明视场成像; 7. 细胞丘期,蓝光激发出的绿色荧光(曝光时间: 1.3 s); 8. 细胞丘期,绿光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 9. 细胞丘期,黄光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 10. 细胞丘期,紫外激发出的蓝色荧光(曝光时间: 1.3 s); 11. 蛞蝓体期,明视场成像; 12. 蛞蝓体期,蓝光激发出较弱的绿色荧光(曝光时间: 1.3 s); 13. 蛞蝓体期,紫外激发出的蓝色荧光(曝光时间: 1.3 s); 14. 子实体期,明视场成像; 15. 子实体期,蓝光激发出的黄绿色荧光(曝光时间: 1.3 s); 16. 子实体期,绿光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 17. 子实体期,黄光激发出的红色荧光(曝光时间: 0.9 s); 18. 子实体期,紫外激发出的蓝色荧光(曝光时间: 1.3 s)。1~10. 标尺 = 500 μm ; 11~18. 标尺 = 300 μm 。

Explanation of Plate

1. Unicellular phase photographed with bright field; 2. Very weak green fluorescence excited with WB at unicellular phase (Exposure time: 1.3 s); 3. Red fluorescence excited with WG at unicellular phase (Exposure time: 0.9 s); 4. Red fluorescence excited with WIY at unicellular phase (Exposure time: 0.9 s); 5. Very weak blue fluorescence excited with WU at unicellular phase (Exposure time: 1.3 s); 6. Mound phase photographed with bright field; 7. Green fluorescence excited with WB at mound phase (Exposure time: 1.3 s); 8. Red fluorescence excited with WG at mound phase (Exposure time: 0.9 s); 9. Red fluorescence excited with WIY at mound phase (Exposure time: 0.9 s); 10. Blue fluorescence excited with WU at mound phase (Exposure time: 1.3 s); 11. Slug phase photographed with bright field; 12. Weak green fluorescence excited with WB at slug phase (Exposure time: 1.3 s); 13. Blue fluorescence excited with WU at slug phase (Exposure time: 1.3 s); 14. Fruiting body phase photographed with bright field; 15. Yellow-green fluorescence excited with WB at fruiting body phase (Exposure time: 1.3 s); 16. Red fluorescence excited with WG at fruiting body phase (Exposure time: 0.9 s); 17. Red fluorescence excited with WIY at fruiting body phase (Exposure time: 0.9 s); 18. Blue fluorescence excited with WU at fruiting body phase (Exposure time: 1.3 s). 1 - 10. Bar = 500 μm ; 11 - 18. Bar = 300 μm .

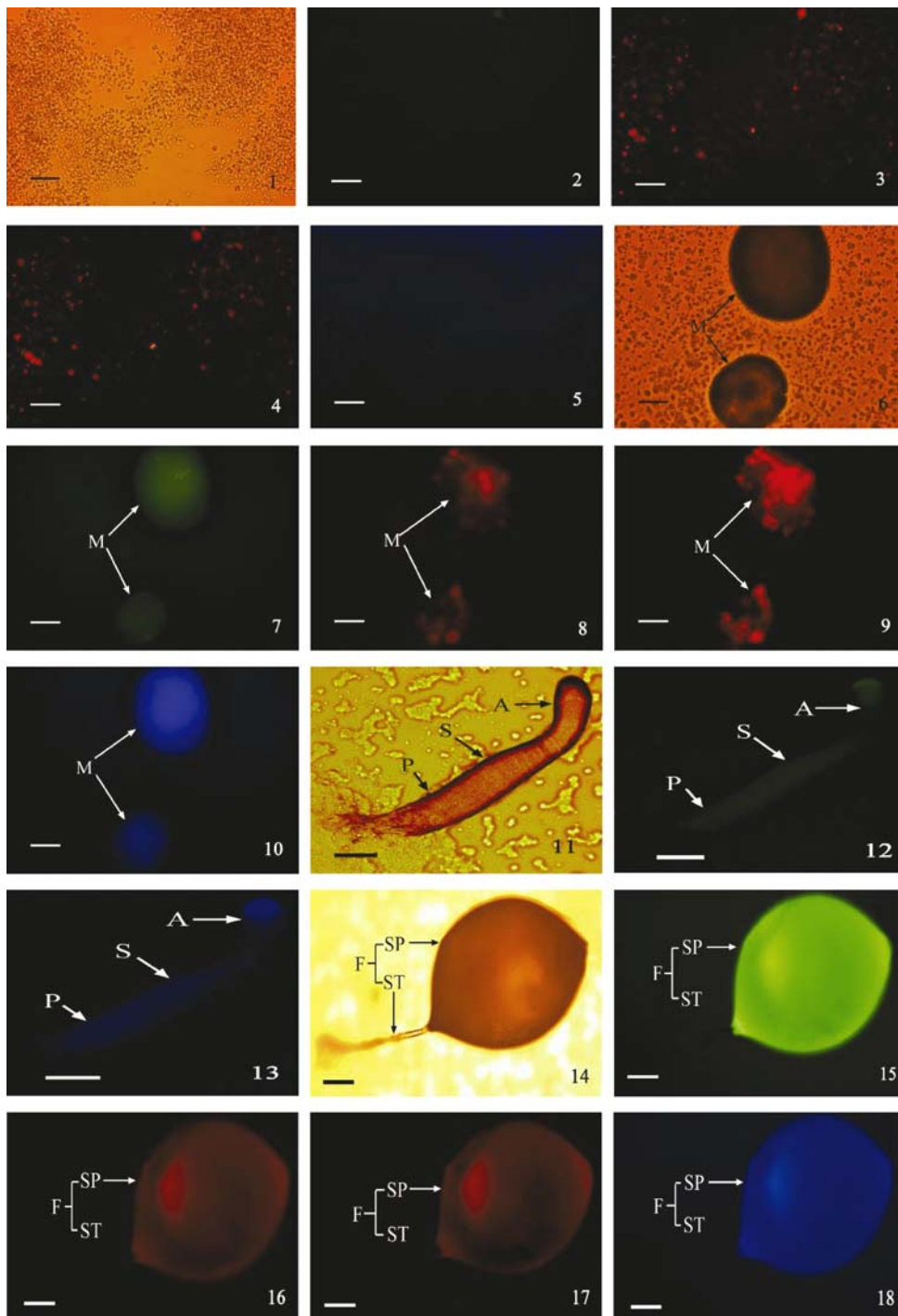
A: 前段; F: 子实体; M: 细胞丘; P: 后段; S: 蛞蝓体; SP: 孢子囊; ST: 柄。

A: Anterior; F: Fruiting body; M: Mound; P: Posterior; S: Slug; SP: Spore capsule; ST: Stalk.

薛德明: 盘基网柄菌野生型 KAx-3 发育过程中自发荧光的观察
XUE De-Ming: Autofluorescence of KAx-3 Cells during Development
in Wild Type *Dictyostelium discoideum*

图版 I

Plate I



图版说明见文后