

# 荧光定量检测细胞绿色荧光蛋白技术的建立与应用

张 垚, 余冰菲, 陈瑞川, 刘润忠\*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 绿色荧光蛋白是在生化与分子生物学研究领域普遍使用的一种基因表达报告系统显色物. 对于细胞内绿色荧光蛋白表达水平的定量检测, 目前尚缺乏一套准确、简便、易行的技术. 本文以增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 为报告基因, 用分子量为 25 ku 的线性聚乙烯亚胺介导进入 HeLa 细胞并表达. 利用多功能酶标仪测定细胞裂解液的荧光强度, 结果显示: 这种新方法测定的荧光强度能很好反映细胞中 EGFP 的蛋白表达水平, 并在短时间内完成对 EGFP 表达水平的定量检测. 该方法简单有效, 且不依赖于大型仪器设备, 具有较高的准确性与灵敏度, 在实际应用中简便可靠, 具有推广应用的意义.

**关键词:** 绿色荧光蛋白; 定量检测; HeLa 细胞; 表达水平

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008) S2-0264-04

细胞转染被广泛地应用于生物科学研究的各个领域, 是各种研究方法中不可或缺的技术手段之一. 近年来, 越来越多的实验室加入到开发新型转染试剂的行列中, 各种各样的转染方法也应运而生, 非病毒载体聚乙烯亚胺 (polyethylene PEI) 就是其中之一. 作为一种阳离子多聚物, PEI 具有毒性低, 转染效率高等优点, 其中 25 ku 线性 PEI 被认为是最有望用于基因治疗的载体之一<sup>[1-2]</sup>.

随着转染技术的不断发展, 如何准确、快速的检测外源蛋白表达水平逐渐成为科学家们所关注的问题. 从水母体内提取的绿色荧光蛋白 (GFP) 是一种重要的显色物质, 其突出的优点是在紫外线或蓝光的激发下可发出绿光, 而不需要任何底物或辅助因子<sup>[3]</sup>. 而且 GFP 具有表达稳定、无种间特异性等优点, 因此被广泛地应用于基因表达的检测. 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 是一种最佳化的 GFP 突变型<sup>[4]</sup>, 在体外转染后, 可通过荧光显微镜直接观察或用流式细胞仪定量检测<sup>[5]</sup>. 但是, 这两种检测方法都有其局限性, 荧光显微镜检测存在主观性强、无法定量检测等缺陷, 而流式细胞仪检测则存在对仪器设备要求高, 操作程序繁琐等缺点.

本研究的目的在于建立一套快速、准确、简便的 EGFP 定量检测技术.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

线性 PEI (25 ku, Polysciences 公司) 用 pH 7.9 的 HEPES 缓冲液 (25 mmol/L, 含 150 mmol/L NaCl) 配制成 2.5 mg/mL 的贮存液, 无菌过滤后于 -20℃ 保存. pEGFP-N1 质粒为 Clontech 公司产品, DMEM 和新生小牛血清等为 Gibco 产品, 抗 GFP 和  $\beta$ -Actin 抗体购自 Santa Cruz 公司, 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、乙基苯基聚乙二醇 (NP-40) 以及其它试剂均为 Merck 或 Amresco 分析纯级试剂. 荧光测定采用 Spectramax M2 型多功能酶标仪 (美国), 荧光观察采用 DM RB 型荧光显微镜 (Leica), HeLa 细胞为本实验室保存. PEI/DNA 反应缓冲液 A 配方为 150 mmol/L NaCl; PEI/DNA 反应缓冲液 B 配方为 25 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.1; PEI/DNA 反应缓冲液 C 配方为 25 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, pH 7.1; PEI/DNA 反应缓冲液 D 配方为 DMEM.

### 1.2 细胞培养与转染

HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃ 及 5% 二氧化碳条件下培养. 转染前, 将细胞 ( $6 \times 10^5$  细胞/孔) 接种于六孔板中, 培养 24 h 后用于转染, 细胞密度为 70% ~ 90%. 转染前换加 2 mL 新鲜培养基. 2  $\mu$ g DNA 与一定量 PEI (按 PEI/DNA = 5  $\mu$ g : 1  $\mu$ g 的比例添加, 特殊说明除外) 各用 50  $\mu$ L PEI/DNA 反应缓冲液 (如没有特殊说明, 配方均为 25 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.1) 稀释, 将稀释后的 PEI 逐滴加入 DNA 溶液中, 立即振荡混匀, 室温静置

收稿日期: 2008-09-25

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目 (J0630649), 国家自然科学基金 (30670408, 30572077), 福建省自然科学基金 (2008J0108) 资助

\* 通讯作者: liuz@xmu.edu.cn

30 min后,将混合液加到铺有细胞的六孔板中,摇动混匀后于 5%二氧化碳的培养箱中 37℃培养,24 h后换新鲜培养基,48 h后进行细胞裂解。

### 1.3 全细胞裂解液的制备

在细胞转染 48 h后,吸去培养液,用 PBS清洗两次,六孔板的每个孔加入 1 mL细胞裂解缓冲液(10 mmol/L HEPES pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40),冰上静置 15 min后,将孔中液体连同细胞碎片一起转移至 1.5 mL离心管中,在 4℃、14 000 r/min条件下离心 10 min,取上清液作为样品待用。

### 1.4 样品荧光强度的测定与计算

使用多功能酶标仪在激发光为 485 nm,发射光为 533 nm的条件下检测样品的荧光强度。对照组为不含 EGFP的全细胞裂解液。样品的荧光强度根据公式计算: 荧光强度 = (转染组荧光强度 - 非转染组荧光强度) / 非转染组荧光强度。

### 1.5 免疫印记试验(Western blot)

常规 SDS-PAGE电泳结束后,将 PAGE胶上的蛋白质转移到 PVDF膜上,随后进行 Western blot分析,具体步骤见参考文献[6]。

## 2 实验结果

### 2.1 绿色荧光蛋白定量检测技术的建立

用 pEGFP-N1转染细胞,并设不做任何处理的对照组,48 h后,在光学显微镜下观察并拍照,然后加入

1 mL细胞裂解缓冲液,作用 15 min后,再次观察拍照,并制备全细胞裂解液。结果表明(图 1A),在使用细胞裂解缓冲液处理前,细胞贴壁良好,生长状况正常。在细胞裂解缓冲液作用 15 min中后,原先贴壁的细胞全部漂浮起来,并且已经明显破裂,说明本处理方法能有效裂解细胞,使胞浆蛋白释放。

从相关的研究报道得知,EGFP的激发光波长和发射光波长分别为 488 nm和 530 nm<sup>[7]</sup>。为了确定用于测定样品荧光强度的最适波长,我们分别对含 EGFP的全细胞裂解液和普通全细胞裂解液进行了波长扫描分析(图 1B和 C)。首先,我们固定激发光波长为 488 nm,对发射光进行了 525~535 nm波段的扫描。由图 1B可看出,选取 530 nm作为发射光波长可使背景干扰降低到一个可接受的程度。因此我们固定发射光为 530 nm,反过来对激发光进行了 475~488 nm波段的扫描分析(图 1C)。经过不同波长的结果比对,在最大限度的消除背景干扰而又能准确的反映 EGFP蛋白水平前提下,我们设定激发光波长为 485 nm、发射光波长为 533 nm作为荧光测定的参数。

为了分析 EGFP蛋白浓度与荧光强度之间的关系,我们用普通全细胞裂解液连续稀释含 EGFP的全细胞裂解液,得到了一系列 EGFP蛋白浓度成倍减少的样品,测定荧光强度,并绘制标准曲线(图 1D)。结果显示 EGFP的蛋白浓度与荧光强度之间有着良好的线性关系,  $R^2 = 0.9989$ 至此,EGFP定量检测方法的建立已经初步完成。

### 2.2 验证方法的可靠性

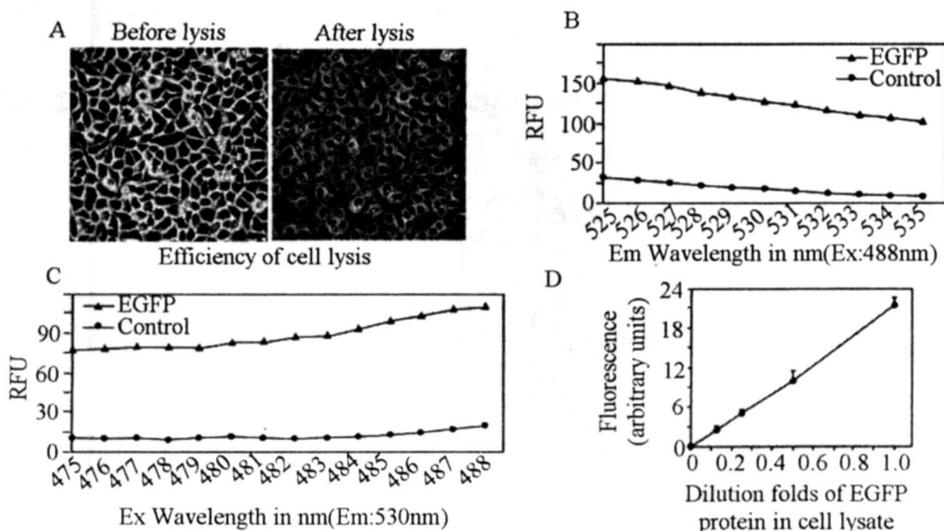


图 1 绿色荧光蛋白定量检测技术的建立

A. 细胞裂解缓冲液的裂解能力分析。左边为裂解前的细胞,右边为裂解缓冲液作用 15 min后的细胞;  
B. 发射光的波长扫描分析; C. 激发光的波长扫描分析; D. 标准曲线

Fig. 1. Established a new method to quantitatively measure the EGFP protein level of cells

转染不同量的 pEGFP-N1(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 μg), 用空载体质粒 DNA 补齐至总 DNA 量为 2 μg. 48 h 后在荧光显微镜下观察并拍照 (图 2A), 其中各组细胞密度均为 100%, 随后制备全细胞裂解液测定各样品的荧光强度 (图 2B), 并用 western blot 分析 EGFP 在各样品中的含量 (图 2C). 结果分析表明, 图 2 中的各种检测方法都获得了一致的结果, 即随着 pEGFP-N1 转染量的增加, EGFP 的表达水平逐渐上升.

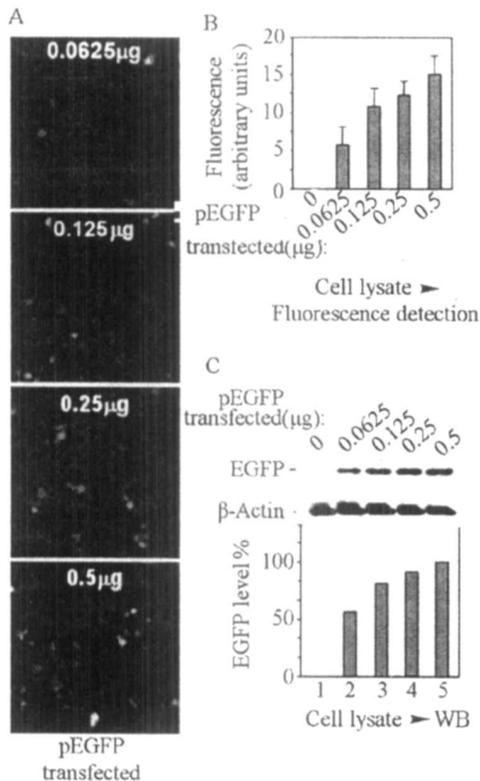


图 2 pEGFP-N1 转染量对 EGFP 蛋白表达量的影响  
A. HeLa 细胞在不同 pEGFP-N1 转染量下的荧光显微镜照片; B. 全细胞裂解液的荧光测定分析; C. 全细胞裂解液的 Western blot 分析

Fig 2 The EGFP protein level at varying pEGFP-N1 concentration

### 2.3 使用新方法测定各转染条件下蛋白表达量的变化

采用不同反应缓冲液 (PEI/DNA 反应缓冲液 A、B、C、D) 作为 PEI 的溶媒, 转染后检测细胞荧光强度 (图 3A). 该结果显示在以 25 mmol/L HEPES+ 150 mmol/L NaCl 作为反应缓冲液条件下 EGFP 的蛋白表达水平最高. 在图 3B 中, 我们研究了 PEI/DNA 比例对 EGFP 表达水平的影响, 结果分析显示, 随着 PEI/DNA 比例的增大, 细胞的荧光强度也逐渐增大, 蛋白表达水平逐渐升高.

### 3 讨论

在体外转染实验中, 人们往往需要了解细胞内的外源蛋白表达水平, 从而根据实际情况对转染条件做出相应调整, 而通过细胞计数等传统的转染效率检测方法只能在一定程度上反映细胞内的外源蛋白表达水平, 这是因为外源蛋白表达水平不仅仅和转染效率密切相关, 还与细胞转染质粒的拷贝数有关. 因此, 通过检测转染效率并不能很好的反映细胞中的蛋白表达水平.

本研究目的在于建立一套通过测定细胞的荧光强度从而快速定量 EGFP 表达水平的方法, 与传统的转染效率检测方法相比, 它能够客观准确地反映细胞中的蛋白表达水平, 且不需要依赖大型仪器就能在短时间内实现对 EGFP 的定量检测.

我们的研究结果显示, 样品的荧光强度与 EGFP 蛋白浓度间有很好的线性关系 (图 1D), 说明可以使用样品的荧光强度来衡量 EGFP 的蛋白表达水平, 这是我们建立这个新方法的基础.

使用不同的检测方法与新方法进行比较 (图 2), 显示了新建方法的可靠性. 结果分析显示, 根据新

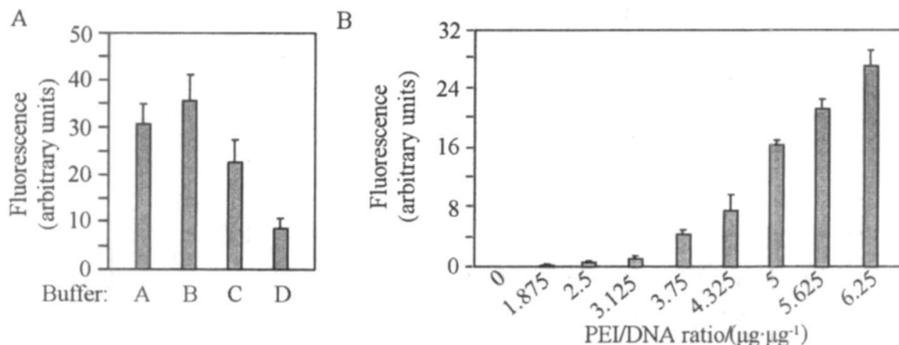


图 3 各转染条件下 EGFP 表达量的变化 A. PEI/DNA 反应缓冲液对 EGFP 表达量的影响; B. PEI/DNA 比例对 EGFP 表达量的影响

Fig 3 Variance of EGFP protein level under different conditions

方法测定的样品荧光强度与荧光显微镜下观察的结果相符(图 2A 和 B), 说明按照新方法所测定的荧光强度可以真实反映细胞中实际荧光水平. 而且, Western blot的结果也从另一个角度证明了新方法的准确性(图 2C). 通过图 2B与图 2C的比较可看出, 荧光强度能很好地反映细胞中 EGFP的表达水平, 因此, 使用荧光强度来作为衡量 EGFP表达水平的指标是合理可行的.

在新建方法的实际应用中, 也获得了令人满意的效果. 图 3A反映了不同转染条件下 EGFP表达水平的变化. 从图中可看出, 在 25 mmol/L HEPES+ 150 mmol/L NaCl作为反应缓冲液时, 蛋白表达水平最高, 而在 DMEM作为反应缓冲液时则较低. 从而说明新方法可以检测出各转染条件下蛋白表达水平的细微差别, 证明了该方法具有较高的灵敏度. 在图 3B中, 我们使用新方法比较了不同 PEI/DNA比例下的蛋白表达水平, 发现随着 PEI/DNA比例的增大, 蛋白表达水平也逐渐升高, 这与 Huh等的研究结果一致<sup>[7]</sup>.

经过一系列研究, 我们最终建立了一套通过定量检测细胞荧光强度从而测定 EGFP表达水平的方法. 在以往的报道中, 曾有人使用过类似的方法来检测不同细胞内的 EGFP表达水平<sup>[8-9]</sup>. 但是由于 EGFP在各种微环境中的吸收光谱会发生不同程度的漂移, 因此这些方法并不适合用于检测动物细胞中的蛋白表达水平. 我们所建立的这套方法主要针对动物细胞内的蛋白表达水平检测, 并已经在 HeLa细胞中得到了很好的应用, 具有推广和改进的价值.

## 参考文献:

- [1] Godbey W T, Wu K K, Mirkos A G. Poly(ethylene imine) and its role in gene delivery [J]. *J Control Release*, 1999, 60(2/3): 149-160.
- [2] Godbey W T, Mirkos A G. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes [J]. *J Control Release*, 2001, 72(1/2/3): 115-125.
- [3] Gerdes H H, Kaether C. Green fluorescent protein applications in cell biology [J]. *FEBS Lett*, 1996, 389(1): 44-47.
- [4] Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227(3): 707-711.
- [5] Gerena-Lopez Y, Nolan J, Wang L, et al. Quantification of EGFP expression on Molt-4 T cells using calibration standards [J]. *Cytometry A*, 2004, 60(1): 21-28.
- [6] Chen R, Liu M, Li H, et al. PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca<sup>2+</sup> signaling [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10): 1356-1368.
- [7] Huh SH, Do H J, Lim H Y, et al. Optimization of 25 kD linear polyethylene imine for efficient gene delivery [J]. *Biologicals*, 2007, 35(3): 165-171.
- [8] 刘胜敏, 韩冰, 刑新会. 荧光蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达 [J]. *清华大学学报: 自然科学版*, 2007, 47(6): 874-877.
- [9] 苟吉庆, 李敏, 张锐, 等. 利用荧光分光光度计定量分析 GFP基因的表达水平 [J]. *生物技术通报*, 2001, 4(5): 165-171.

# Method for Fluorescent Quantification of Cellular Green Fluorescence Protein and Its Application

ZHANG Kai, YU Bing-fei, CHEN Rui-Chuan, LU Run-zhong\*

(School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Green Fluorescence Protein(GFP), a material of reporter gene expression system, was widely utilized in the different fields of biological research. However, it is difficult to quantitatively measure the GFP level of cells in a simple and effective way. In this study, we set up an easy, sensitive and efficient method. Enhanced Green Fluorescence Protein(EGFP) was transfected into HeLa cells by 25 ku linear polyethylene imine. After preparation of cell lysate, the fluorescence intensity of expressed EGFP can be detected by multifunctional microplate reader without the utilization of expensive apparatus. Our results indicated that the new method is highly stable and precise in application and allows sensitive detection of protein level in HeLa cells. It has been well proved that the fluorescence intensity of EGFP is consistent with the protein level in cells.

**Key words** green fluorescence protein; quantitatively measure; HeLa cell; protein level