



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110596366 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201910726300.0

(22)申请日 2019.08.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110596366 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(73)专利权人 四川大学华西医院

地址 610000 四川省成都市武侯区国学巷
37号

(72)发明人 龙丹 周彦妮 冯莉 陈雪璐

李胜富

(74)专利代理机构 成都市集智汇华知识产权代

理事务所(普通合伙) 51237

代理人 沈璐蓓

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 109187146 A,2019.01.11,权利要求1-
10,说明书0062-0083段,实施例2.

CN 103048470 A,2013.04.17,全文.

CN 104961818 A,2015.10.07,全文.

CN 107988150 A,2018.05.04,全文.

CN 102901817 A,2013.01.30,

Christine Sansome et al..Hypoxia
death stimulus induces translocation of
p53 protein to mitochondria Detection by
immunofluorescence on whole cells.《FEBS
Letters》.2001,第488卷

Florence Malka et al..The
Mitochondria of Cultured Mammalian Cells.
《Methods in Molecular Biology》.2007,第372
卷

审查员 刘彦宁

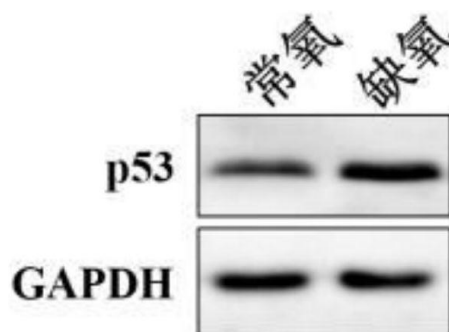
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测
方法及其试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒,检测方法包括:制备细胞爬片,清洗;用细胞固定液固定,清洗;用细胞封闭液封闭;加入一抗孵育,漂洗;一抗为与p53蛋白结合的抗体和与线粒体结合的抗体;加入荧光标记的二抗染色,孵育,清洗;细胞核荧光染料复染,清洗;封片,用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果;荧光图片叠加分析,仅破细胞膜,不破核膜,可避开核内信号干扰,实现p53蛋白与线粒体共定位,为蛋白的线粒体定位及蛋白与其它非核细胞器定位研究提供依据和参考。



1. 一种非疾病的诊断和治疗目的p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法,其特征在于,包括:

(1) 制备细胞爬片,清洗;

(2) 用4%多聚甲醛固定,清洗;用0.005%~0.01%Triton-X 100通透,清洗;

(3) 用细胞封闭液封闭;

(4)

加入与p53蛋白结合的抗体,孵育,漂洗;

用0.1%Triton-X 100通透,清洗;

加入与线粒体结合的抗体,孵育,漂洗;

(5) 加入荧光标记的二抗染色,孵育,清洗;

(6) 细胞核荧光染料复染,清洗;

(7) 封片,用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果;

(8) 荧光图片叠加分析。

2. 根据权利要求1所述的免疫荧光检测方法,其特征在于,所述制备细胞爬片过程具体包括:细胞于1%氧浓度缺氧条件下培养。

3. 根据权利要求1所述的免疫荧光检测方法,其特征在于,所述与p53蛋白结合的抗体为抗p53抗体,所述线粒体结合的抗体为抗葡萄糖调节蛋白75抗体。

4. 根据权利要求1所述的免疫荧光检测方法,其特征在于,所述荧光标记的二抗为荧光标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG。

5. 根据权利要求1所述的免疫荧光检测方法,其特征在于,所述细胞核荧光染料为DAPI。

一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学和生物技术领域,具体涉及一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 真核细胞具有复杂的亚细胞结构,已发现数十种细胞器,每种细胞器都有一组特定的蛋白。真核细胞除叶绿体,线粒体能少量合成蛋白外,绝大部分蛋白是在胞浆或粗糙内质网合成,最终运送到不同地点,形成成熟蛋白并行使功能。蛋白质在细胞内的定位问题,是细胞生物学的中心问题,也是分子生物学的热门话题。

[0003] 目前,蛋白质在细胞内的定位问题还存在许多难点,表现在:细胞器不同,相应的靶向蛋白的定位过程也不同,有些蛋白质并不是固定存在于单个亚细胞位置上,而是动态的在多个亚细胞位置间转运。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本申请提供一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒,仅破细胞膜,不破核膜,可避开核内信号干扰,实现p53蛋白与线粒体共定位,为蛋白的线粒体定位及蛋白与其它非核细胞器定位研究提供依据和参考。

[0005] 为解决以上技术问题,本申请提供的技术方案是一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法,包括:

- [0006] (1) 制备细胞爬片,清洗;
- [0007] (2) 用细胞固定液固定,清洗;
- [0008] (3) 用细胞封闭液封闭;
- [0009] (4) 加入一抗,孵育,漂洗;一抗为与p53蛋白结合的抗体和与线粒体结合的抗体;
- [0010] (5) 加入荧光标记的二抗染色,孵育,清洗;
- [0011] (6) 细胞核荧光染料复染,清洗;
- [0012] (7) 封片,用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果;
- [0013] (8) 荧光图片叠加分析。
- [0014] 优选的,所述制备细胞爬片过程具体包括:细胞于1%氧浓度缺氧条件下培养。
- [0015] 优选的,所述与p53蛋白结合的抗体为抗p53抗体,所述线粒体结合的抗体为抗葡萄糖调节蛋白75抗体。
- [0016] 优选的,所述荧光标记的二抗为山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG。
- [0017] 优选的,所述细胞核荧光染料为DAPI。
- [0018] 优选的,所述细胞封闭液为0.1%BSA。
- [0019] 优选的,所述封片过程具体为:采用抗荧光淬灭封片剂封片。
- [0020] 优选的,所述细胞固定液选自甲醇和丙酮的混合液、甲醇和多聚甲醛任意一种。
- [0021] 优选的,所述免疫荧光检测方法具体包括:

[0022] (1) 制备细胞爬片,清洗;用4%多聚甲醛固定,清洗;

[0023] (2) 用0.005%~0.01%Triton-X 100通透,清洗;

[0024] (3) 用0.1%BSA封闭;

[0025] (4)

[0026] 加入与p53蛋白结合的抗体,孵育,漂洗;

[0027] 用0.1%Triton-X 100通透,清洗;

[0028] 加入与线粒体结合的抗体,孵育,漂洗;

[0029] (5) 加入荧光标记的二抗染色,孵育,清洗;

[0030] (6) 细胞核荧光染料复染,清洗;

[0031] (7) 封片,用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果;

[0032] (8) 荧光图片叠加分析。

[0033] 本发明还提供了一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测试剂盒,包括:洗涤液、细胞固定液、细胞封闭液、一抗、荧光标记的二抗和细胞核荧光染料;所述一抗为与p53蛋白结合的抗体和与线粒体结合的抗体。

[0034] 优选的,所述细胞固定液选自甲醇和丙酮的混合液、甲醇和多聚甲醛任意一种。

[0035] 优选的,所述试剂盒还包括:细胞膜与细胞核膜通透液,所述细胞膜与细胞核膜通透液为0.005%Triton-X 100、0.01%Triton-X 100和0.1%Triton-X 100。

[0036] 优选的,所述试剂盒还包括:抗荧光淬灭封片剂。

[0037] 本发明“%”是体积百分比。

[0038] 本申请与现有技术相比,其详细说明如下:

[0039] 多种核定位蛋白被发现不仅在核内表达,还可定位至其它细胞器。在不同组织和细胞中,多种应激均可诱导p53进入线粒体;缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α) 不仅可定位线粒体,还可定位至过氧化物酶体;糖皮质激素受体、STAT3等也可在应激条件下进入线粒体。核定位蛋白进入其它细胞器中行使功能已成为研究热点,然而在研究这些蛋白在非核细胞器中的表达时,仍存在以下问题:①分离纯化细胞器难度大,一方面易受到核蛋白和胞质蛋白污染,另一方面细胞器的纯化多是基于梯度离心分离质量不同的细胞器,线粒体和核糖体质量相近,难以分离,且线粒体本身分重线粒体和轻线粒体,梯度离心中易造成轻线粒体的丢失;②即使获得纯度较高的细胞器,由于不同细胞器的得率不同,难以准确地反映蛋白在细胞不同亚结构间的表达比例;③理想状态下,采用免疫荧光可通过标记不同细胞器从而观察到目标蛋白在这些细胞器中的分布比例,然而可能因为蛋白在核内信号太强,导致无法捕捉到细胞器中的信号。Marchenko团队报道其在首次研究p53在线粒体中的定位时,因为核内信号过强掩盖了胞质信号,因此未能通过免疫荧光捕捉到内源性p53与线粒体的共定位。

[0040] 而本发明提供了检测p53蛋白与线粒体共定位的免疫荧光优化方案,通过不同固定方式,不同通透条件对破膜程度的影响,提供了仅破细胞膜,不破核膜的条件,可避开核内信号干扰,实现p53蛋白与线粒体共定位,为蛋白的线粒体定位及蛋白与其它非核细胞器定位研究提供依据和参考。具体的,本发明采用缺氧处理细胞,上调p53蛋白表达,两种一抗分别用于检测p53蛋白和线粒体,甲醇和丙酮混合液、甲醇固定,或使用4%多聚甲醛固定并结合结合2次通透,第一次低浓度通透标记 p53蛋白后二次重新通透细胞器膜,以便标记线

粒体,均可有效避免核内信号,检测到p53蛋白和线粒体的共定位。

[0041] 本发明检测方法和试剂盒,用于p53蛋白和线粒体共定位,结果清晰可见,特异性好,敏感性强,稳定性好。

附图说明

[0042] 图1为免疫印迹蛋白免疫印迹反应的显影图;

[0043] 图2为免疫印迹蛋白表达量统计对比图;

[0044] 图3为实施例1~实施例3抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0045] 其中,

[0046] 图3A为实施例1常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3B为实施例1常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3C为图3A和图3B的叠加;

[0047] 图3a为实施例1缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3b为实施例1缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3c为图3a和图3b的叠加;

[0048] 图3D为实施例2常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3E为实施例2常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3F为图3D和图3E的叠加;

[0049] 图3d为实施例2缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3e为实施例2缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3f为图3d和图3e的叠加;

[0050] 图3G为实施例3常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3H为实施例3常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3I为图3G和图3H的叠加;

[0051] 图3g为实施例3缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3h为实施例3缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3i为图3g和图3h的叠加;

[0052] 图4为实施例4~实施例7抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0053] 其中,

[0054] 图4A为实施例4常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4B为实施例1常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4C为图4A和图4B的叠加;

[0055] 图4a为实施例4缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4b为实施例1缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4c为图4a和图4b的叠加;

[0056] 图4D为实施例5常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4E为实施例2常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4F为图4D和图4E的叠加;

[0057] 图4d为实施例5缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4e为实施例2缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4f为图4d和图4e的叠加;

[0058] 图4G为实施例6常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4H为实施例3常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4I为图4G和图4H的叠加;

[0059] 图4g为实施例6缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4h为实施例3缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4i为图4g和图4h的叠加;

[0060] 图4J实施例7常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4K为实施例7常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4L为图4J和图4K的叠加;

[0061] 图4j为实施例7缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4k为实施例7缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4l为图4j和图4k的叠加;

[0062] 图5为实施例8~实施例9抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0063] 其中,

[0064] 图5A为实施例8常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5B为实施例1常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5C为图5A和图5B的叠加;

[0065] 图5a为实施例8缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5b为实施例1缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5c为图5a和图5b的叠加;

[0066] 图5D为实施例9常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5E为实施例2常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5F为图5D和图5E的叠加;

[0067] 图5d为实施例9缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5e为实施例2缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5f为图5d和图5e的叠加。

具体实施方式

[0068] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0069] 下述试验中“%”是体积百分比。

[0070] 一、细胞及试剂:

[0071] 人宫颈癌细胞系(HeLa)购自中科院上海细胞库;

[0072] MEM购自Gibco;

[0073] 胎牛血清(Biological Industries);DAPI、多聚-D-赖氨酸(PDL)购自Sigma Aldrich;

[0074] 细胞裂解液购自ThermoFisher;

[0075] 抗葡萄糖调节蛋白75(Grp75)抗体、山羊抗小鼠IgG(H+L)(DyLight550)、山羊抗兔IgG(H+L)(AlexaFluor488)购自Abcam;

[0076] 抗p53抗体购自Proteintech;

[0077] 抗GAPDH抗体购自CST;

[0078] 超敏ECL显色剂购自四正柏。

[0079] 二、细胞的培养

[0080] 常氧组细胞:人宫颈癌细胞系(HeLa),用含10%胎牛血清的MEM培养基在培养箱中静置培养。

[0081] 缺氧组细胞:人宫颈癌细胞系(HeLa),于三气培养箱中,1%氧浓度缺氧条件下静置培养。

[0082] 三、免疫印迹检测了常氧组和缺氧组p53蛋白的表达

[0083] 试验方法:HeLa细胞缺氧24小时后与常氧组一起消化收集,免疫印迹检测p53表达变化,且使用内参GAPDH校正分析p53表达变化是否具有统计学意义,实验重复3次。

[0084] 试验过程:消化并收集常氧组和缺氧组细胞,PBS冲洗后加入适量裂解液超声破碎,离心,取上清,测定浓度;剩余液体加入上样缓冲液沸水浴;按20ug总蛋白量上样,SDS-

PAGE电泳后转膜,5%脱脂奶粉于37℃封闭1小时;使用5%脱脂奶粉按体积比1:500稀释抗p53抗体,体积比1:1000稀释抗GAPDH抗体,4℃过夜;TBST洗3次,10分钟/次;按1:1000稀释山羊抗兔IgG (H+L),37℃孵育1 小时,TBST洗3次,10分钟/次;显色:加入ECL显色剂曝光;放入化学发光仪中成像,观察免疫条带。

[0085] 四、免疫荧光

[0086] 一抗和荧光标记的二抗:

[0087] ①抗p53抗体,1%BSA体积比1:200稀释使用;

[0088] ②抗Grp75抗体,1%BSA体积比1:50稀释使用;

[0089] ③山羊抗小鼠IgG (H+L) (DyLight550),1%BSA体积比1:400稀释使用;

[0090] ④山羊抗兔IgG (H+L) (AlexaFluor488),1%BSA体积比1:500。

[0091] 检测方法:

[0092] (1) 制备细胞爬片,清洗:

[0093] (2) 用细胞固定液固定,清洗;

[0094] (3) 用细胞封闭液封闭:

[0095] (4) 加入一抗,孵育,漂洗;一抗为与p53蛋白结合的抗体和与线粒体结合的抗体;

[0096] (5) 加入荧光标记的二抗染色,孵育,清洗;

[0097] (6) 细胞核荧光染料复染,清洗;

[0098] (7) 封片,用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果;

[0099] (8) 荧光图片叠加分析。

[0100] 实施例1

[0101] (1) 制备细胞爬片,清洗:

[0102] A) 制备细胞爬片:

[0103] 常氧组细胞:将14mm细胞爬片 (NEST) 置于24孔板中,使用PDL包被5 分钟后无菌去离子水洗2次并自然干燥;将细胞消化后重悬,按 5×10^4 /孔计算加入到孔板中,十字摇匀后放入培养箱中静置培养,培养24小时后确认细胞贴壁并完全伸展开。

[0104] 缺氧组细胞:将14mm细胞爬片 (NEST) 置于24孔板中,使用PDL包被5 分钟后无菌去离子水洗2次并自然干燥;将细胞消化后重悬,按 5×10^4 /孔计算加入到孔板中,十字摇匀后放入1%氧浓度的三气培养箱中缺氧静置培养24小时。

[0105] B) 清洗:

[0106] 使用PBS涮洗爬片2次。

[0107] (2) 加入甲醇和丙酮混合液 (甲醇和丙酮体积比1:1) 10~30℃固定10min,PBS 洗3次,10分钟/次;

[0108] (3) 使用1%BSA于37℃封闭30分钟:

[0109] (4) 加入一抗①、②,于湿盒中4℃孵育过夜;PBS洗10分钟,3次;

[0110] (5) 加入荧光标记的二抗③、④染色,湿盒内37℃孵育1小时;PBS洗10 分钟,3次;

[0111] (6) 加入DAPI (1ug/ml) 染色5分钟,PBS洗10分钟,2次;

[0112] (7) 使用抗荧光淬灭封片剂封片,用共聚焦显微镜 (Nikon) 观察染色结果;

[0113] (8) 荧光图片叠加分析。

[0114] 实施例2

- [0115] 和实施例1的区别仅在于：
- [0116] 步骤(2)：加入甲醇在4℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次。
- [0117] 实施例3
- [0118] 和实施例1的区别仅在于：
- [0119] 步骤(2)：
- [0120] A) 加入4%多聚甲醛10~30℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次；
- [0121] B) 用0.1%Triton-X 100通透，PBS洗3次，10分钟/次；
- [0122] 步骤(3)：将细胞爬片置于载玻片上，放入湿盒中，使用1%BSA于37℃封闭30分钟。
- [0123] 实施例4
- [0124] 和实施例3的区别仅在于：
- [0125] 步骤(2)：
- [0126] A) 加入4%多聚甲醛10~30℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次；
- [0127] B) 用0.05%Triton-X 100通透，PBS洗3次，10分钟/次。
- [0128] 实施例5
- [0129] 和实施例3的区别仅在于：
- [0130] 步骤(2)：
- [0131] A) 加入4%多聚甲醛10~30℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次； B) 用0.025% Triton-X 100通透，PBS洗3次，10分钟/次。
- [0132] 实施例6
- [0133] 和实施例3的区别仅在于：
- [0134] 步骤(2)：
- [0135] 加入4%多聚甲醛10~30℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次；
- [0136] 用0.01%Triton-X 100通透，PBS洗3次，10分钟/次。
- [0137] 实施例7
- [0138] 和实施例3的区别仅在于：
- [0139] 步骤(2)：
- [0140] A) 加入4%多聚甲醛10~30℃固定10min，PBS洗3次，10分钟/次； B) 用0.005% Triton-X 100通透，PBS洗3次，10分钟/次。
- [0141] 实施例8
- [0142] 和实施例6的区别仅在于：
- [0143] 步骤(4)：
- [0144] A) 加入一抗①，于湿盒中4℃孵育过夜；PBS洗10分钟，3次；
- [0145] B) 用0.1%Triton-X 100通透，PBS洗10分钟，3次；
- [0146] C) 加入一抗②，于湿盒中4℃孵育过夜；PBS洗10分钟，3次。
- [0147] 实施例9和实施例7的区别仅在于：
- [0148] 步骤(4)：
- [0149] A) 加入一抗①，于湿盒中4℃孵育过夜；PBS洗10分钟，3次；
- [0150] B) 用0.1%Triton-X 100通透，PBS洗10分钟，3次；
- [0151] C) 加入一抗②，于湿盒中4℃孵育过夜；PBS洗10分钟，3次。

[0152] 五、试剂盒

[0153] p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测试剂盒,包括:

[0154] 洗涤液:PBS

[0155] 细胞固定液:选自甲醇和丙酮的混合液、甲醇和4%多聚甲醛中的任意一种。

[0156] 一抗:抗p53抗体,抗葡萄糖调节蛋白75抗体

[0157] 细胞封闭液:1%BSA

[0158] 一抗:①抗p53抗体,1%BSA1:200稀释使用;②抗Grp75抗体,1%BSA1:50 稀释使用;

[0159] 荧光标记的二抗:③山羊抗小鼠IgG (H+L) (DyLight550),1%BSA1:400 稀释使用;

[0160] ④山羊抗兔IgG (H+L) (AlexaFluor488),1%BSA1:500。

[0160] 细胞核荧光染料;DAPI;

[0161] 抗荧光淬灭封片剂。

[0162] 细胞固定液为4%多聚甲醛,试剂盒还包括:细胞膜与细胞核膜通透液,所述细胞膜与细胞核膜通透液为0.005%Triton-X 100、0.01%Triton-X 100和0.1%Triton-X 100。

[0163] 六、统计与分析

[0164] 用GRAPHPAD Prism7统计软件进行处理,数据用均值±标准误表示,采用双尾非配对t检验进行两两比较。

[0165] 七、试验结论

[0166] 图1为免疫印迹蛋白免疫印迹反应的显影图,图2为免疫印迹蛋白表达量统计对比图;

[0167] 图3为实施例1~实施例3抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0168] 其中,

[0169] 图3A为实施例1常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3B为实施例1常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3C为图3A和图3B的叠加;

[0170] 图3a为实施例1缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3b为实施例1缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3c为图3a和图3b的叠加;

[0171] 图3D为实施例2常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3E为实施例2常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3F为图3D和图3E的叠加;

[0172] 图3d为实施例2缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3e为实施例2缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3f为图3d和图3e的叠加;

[0173] 图3G为实施例3常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3H为实施例3常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3I为图3G和图3H的叠加;

[0174] 图3g为实施例3缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图3h为实施例3缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图3i为图3g和图3h的叠加;

[0175] 图4为实施例4~实施例7抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0176] 其中,

[0177] 图4A为实施例4常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4B为实施例4常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4C为图4A和图4B的叠加;

[0178] 图4a为实施例4缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4b为实施例4缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4c为图4a和图4b的叠加;

[0179] 图4D为实施例5常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4E为实施例5常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4F为图4D和图4E的叠加;

[0180] 图4d为实施例5缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4e为实施例5缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4f为图4d和图4e的叠加;

[0181] 图4G为实施例6常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4H为实施例6常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4I为图4G和图4H的叠加;

[0182] 图4g为实施例6缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4h为实施例6缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4i为图4g和图4h的叠加;

[0183] 图4J为实施例7常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4K为实施例7常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4L为图4J和图4K的叠加;

[0184] 图4j为实施例7缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图4k为实施例7缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图4l为图4j和图4k的叠加;

[0185] 图5为实施例8~实施例9抗p53抗体标记p53蛋白和抗Grp75抗体标记线粒体荧光图;

[0186] 其中,

[0187] 图5A为实施例8常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5B为实施例8常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5C为图5A和图5B的叠加;

[0188] 图5a为实施例8缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5b为实施例8缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5c为图5a和图5b的叠加;

[0189] 图5D为实施例9常氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5E为实施例9常氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5F为图5D和图5E的叠加;

[0190] 图5d为实施例9缺氧组细胞抗p53抗体标记p53蛋白荧光图片,图5e为实施例9缺氧组细胞抗Grp75抗体标记线粒体荧光图片,图5f为图5d和图5e的叠加。

[0191] 由图1~2可知,缺氧可显著上调p53表达,且使用内参GAPDH校正分析p53 表达变化,**表示 $p < 0.01$,具有高度统计学意义,可用于后续免疫荧光实验。

[0192] 图3~图5中,细胞抗p53抗体标记p53蛋白为绿色,抗Grp75抗体标记线粒体为红色,DAPI标记细胞核为蓝紫色,若p53进入线粒体,即共定位则为黄色或橙色。

[0193] 实施例1~3分别使用这3种固定液对常氧和缺氧处理后p53在细胞内的分布进行检测,考虑到混合液、甲醇具有较强的通透效果,因此,此实施例1~2不额外使用Triton通透,实施例3使用0.1%Triton通透。由图3可知,不同固定方式下,缺氧组信号均强于常氧组,与免疫印迹结果一致;4%多聚甲醛固定组信号主要在核内,胞质内几乎无信号,无明显蛋白与线粒体共定位;混合液和甲醇组核和胞质内均有信号,二者缺氧组均可观察到明显共定位,但混合液组共定位更为明显。

[0194] 因实施例34%多聚甲醛固定结合0.1%%Triton通透后p53信号主要在核内。因此,进行实施例4~7分析不同通透条件对p53分布检测的影响,降低Triton浓度使其破膜效

果减弱,或可其仅破细胞膜,而保持核膜完整,从而避开核内信号干扰。实施例4~7分别采用0.05%、0.025%、0.01%和0.005% Triton进行通透。由图4结果可知,0.05%和0.025% Triton通透后胞质内信号相对增强,但仅可观察到微弱的共定位;而使用0.01%和0.005% Triton通透后,核内无信号,仅胞质内可见信号,但线粒体标记失败。因此,低浓度Triton不仅未能通透核膜,也未能通透线粒体膜,从而导致抗Grp75抗体不能进入线粒体。

[0195] 实施例6-7结果显示0.01%和0.005% Triton可以规避核内信号,但也因此不能标记线粒体,因此我们进行实施例8~9尝试在孵育抗p53抗体后重新通透线粒体膜,以保证线粒体标记效果。图5结果显示:二次通透后,线粒体标记效果与其它各组相近,且可明显观察到p53与线粒体的共定位。

[0196] 结果显示:本发明甲醇、甲醇和丙酮混合液固定及4%多聚甲醛固定后结合适当浓度TritonX-100通透均可捕捉到p53与线粒体的共定位。其中,第一、甲醇和丙酮混合液固定后检测到的共定位信号最为明显。第二、甲醇、甲醇和丙酮混合液有显著通透效果,采用甲醇、甲醇和丙酮混合液固定,未使用破膜剂通透的情况下核内依然有明显信号。第三、使用4%多聚甲醛固定后需要结合适当低浓度的Triton X-100通透才可避开核内信号干扰,并需要二次通透保证线粒体的标记效果。尽管操作更为繁琐,但相比可显著捕捉到共定位的混合液固定仍有其优势,即可完全避免核内信号的干扰。究其原因:甲醇和混合液的穿透性强,或能较均匀的到达细胞内各个结构,从而均匀地作用于胞内多种膜结构,而TritonX-100的穿透力相对较弱,作为胞内最大的细胞器,加之核膜无复杂的折叠结构,核最易被TritonX-100 穿透,而线粒体内膜折叠成嵴,外膜与内质网等交联,可能不易均匀地被通透。以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

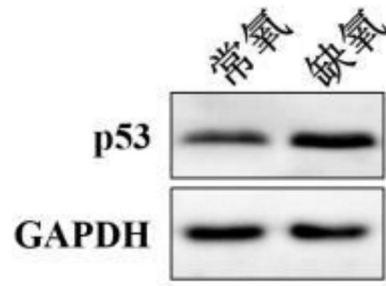


图1

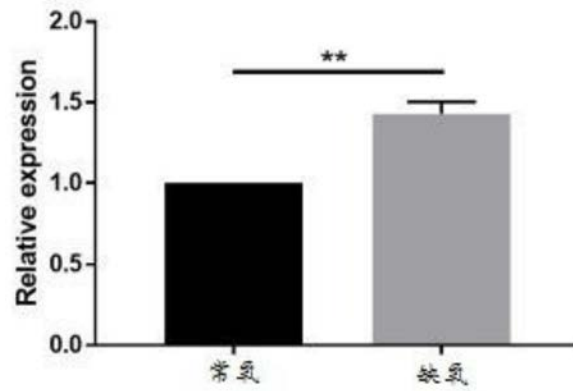


图2

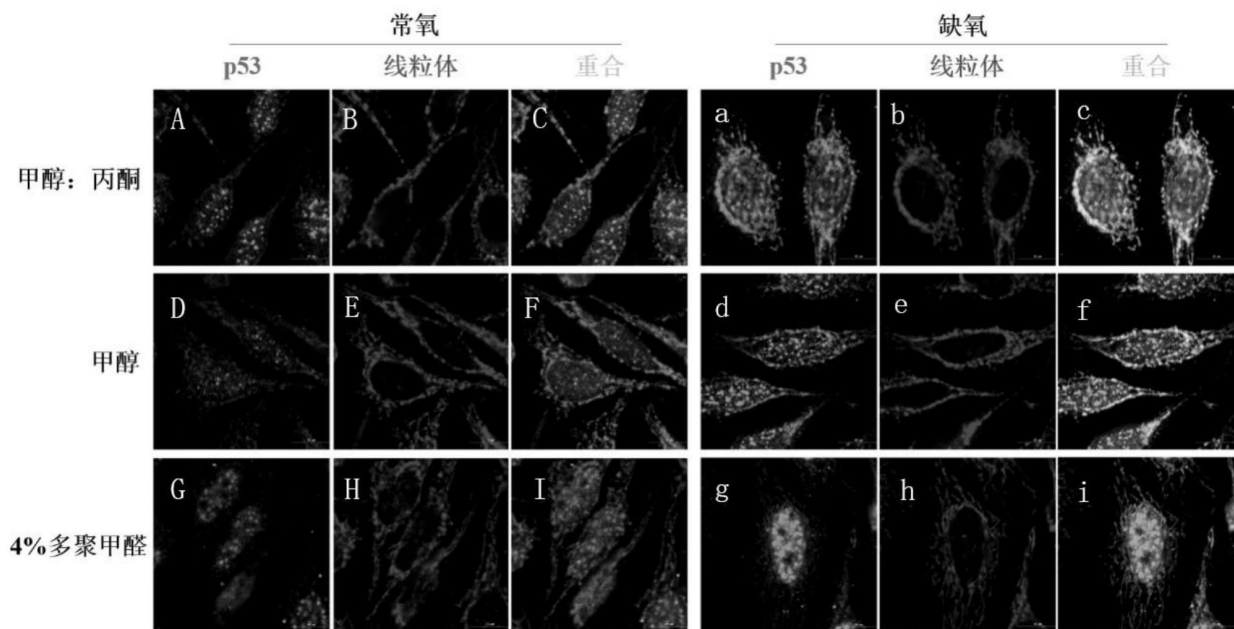


图3

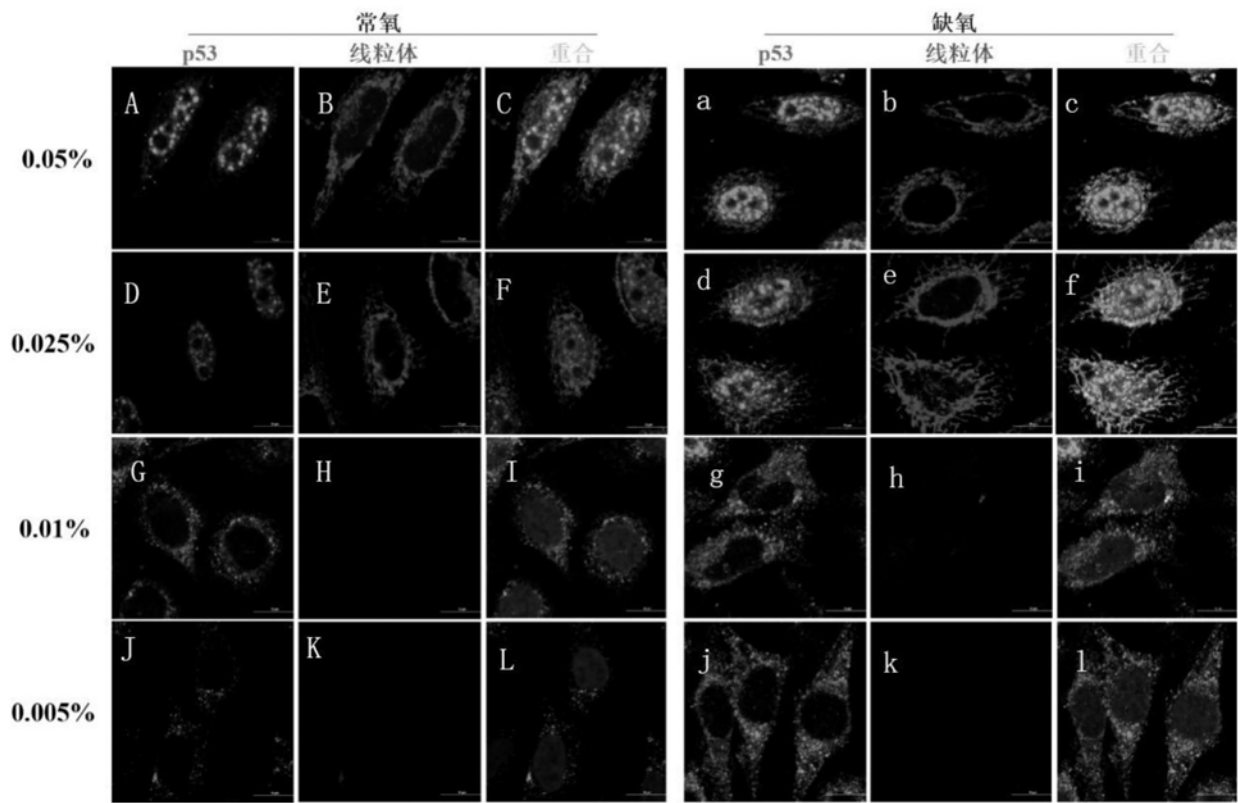


图4

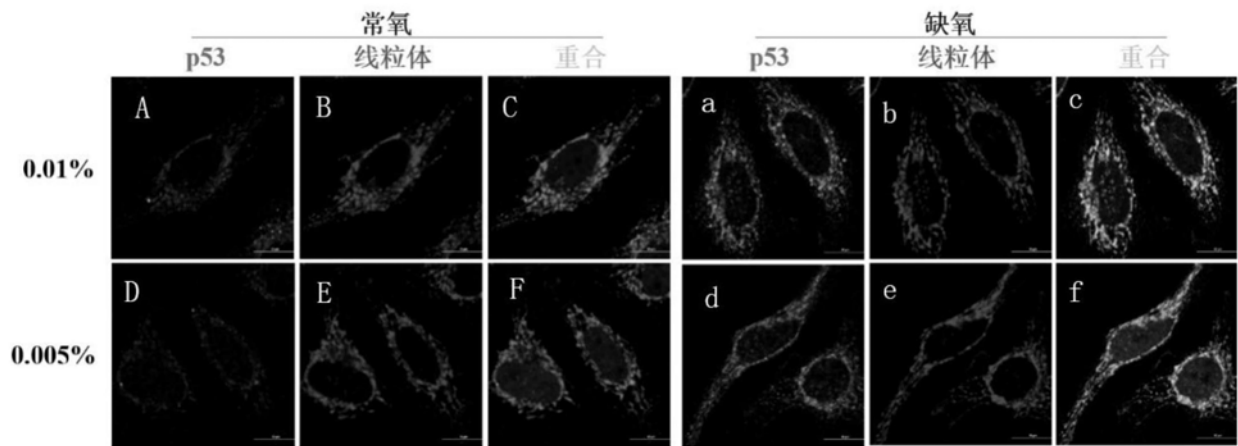


图5

专利名称(译)	一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN110596366B	公开(公告)日	2020-06-30
申请号	CN201910726300.0	申请日	2019-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学华西医院		
申请(专利权)人(译)	四川大学华西医院		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学华西医院		
[标]发明人	龙丹 冯莉 陈雪璐 李胜富		
发明人	龙丹 周彦妮 冯莉 陈雪璐 李胜富		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/6803		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN110596366A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种p53蛋白和线粒体双标记免疫荧光检测方法及其试剂盒，检测方法包括：制备细胞爬片，清洗；用细胞固定液固定，清洗；用细胞封闭液封闭；加入一抗孵育，漂洗；一抗为与p53蛋白结合的抗体和与线粒体结合的抗体；加入荧光标记的二抗染色，孵育，清洗；细胞核荧光染料复染，清洗；封片，用荧光显微镜镜检或共聚焦显微镜镜检观察染色结果；荧光图片叠加分析，仅破细胞膜，不破核膜，可避开核内信号干扰，实现p53蛋白与线粒体共定位，为蛋白的线粒体定位及蛋白与其它非核细胞器定位研究提供依据和参考。

