

人外周血 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的超分辨 SIM 成像

任 敏^{1,2} 张先恩^{1,2} 崔宗强² 张吉斌¹

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430070

摘要 通过合成 *lifeact* 序列, 将其克隆到 pEGFP-C1 载体上, 构建了 pEGFP-C1-Lifeact 质粒, 转染原代 CD4⁺ T 细胞, 实现对 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的荧光标记, 结合超分辨 3D-SIM 荧光成像技术, 研究人外周血 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的精细结构, 并对其动力学过程进行连续观察。结果表明, CD4⁺ T 细胞 F-actin 分布在细胞膜周围, 处于解聚和聚合的动态平衡状态, 与普通荧光显微镜相比, 超分辨 SIM 成像 F-actin 结构更加清晰, 分辨率提高 2~4 倍。

关键词 CD4⁺ T 细胞; 人外周血; F-actin; 超分辨; SIM 成像
中图分类号 Q 248 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0120-06

人外周血 CD4⁺ T 细胞是人体免疫系统中发挥重要作用的一类淋巴细胞, 同时也是 HIV-1 病毒感染的主要宿主细胞^[1]。F-actin 作为细胞骨架的成分之一, 在 CD4⁺ T 细胞形态的维持、物质的运输、细胞的运动, 以及病毒感染等过程中发挥重要作用^[2]。研究 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的结构和功能, 有利于我们对机体免疫系统更深入的理解。但是针对淋巴细胞微丝超微结构的研究主要集中在体外试验, 多采用生化手段, 如 Western Blot、荧光抗体标记、流式细胞分析技术和透射电镜 (TEM) 观察等^[3-5]。这些方法能从整体或静态水平研究细胞 F-actin 的变化过程, 却不能实现单个细胞内 F-actin 动态可视化研究, 尤其是病毒感染 CD4⁺ T 细胞过程中, 与 F-actin 的相互作用的活细胞成像。因此, 实现原代 CD4⁺ T 细胞 F-actin 精细结构的活细胞可视化, 对于进一步研究 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的聚合、解聚过程以及其与外源物质的相互作用具有重要的意义。

荧光显微镜的出现为我们实现细胞结构的可视化提供基础, 但是, 由于光的衍射极限, 荧光显微技术和共聚焦显微镜成像其分辨率限制在 200~500 nm^[6]。近年来发展的超分辨荧光显微技术突破光学极限, 提高了成像分辨率^[6-7]。例如, 基于单分子成像的超分辨显微技术 PALM^[8] 和 STORM^[9], 通

过单个光激活荧光分子来实现精确的定位, 在横轴上已经获得了 20 nm 的分辨率; 通过改变光源的点扩散函数来提高显微镜的分辨率, 如 STED^[10], 以及结构照明显微技术 (structured illumination microscopy, SIM)^[11]。与 PALM 和 STED 相比, SIM 获得的分辨率为 100 nm, 但是 SIM 成像所需图片数远少于 PALM, 并且无需使用特殊荧光开关分子进行标记, 这些优点使得 SIM 成像能够提升成像速度和缩短拍摄时间, 更利于活细胞的亚细胞结构动态成像^[12-13]。

笔者利用超分辨 3D-SIM 荧光成像技术, 研究人外周血 CD4⁺ T 细胞 F-actin 精细结构的活细胞成像方法。该成像有利于细胞动态变化过程的观测, 后期结合其他标记方法, 将有望实现病原微生物与 CD4⁺ T 细胞 F-actin 相互作用的活细胞实时成像, 为进一步研究 F-actin 的功能结构提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞与试剂

pEGFP-C1 为实验室保存, 293T 细胞、TZM-bl 细胞为实验室冻存, 人外周血 CD4⁺ T 细胞分离于健康志愿者, 试剂包括胎牛血清 (FBS) (Gibco 公司), 青霉素/链霉素 (penicillin/streptomycin) (Gib-

co 公司), DMEM、RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司), 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒(OMEGA 公司), *Kpn* I、*Bam* H I 限制性内切酶(TAKARA 公司), Lipofectamine 2000 Reagent (invitrogen 公司), OPTI-MEM 培养基(Gibco 公司), CD4⁺ T 细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec 公司), 淋巴细胞分离基质(Ficoll-Paque™ PLUS)(GE Healthcare 公司), 多聚赖氨酸(Poly-L-lysine)(SIGMA 公司), Amaxa Human T cell Nucleofector Kit (Lonza 公司)。

1.2 pEGFP-C1-Lifeact 质粒的构建

Lifeact 又称肌动蛋白结合肽, 是一段由 17 个氨基酸组成的短肽, 能够在真核细胞和组织中特异性结合丝状肌动蛋白(F-actin)。Lifeact 不干扰肌动蛋白的动力学, 并且它的化学修饰形态能够实现肌动蛋白动力学的可视化^[14-15]。

合成带有酶切位点 *Kpn* I、*Bam* H I 的 *lifeact* 序列:

S-lifeact-Kpn I-*Bam* H I

5'-CATGGGTGTCGAGATTTGATCAAGAAATTC-GAAAGCATCTCAAAGGAAGAATAAG-3'

A-lifeact-Kpn I-*Bam* H I

5'-GATCCTTATTCTTCCTTTGAGATGCT-TTCGAATTTCTTGATCAAATCTGCGACAC-CCATGGTAC-3'

序列退火后与经 *Kpn* I、*Bam* H I 双酶切并回收的载体 pEGFP-C1 通过 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接。转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 经双酶切鉴定验证条带大小无误后, 将对应质粒送测序公司测序, 进一步确定质粒构建的正确性。

1.3 TZM-bl 细胞 F-actin 的标记

将构建的质粒转染贴壁细胞 TZM-bl 细胞以验证 pEGFP-C1-Lifeact 的标记效率。按阳离子脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)说明书, 提前 1 d 在玻璃底共聚焦小皿(35 mm)中铺 TZM-bl 细胞, 使其转染时融合度达到 70% 以上, 分别取 8 μ L Lipofectamine 2000 转染试剂和 2.5 μ g pEGFP-C1-Lifeact 至 1.5 mL 无菌离心管, 100 μ L OPTI-MEM 培养基稀释质粒和 Lipofectamine 2000, 静置 5 min 后混合稀释后的 Lipofectamine 2000 和质粒, 再次静置 5 min, 使转染复合物形成。无菌 PBS 润洗 TZM-bl 细胞后, 加入 1.5 mL OPTI-MEM 至皿中, 然后加入转染复合物, 轻轻晃动小皿, 使转染复合物

均匀分布, 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度培养, 6 h 后更换含 10% 灭活 FBS 和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 正常培养基培养, 表达 24 h 后超分辨荧光显微镜 SIM 成像观察。

1.4 CD4⁺ T 细胞的分离

CD4⁺ T 细胞属于淋巴细胞, 存在于人的外周血单核细胞中, 运用抗体的特异性, 通过负选(negative selection)^[16]的方法, 从人外周血单核细胞(PBMC)中分离较高纯度 CD4⁺ T 细胞。具体步骤参见 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, CD4⁺ T cell isolation kit, human)相关操作。

分离得到的 CD4⁺ T 细胞经细胞计数仪计数, 用含 10% 灭活 FBS 和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基重悬, 调整浓度为 1×10^6 个/mL, 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度过夜培养待用。

1.5 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的标记

用脂质体转染原代细胞效率非常低, 而通过核转染仪转染, 可以显著提高原代悬浮细胞转染效率、细胞存活率和蛋白表达水平^[17]。具体过程如下: 离心收集 5×10^6 个 CD4⁺ T 细胞; 用 100 μ L 核转染试剂重悬 CD4⁺ T 细胞; 加入 2 μ g pEGFP-C1-Lifeact 质粒, 均匀混合细胞, 并转移至核转染电极杯; 将核转杯插入核转仪(Amaxa)槽中, 选择转染程序 V-024 进行转染; 核转染结束后, 用适量含 10% 灭活 FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞; 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度继续培养 24 h, 使 pEGFP-C1-Lifeact 表达。

1.6 TZM-bl 细胞和 CD4⁺ T 细胞 actin 超分辨 SIM 成像

pEGFP-C1-Lifeact 标记 F-actin 的 TZM-bl 细胞培养在玻璃底共聚焦小皿中; 1 000 r/min 离心 10 min 收集转染 pEGFP-C1-Lifeact 的 CD4⁺ T 细胞, 用 200 μ L 含灭活 FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬, 将其加入至 100 μ g/mL 多聚赖氨酸^[18]包被的玻璃底共聚焦小皿底部的小孔中, 培养箱静置 30 min, 使细胞贴附至皿底。将带荧光标记 F-actin 的 TZM-bl 细胞或 CD4⁺ T 的细胞玻璃底共聚焦小皿置于 DeltaVision OMX (GE) 超分辨 3D-SIM 成像设备的载物台培养腔室中, 维持 37 °C, 5% CO₂, 保持恒定的温度和酸碱度环境。采用 60 $\times$ 1.42 NA 油镜结构照明 3D 不同角度成像, 图像由 DeltaVision OMX Master Control Software 采集获取, 数据采用 softWoRx 分析。细胞每层扫描间隔为

0.125 μm ,3D-SIM 成像每张图片获取时间为 30 s;
CD4⁺T 细胞实时成像时间为 5 min,间隔时间40 s。
试验数据及图像使用 Origin、ImageJ、VLOCITY 软件
处理分析。

2 结果与分析

2.1 pEGFP-C1-Lifeact 质粒的构建

Lifeact 又名肌动蛋白结合肽,为 17 个氨基酸
组成的短肽,能够特异性地结合 F-actin,并且不改
变 F-actin 的生物学活性,因此,在真核细胞 F-actin
的动力学示踪过程中广泛应用。

通过将 *lifeact* 基因序列插入到 pEGFP-C1 载
体中,构建表达载体 pEGFP-C1-Lifeact,构建质粒
用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 进行双酶切验证(图 1)。

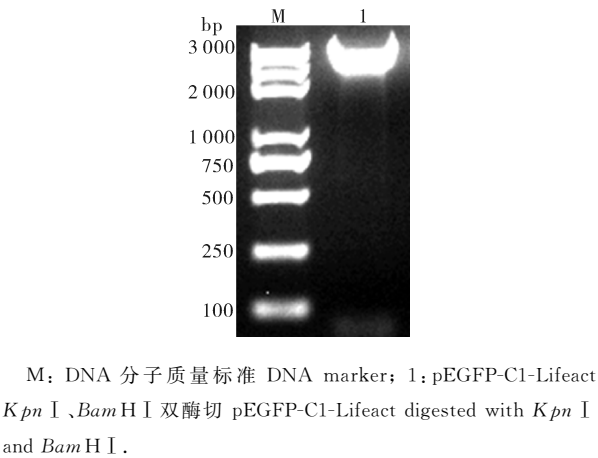
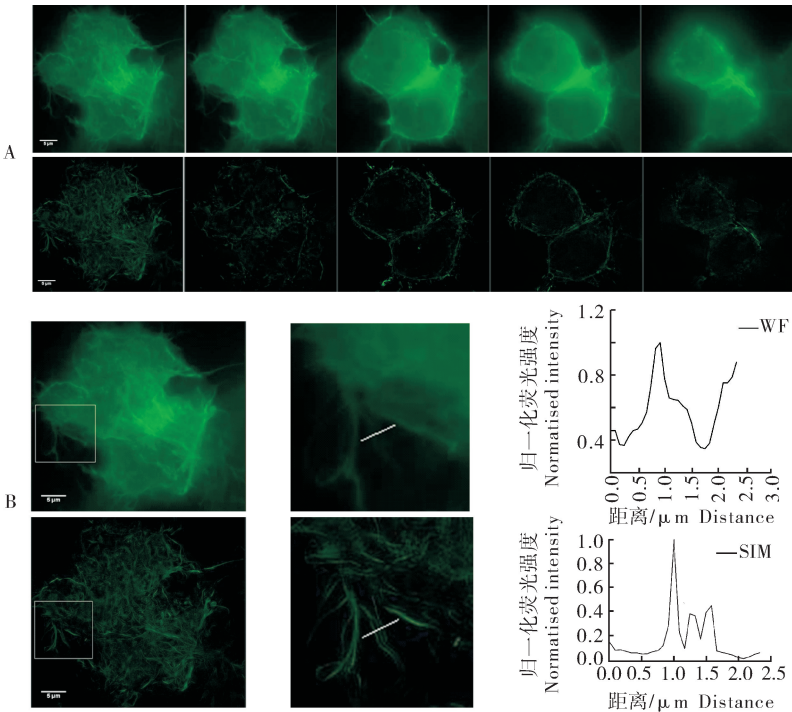


图 1 pEGFP-C1-Lifeact 双酶切验证
Fig.1 Identification of pEGFP-C1-Lifeact by
Kpn I and *Bam* H I



A:TZM-bl 细胞 F-actin 不同光学切面的宽场荧光成像(WF)和 3D-SIM 成像图(SIM) Wide field(WF) and 3D-SIM imaging of the F-actin in TZM-bl cells at different optical sections; B:同一光学切面同一区域宽场荧光成像和 3D-SIM 成像精确度对比 Resolution contrast between wide field and 3D-SIM imaging at the same area of the same optical section.

图 2 TZM-bl 细胞 F-actin 宽场荧光成像和 3D-SIM 成像

Fig.2 Wide field and 3D-SIM imaging of the F-actin in TZM-bl cells

由图 1 可知,载体 pEGFP-C1-Lifeact 经 *Kpn* I
和 *Bam* H I 双酶切后得到了大小约为 51 bp 的
lifeact 基因片段和大小约为 4.7 kb 的载体片段,质
粒进一步测序结果表明,目的基因 *lifeact* 在重组质
粒中的克隆方向、插入位点和阅读框架正确。构建
质粒可用于后续试验 F-actin 的荧光标记。

2.2 TZM-bl 细胞 F-actin 超分辨 SIM 成像

TZM-bl 细胞为贴壁细胞,具有较丰富的微丝
系统,便于超分辨荧光显微镜 3D-SIM 成像。通过
转染 pEGFP-C1-Lifeact 质粒至 TZM-bl 细胞表达,
一方面可以检测质粒是否能够起到正确标记细胞
F-actin 的目的,另一方面有利于进一步研究CD4⁺T

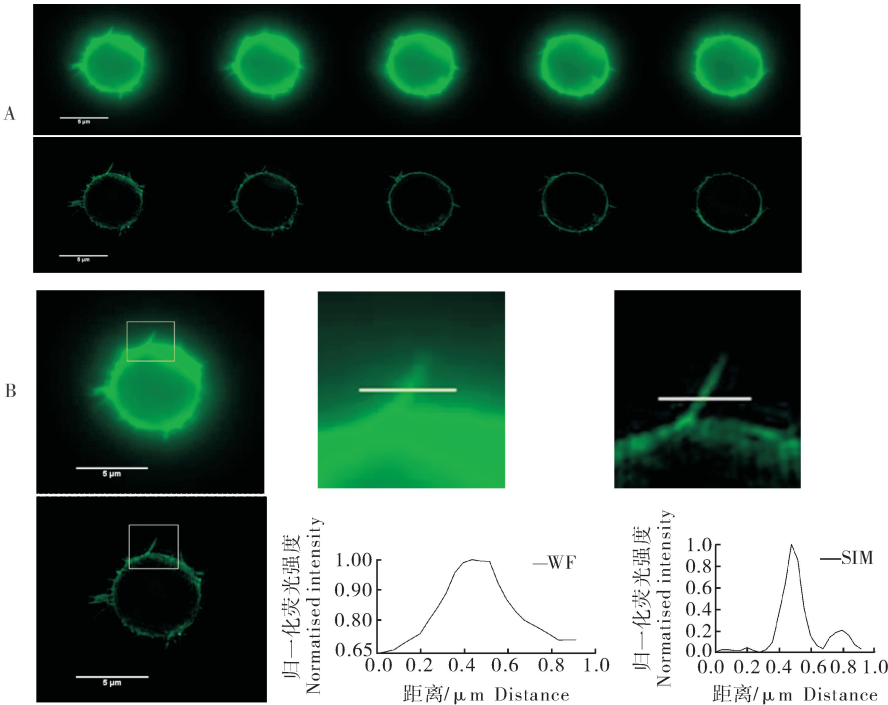
细胞 F-actin 精细结构的分布。

如图 2 所示,pEGFP-C1-Lifeact 在 TZM-bl 细胞中正常表达,并正确标记上 F-actin。表明 pEGFP-C1-Lifeact 质粒的构建成功,可以进一步用于 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的标记成像。传统宽场 3D 荧光成像细胞的不同光学切面图见图 2A 上图,3D-SIM 模式成像细胞的不同光学切面图见图 2A 下图。从 3D-SIM 模式图像不同层面来分析,其分辨率有显著提高,F-actin 结构更加清晰,图 2B 截取同一光学切面同一区域进行成像精确度对比。传统宽场荧光显微成像截图见图 2B 上图,图像无法分辨 F-actin 的精细结构,分辨微丝厚度大约为 1.0 μm ,SIM 模式成像见图 2B 下图,成像能分辨出特定区域事实上有 3 条微丝分布,分辨微丝厚度约为 0.25

μm ,分辨率提高约 4 倍。

2.3 CD4⁺ T 细胞 F-actin 超分辨 SIM 成像

外周血 CD4⁺ T 细胞为悬浮细胞,其 F-actin 分布和贴壁细胞有很大差异,如图 3A 上图所示为宽场荧光 3D 不同光学切面图,CD4⁺ T 细胞 F-actin 表达在细胞外圈,且图像较为模糊,并不能清晰辨明 F-actin 的结构。而图 3A 下图为 CD4⁺ T 细胞 3D-SIM 模式不同光学切面成像图,相比于宽场荧光成像,其分辨率有显著提高,F-actin 结构更加清晰。图 3B 截取同一光学切面同一区域进行成像精确度对比,图 3B 上图为传统宽场荧光显微成像,微丝结构成像宽度约为 0.6 μm ,图 3B 下图为 SIM 模式成像,微丝结构成像宽度约为 0.2 μm ,分辨率提高约 3 倍。



A:CD4⁺ T 细胞 F-actin 不同光学切面的宽场荧光成像(WF)和 3D-SIM 成像图 Wide field(WF) and 3D-SIM imaging of the F-actin in CD4⁺ T cells at different optical sections; B:同一光学切面同一区域宽场荧光成像和 3D-SIM 成像精确度对比 Resolution contrast between wide field and 3D-SIM imaging at the same area of the same optical section.

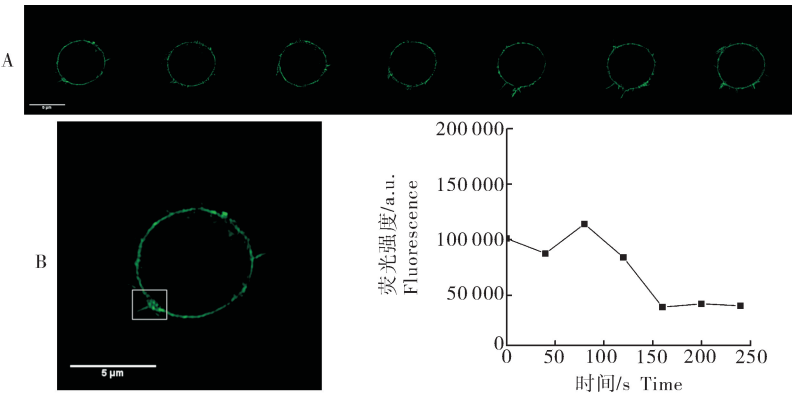
图 3 CD4⁺ T 细胞 F-actin 宽场荧光成像和 3D-SIM 成像图

Fig.3 Wide field and 3D-SIM imaging of the F-actin in CD4⁺ T cells

2.4 CD4⁺ T 细胞 F-actin 聚合和解聚的动态成像

本试验成功将 3D-SIM 成像模式应用于活细胞动态成像过程,图 4 所示为 CD4⁺ T 细胞 3D-SIM 的实时动态成像图,图 4A 展示了 CD4⁺ T 细胞在不同

时间段 F-actin 的聚合和解聚变化过程,表现出细胞周围微丝的伸展和收缩,图 4B 截取了细胞特定区域进行荧光强度分析,可见随时间推移,CD4⁺ T 细胞特定区域 F-actin 荧光强度也在不断改变,实现了



A:CD4⁺ T 细胞 F-actin 3D-SIM 实时成像 Real time imaging of the F-actin in CD4⁺ T cells by 3D-SIM; B:特定区域荧光值的动态分析 Dynamic analysis of fluorescence at certain area.

图 4 CD4⁺ T 细胞 F-actin 3D-SIM 实时成像和动态分析

Fig.4 Real time imaging and dynamic analysis of the F-actin in CD4⁺ T cells by 3D-SIM

定量的展示 F-actin 的聚合和解聚过程。

3 讨 论

F-actin 作为细胞骨架的组成成分,在细胞整个生命周期中发挥着重要作用^[19]。对于病原微生物而言,其对于宿主细胞具有重要的保护作用,是一道难以逾越的屏障。但是相关研究表明,F-actin 也会在病原菌的侵染过程中发挥积极作用^[20],如促进细胞表面相关受体的募集和参与病原微生物在宿主细胞内部的运输等,因此,研究 F-actin 的动力学对于了解细胞本身生理活动以及病原微生物感染等生命过程显得至关重要。

人外周血 CD4⁺ T 细胞是人类免疫系统中发挥重要作用的一类淋巴细胞^[1],也是 HIV-1 病毒侵染的重要宿主之一,目前,对于淋巴细胞主要采用体外生化技术和电子显微镜成像以及免疫组化进行研究和观察,但是这些方法都存在一定的局限性。如电镜切片和免疫荧光分析只能在固定细胞和组织样品上观察,并不能用于连续、动态、实时的变化过程研究,因此,不能真实反映细胞组分的时空变化关系,不能很好地揭示在此过程中细胞 F-actin 的动力学变化。因此,实现单个细胞 actin 的动态超分辨可视化,对于全面了解 actin 在 CD4⁺ T 生命周期中的功能学研究具有重要意义。

在本研究中,我们通过构建 pEGFP-C1-Lifeact 质粒对 F-actin 进行荧光标记,用于 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的活细胞动态 3D-SIM 成像研究。相较于传统的荧光标记手段,Lifeact 对 F-actin 的示踪主要

有以下优势:(1)F-actin 清晰的可视化;(2)无细胞毒性,对 actin 功能无影响,对细胞骨架动力学无干扰;(3)极强的信噪比,便于成像观察;(4)对于难以转染的细胞,比如原代细胞同样适用。我们将构建的质粒先转染贴壁细胞 TZM-bl 细胞表达,一方面可以检测质粒是否能够起到正确标记细胞 F-actin 的目的,另一方面有利于进一步研究 CD4⁺ T 细胞 F-actin 精细结构的分布。随后,通过核转仪转染原代 CD4⁺ T 细胞,实现了原代 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的 3D-SIM 超分辨实时成像,相比于普通荧光显微镜成像,其分辨率提高了 2~4 倍。尽管分辨率和 PALM 技术的 20~50 nm 相比有一定差距,但是,3D-SIM 成像更利于 CD4⁺ T 细胞 F-actin 变化的活细胞成像,并且,本试验也实时记录了 CD4⁺ T 细胞 F-actin 的动态变化过程。如果结合其他标记技术和手段,如对病原微生物实现不同组分的标记,则可以为进一步研究 CD4⁺ T 细胞 F-actin 和病原微生物的相互作用提供研究模型。

参 考 文 献

[1] 孙君重,肖文华,于力.CD4⁺ T 淋巴细胞功能研究新进展[J].中国实验血液学杂志,2010(2):544-548.
[2] BURKHARDT J K,CARRIZOSA E,SHAFFER M H.The actin cytoskeleton in T cell activation[J].Annu Rev Immunol, 2008,26:233-259.
[3] JAHN K,BARTON D,BRAET F.Correlative fluorescence-and scanning, transmission electron microscopy for biomolecular investigation[M].Badajoz: Modern Research and Educational

- Topics in Microscopy Formatex Press, 2007;203-211.
- [4] GOTO T, NAKAI M, IKUTA K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1[J]. *Micron*, 1998, 29(2):123-138.
- [5] WANG W, GUO J, YU D, et al. A dichotomy in cortical actin and chemotactic actin activity between human memory and naive T cells contributes to their differential susceptibility to HIV-1 infection [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(42):35455-35469.
- [6] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313:1642-1645.
- [7] 毛秀海, 杜建聪, 黄庆, 等. 超分辨光学显微镜的生物学应用[J]. *核技术*, 2013(6):46-53.
- [8] HESS S T, GIRIRAJAN T P, MASON M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11):4258-4272.
- [9] HUANG B, JONES S A, BRANDENBURG B, et al. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(12):1047-1052.
- [10] RITTWEGER E, HAN K Y, IRVINE S E, et al. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution [J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(3):144-147.
- [11] GUSTAFSSON M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37):13081-13086.
- [12] YORK A G, PAREKH S H, NOGARE D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7):749-754.
- [13] SHAO L, KNER P, REGO E H, et al. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12):1044-1046.
- [14] RIEDL J, CREVENNA A H, KESSENBROCK K, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7):605-607.
- [15] RIED J, FLYNN K C, RADUCANU A, et al. Lifeact mice for studying F-actin dynamics[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(3):168-169.
- [16] STARR T K, JAMESON S C, HOGQUIST K A. Positive and negative selection of T cells[J]. *Annual Review of Immunology*, 2003, 21(1):139-176.
- [17] MARCHENKO S, FLANAGAN L. Transfecting human neural stem cells with the amaxa nucleofector[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2007(6):240.
- [18] MAZIA D, SCHATTEN G, SALE W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1975, 66(1):198-200.
- [19] POLLARD T D, COOPER J A. Actin, a central player in cell shape and movement[J]. *Science*, 2009, 326:1208-1212.
- [20] PLOUBIDOU A, WAY M. Viral transport and the cytoskeleton [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(1):97-105.

Super-resolution structured illumination microscopy (SIM) imaging of F-actin in human peripheral blood CD4⁺ T cells

REN Min^{1,2} ZHANG Xianen^{1,2} CUI Zongqiang² ZHANG Jibin¹

1. *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430070, China*

Abstract To label the CD4⁺ T cells F-actin, the *lifeact* gene was synthesized and cloned into vector pEGFP-C1, CD4⁺ T cells were then transfected with pEGFP-C1-Lifeact plasmid and imaged by the real time super-resolution 3D-SIM fluorescence microscopy. The results showed that F-actin is distributed around the cellular membrane with steady state of depolymerization and polymerization. It was indicated that the spatial resolution of the fine SIM imaging of F-actin was two to four times higher than the wide field fluorescence microscope imaging.

Keywords CD4⁺ T cells ; human peripheral blood; F-actin; super-resolution; SIM imaging