

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (8) :1068 – 1073; 4 August 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140603

FM4-64 和 Hoechst 染料在活细菌胞膜和拟核标记定位中的条件优化与应用

王净^{1,2,3}, 韩延平^{3*}, 杨瑞馥³, 赵兴绪^{1*}

¹甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

²河北北方学院动物科技学院, 河北 张家口 075131

³军事医学科学院微生物流行病研究所, 北京 100071

摘要: 【目的】为了观察细菌细胞膜和拟核的形态结构, 准确对亚细胞进行定位。【方法】本文利用 FM4-64 和 Hoechst 两种染料, 分别采用不同浓度和不同时间对大肠杆菌活细胞进行染色和荧光共聚焦显微成像, 并对 7 种细菌的活细胞 (金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、军团菌、霍乱弧菌和炭疽芽孢杆菌) 进行染色观察。【结果】相同观察条件下, 不同染料浓度和不同的染色时间影响了细胞膜、拟核的荧光强度; 确定了 FM4-64 染色通用条件 (浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 染色 1 min) 和 Hoechst 的最佳条件 (浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 染色 20 min)。上述条件下, Hoechst 对 8 种细菌染色效果均较理想, 然而 FM4-64 对细菌染色效果不同, 革兰氏阴性菌 (大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、霍乱弧菌、铜绿假单胞菌和军团菌) 表现较好的细胞膜轮廓, 革兰氏阳性菌 (炭疽芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌) 效果较差。【结论】FM4-64 和 Hoechst 两种染料共染 8 种细菌, 对细胞膜和拟核的染色观察, 可为原核细胞结构染色提供借鉴, 并为大分子的亚细胞定位研究奠定基础。

关键词: 两种染料 FM4-64 和 Hoechst, 活细菌, 细胞膜, 拟核, 标记定位

中图分类号: Q93 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1068-06

采用荧光染料对活细胞细胞膜进行标记定位, 可以解释真核细胞和细菌的细胞吞噬现象、胞吐作用以及植物细胞的囊泡运输现象, 并为亚细胞准确定位奠定基础。FM4-64 染料是亲脂性、水溶性的苯乙烯类化合物, 对细胞无毒性作用, 能与质膜及内膜细胞器特异结合后发出高强度的红色荧光。Lichius A 等^[1]用 FM4-64 染色丝状真菌粗糙脉胞菌, 利用活细胞成像技术动态观察其特征。Nonejuie P 等^[2]将 FM4-64 用于细胞膜的染色中, 通过细菌细胞学方法分析细胞

通路, 从而揭示抗菌分子机理。Zupan JR 等^[3]应用 FM4-64 进行根癌土壤杆菌亚细胞定位分析。Hoechst 染料已经在动植物微生物和动植物基因的亚细胞定位中广泛应用^[4-6]。FM4-64 染料在植物细胞中应用广泛, 而在细菌细胞中应用的较少^[7-8]。Hoechst 是一种蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低, 根据其能够结合核酸的特性常被用于细胞核或者 DNA 染色中。它可以穿透细胞膜, 结合于活细胞或固定过的细胞, 因此可用于活细胞标记。本研究选择大肠杆菌

基金项目: 国家自然科学基金 (31171248); 国家“973”计划项目 (2014CB744405); 河北省科技计划项目 [14236602D-3 (2014)]

* 通信作者。Tel: +86-10-66948562; E-mail: yanpinghan@gmail.com

作者简介: 王净 (1974 -), 女, 河北省定州人, 在职博士研究生, 从事蛋白质与 sRNA 共标记定位研究。E-mail: wangjing197410@163.com

收稿日期: 2014-12-19; **修回日期:** 2015-02-27

(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 作为试验菌, 优化染色浓度和染色时间, 并对 7 种微生物代表菌株 [金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiellapneumoniae*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*)、军团菌 (*Legionella pneumonia*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)] 进行染色, 观察成像效果, 可为原核细胞结构染色提供借鉴, 并为大分子的亚细胞定位研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 MG1655 为军事医学科学院生物工程研究所王恒樑老师赠送; 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、军团菌、霍乱弧菌和炭疽芽孢杆菌为军事医学科学院微生物流行病学研究所分析微生物实验室保存; FM4-64 和 Hoechst 33342 染料购自 Invitrogen Corporation。

1.2 染色溶液配制

1 mg FM4-64 染料使用 1 mL DMSO 溶解, 再用 Hank's 平衡盐溶液 (8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 1 g/L 葡萄糖, 60 mg/L KH_2PO_4 , 47.5 mg/L Na_2HPO_4 , pH 7.2) 稀释至使用浓度; 10 mg Hoechst 染料使用 1 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na_2HPO_4 , 0.24 g/L KH_2PO_4 , 调 pH 值至 7.4) 溶解, 再稀释至使用浓度。

1.3 菌株的选择

大肠杆菌是肠道中革兰氏阴性杆菌的主要成员, 常常被用来进行亚细胞定位; 鼠疫耶尔森菌是本实验室的常用菌株, 为首选材料; 金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性球菌的代表性菌株; 肺炎克雷伯菌是条件致病菌, 因其能产生耐药机制, 是引起医院感染的重要病原菌; 铜绿假单胞菌是不发酵革兰氏阴性杆菌中的重要菌株; 炭疽芽孢杆菌是需氧革兰氏阳性杆菌代表菌株; 军团菌种类较多, 血清群也不少, 是近年来人们研究的热点; 霍乱弧菌是弧菌科的代表菌株。

1.4 细菌培养

将保存菌种 1:100 接种至 5 mL LB 液体培养基

中, 37 °C 恒温摇床 200 r/min 振荡 10 h, 收集菌液离心, 弃上清, 沉淀用 500 μL PBS 缓冲液重悬。

1.5 染色条件优化

FM4-64 和 Hoechst 两种染料分别对大肠杆菌染色, 确定最佳的染色浓度和时间: 将 FM4-64 和 Hoechst 染液分别稀释至 20、10 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度, 每个浓度取 100 μL 加入 EP 管中, 再加入待染菌 10 μL 并混匀, 使用 FM4-64 染料分别冰上染色 5、3 和 1 min, 使用 Hoechst 染料分别室温染色 30、20 和 10 min, 荧光共聚焦显微镜观察。

共染: 利用优化的最佳条件, 对 8 种代表性菌株进行染色。先使用 Hoechst 室温染色, 然后离心, 吸尽染液, 再加入 FM4-64 染液冰上染色, 离心并弃上清, 留大约 5 μL 染液重悬沉淀, 滴加到洁净的载玻片上, 接种棒涂抹均匀, 晾干后, 滴加甘油封片, 荧光共聚焦显微镜观察 (63 \times , Hoechst 采用波长 405 nm, FM4-64 采用波长 543 nm)。

1.6 图片分析

使用 Olympusfluoview ver. 4.0b viewer 和 Photoshop cs6 处理图片。

2 结果和分析

2.1 染色条件优化

2.1.1 Hoechst 染色浓度和时间的确定: 荧光共聚焦显微观察时设置相同条件: 553 V 稳定电压, 15% 激发光强度, 分辨率 1024 bp, 405 nm 波长观察。从图 1 可以看出, 随着 Hoechst 浓度的增加, 荧光强度呈现增强的趋势; Hoechst 在 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时, 随着染色时间的增加, 荧光强度也随之增强; Hoechst 在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时, 荧光强度并没有因染色时间的延长而变强, 到 20 min 时达到最强, 由于荧光淬灭等因素的影响, 30 min 反而减弱。结果表明: Hoechst 浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 染色 20 min 效果最佳。

2.1.2 FM4-64 染色浓度和时间的确定: 荧光共聚焦显微观察条件: 600 V 稳定电压, 36% 激发光强度, 分辨率 1024 bp, 543 nm 波长。从图 2 可以看出, 荧光强度随着 FM4-64 浓度的增加而增强; 从染色时间观察, 随着时间的延长荧光强度反而减弱, 说明这种染液容易发生淬灭。结果显示: FM4-64 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 染色 1 min 效果最佳。

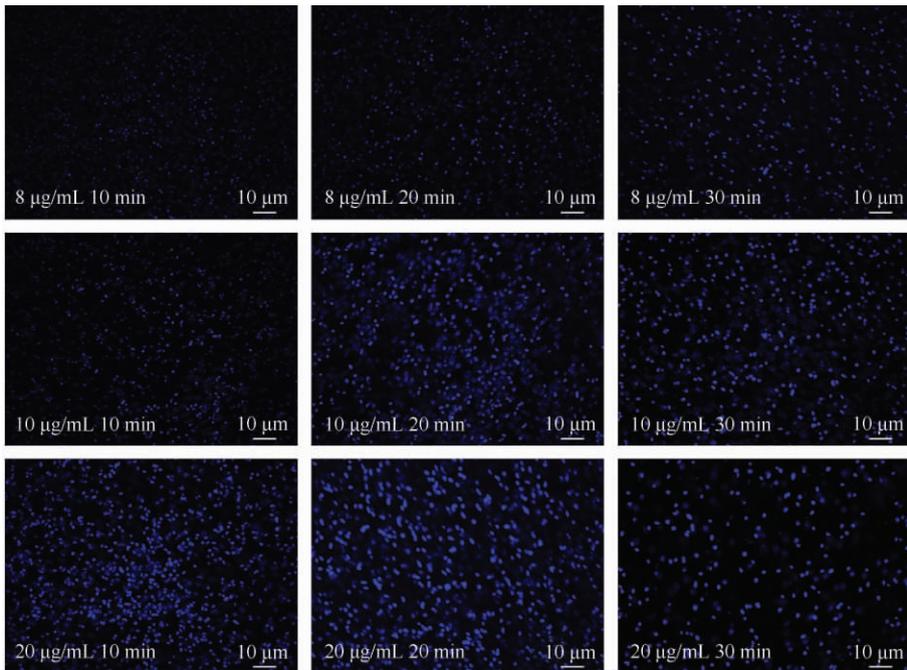


图 1. 大肠杆菌 k-12 MG1655 拟核染色的荧光共聚焦显微图片

Figure 1. Confocal images of the nucleus of *E. coli* k-12 MG1655 stained with Hoechst of different concentrations and times.

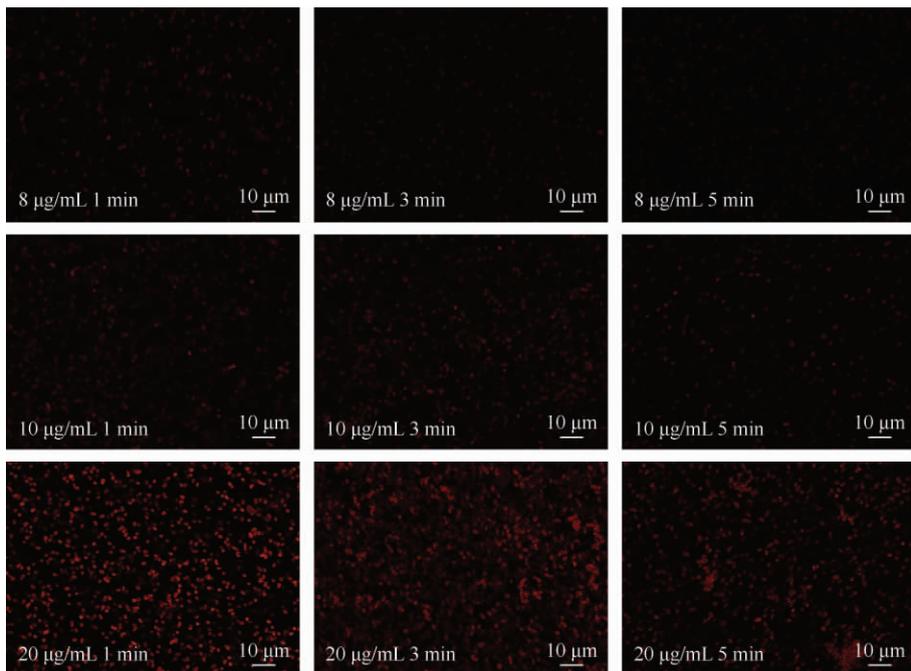


图 2. 大肠杆菌 k-12 MG1655 细胞膜染色的荧光共聚焦显微图片

Figure 2. Confocal images of the membrane of *E. coli* k-12 MG1655 stained with FM4-64 of different concentrations and times.

2.2 代表菌株的染色观察

根据优化的染色条件,对 8 种代表性的菌株进行染色观察。两种染料浓度均稀释至 20 µg/mL,先用 Hoechst 染色 20 min,再用 FM4-64 冰上染色 1

min,相同的荧光共聚焦观察条件下成像,结果显示(图 3),Hoechst 对 8 种活细胞染色效果均较好,荧光强度适度。然而 FM4-64 对活细胞细胞膜染色效果不同,大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、军

团菌、霍乱弧菌和铜绿假单胞杆菌均表现较好的细胞膜轮廓,炭疽芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌效果较

差。整体观察,细胞膜轮廓明显,拟核分布于细胞中央,完整的呈现了细菌的形态。

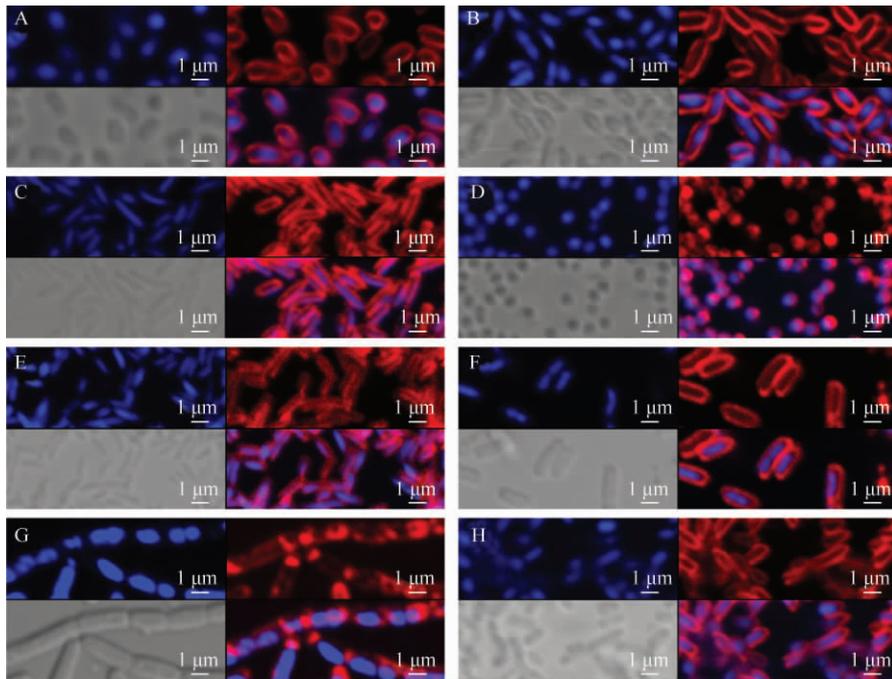


图 3. FM4-64 和 Hoechst 两种染料对 8 种代表菌株的染色结果

Figure 3. Confocal images of eight bacterial strains stained with FM4-64 and Hoechst. A: *Escherichia coli*; B: *Klebsiella pneumoniae*; C: *Vibrio cholerae*; D: *Staphylococcus aureus*; E: *Legionella pneumoniae*; F: *Yersinia pestis*; G: *Bacillus anthracis*; H: *Pseudomonas aeruginosa*.

3 结论和讨论

活细胞染色不同于普通细胞染色,普通细胞染色先要固定,在载玻片上加染液进行染色后观察,由于细胞固定易于观察。对于活细胞染色,需要保持细胞的活性,因此不能固定,本试验将细菌同染料一起混合于 EP 管中,使得染料与细胞成份结合^[9],离心弃上清,留少量的染液涂片,操作过程是先染色后涂片。活细胞染色观察成像时,由于细胞浮动,拍照时很容易模糊,因此,涂片的液体量及封片的甘油用量是保证高品质图片的必备条件,本试验通过摸索,确定涂片的液体量以 3-6 μL 较好,封片的甘油量要少于 10 μL ,根据涂片的范围,也是以 3-6 μL 最佳。需要强调的是,由于 FM4-64 染料的特殊性,温度是影响染色的较重要条件,需要在冰上进行操作,保证低温下染色,如果温度不加以控制,细胞容易发生内吞作用从而导致染液进入胞浆而被染色,达不到对细胞膜进行染色的目的。

FM4-64 染料是由带正电荷的头部通过双键与

亲脂的尾部相连而成,染色过程中,亲脂尾部插入脂双层的外叶,头部阻止其进一步穿越脂双层,正是由于这种分子结构的特殊性,决定了其适于细胞膜染色的特点。对细胞膜标记的荧光染料还有 PKH26 和 DiR,PKH26 能够稳定的与细胞膜脂质区结合并发出红色荧光,主要用于淋巴细胞、神经细胞、成肌细胞以及骨髓干细胞体外标记、体外细胞增殖研究及体内外细胞示踪研究^[10]。染料 DiR 是一种亲脂性荧光染料,具有深红色荧光,多用于活体成像或者示踪中,可以用来标记细胞膜和疏水性组织,主要使用流式细胞仪检测^[11-12]。

本试验分别确定 FM4-64 和 Hoechst 两种染液对大肠杆菌的染色浓度和时间,再应用优化的条件对 8 种细菌同时染色观察,使用 Hoechst 得到了较好的染色效果。FM4-64 对活细菌细胞膜染色荧光强度适中,但是由于细菌生物学特性不同染色效果也不一样。大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、军团菌、霍乱弧菌和铜绿假单胞杆菌都属于革兰氏阴性菌,炭疽芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性菌。革兰氏阴性菌细胞壁厚约

10 nm,与细胞膜结构紧密,整体通透性较好^[13],染液易于穿透进入到细胞膜,表现出较好的细胞膜轮廓,结构清晰完整。而革兰氏阳性菌由于细胞壁厚约20-80 nm,并且与细胞膜结构不紧密,染液不易穿透,因此细胞膜轮廓不清晰,不能完整的显示细胞结构。整体观察两种染液染色效果,革兰氏阳性菌细胞膜染色轮廓不清晰,不适于进行近细胞膜的亚细胞定位。革兰氏阴性菌染色形态饱满、轮廓清晰易于观察,拟核荧光强度合适,两种颜色将细菌的形态完整呈现。因此,本文可为原核细胞结构染色提供借鉴,并为大分子的亚细胞定位研究奠定基础。

参考文献

- [1] Lichius A, Yanez-Gutierrez ME, Read ND, Castro-Longoria E. Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. *PLoS One*, 2012, 7: e30372.
 - [2] Nonejuie P, Burkart M, Pogliano K, Pogliano J. Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110: 16169-16174.
 - [3] Zupan JR, Cameron TA, Anderson-Ferguson J, Zambryski PC. Dynamic FtsA and FtsZ localization and outer membrane alterations during polar growth and cell division in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110: 9060-9065.
 - [4] Szczurek AT, Prakash K, Lee HK, Zurek-Biesiada DJ, Best G, Hagmann M, Dobrucki JW, Cremer C, Birk U. Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus*, 2014, 5: 331-340.
 - [5] Jiang XQ, Guo SM, Zhang M, Zhou M, Ye BC. DNA-hosted Hoechst dyes: application for label-free fluorescent monitoring of endonuclease activity and inhibition. *Analyst*, 2014, 139: 5682-5685.
 - [6] Nakamura A, Takigawa K, Kurishita Y, Kuwata K, Ishida M, Shimoda Y, Hamachi I, Tsukiji S. Hoechst tagging: a modular strategy to design synthetic fluorescent probes for live-cell nucleus imaging. *Chemical Communications*, 2014, 50: 6149-6152.
 - [7] Yahav D, Duskin-Bitan H, Eliakim-Raz N, Ben-Zvi H, Shaked H, Goldberg E, Bishara J. Monomicrobial necrotizing fasciitis in a single center: the emergence of gram-negative bacteria as a common pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, 28: 13-16.
 - [8] Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Guan le L. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics*, 2014, 15: 181.
 - [9] Roberts PM, Goldfarb DS. *In vivo* nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Cell Biology*, 1998, 53: 545-557.
 - [10] Pan H, Lan J, Luo X, Gao J, Xie X, Guo H. Biologic properties of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid-labeled and PKH26-labeled human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 2014, 16: 74-83.
 - [11] Yang PS, Tung FI, Chen HP, Liu TY, Lin YY. A novel bubble-forming material for preparing hydrophobic-agent-loaded bubbles with theranostic functionality. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10: 3762-3774.
 - [12] Zhang L, Zhou H, Belzile O, Thorpe P, Zhao D. Phosphatidylserine-targeted bimodal liposomal nanoparticles for *in vivo* imaging of breast cancer in mice. *Journal of Controlled Release*, 2014, 183: 114-123.
 - [13] Chen W, Hang F, Zhao JX, Tian FW, Zhang H. Alterations of membrane permeability in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* under microwave. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (4): 697-701. (in Chinese)
- 陈卫, 杭锋, 赵建新, 田丰伟, 张灏. 微波杀菌过程中大肠杆菌与金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的改变. *微生物学报*, 2007, 47 (4): 697-701.

Optimization of labeling and localizing bacterial membrane and nucleus with FM4-64 and Hoechst dyes

Jing Wang^{1,2,3}, Yanping Han^{3*}, Ruifu Yang³, Xingxu Zhao^{1*}

¹ College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

² College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, Hebei Province, China

³ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] To observe cell membrane and nucleus in bacteria for subcellular localization. [Methods] FM4-64 and Hoechst were dyed that can label cell membrane and nucleus, respectively. Both dyes were used to co-stain the membranes and nucleus of eight bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Legionella pneumonia*, *Vibrio cholerae* and *Bacillus anthracis*). *E. coli* was dyed with different dye concentrations and times and then observed by confocal fluorescence microscopic imaging. [Results] Fluorescence intensity of cell membrane and nucleus is affected by dye concentrations and times. The optimal conditions were determined as follows: staining cell membrane with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FM4-64 for 1 min and cell nucleus with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst for 20 min. Gram-negative bacteria were dyed better than gram-positive bacteria with FM4-64 dye. [Conclusion] FM4-64 and Hoechst can be used to stain membrane and nucleus in different types of bacteria. Co-staining bacterial membrane and nucleus provides the reference to observe cell structure in prokaryotes for studying subcellular localization. **Keywords:** FM4-64 and Hoechst, live-bacteria, membrane, nucleus, labeling and localizing

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China (31171248), by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2014CB744405) and by the Hebei Province Science and Technology Plan Projects [14236602D-3 (2014)]

* Corresponding author. Tel: +86-10-66948562; E-mail: yanpinghan@gmail.com

Received: 19 December 2014 / Revised: 27 February 2015