

НОВЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ ФРАКЦИИ ИНТАКТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРЕ

С.И. Никулицкий, Е.Г. Тырсина, А.Н. Иншаков, Н.Б. Боровкова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Екатерина Григорьевна Тырсина tyrsina@yandex.ru

Введение. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), результаты которой детектируются с помощью проточной цитофлуориметрии, позволяет идентифицировать клеточные белки, находящиеся либо на поверхности клетки, либо внутри нее в случае использования пермеабиллизации. Однако этот метод не дает ответа на вопрос о распределении искомого антигена по клеточным компартментам, в частности о его ассоциации с клеточным ядром. Между тем ядерная локализация изучаемого белка во многом позволяет судить о механизмах его действия. Поэтому разработка протокола выделения интактных клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитофлуориметре, способна дополнить сведения о расположении и функциональном значении многих ядерноассоциированных протеинов.

Цель исследования — разработка метода выделения чистой фракции интактных, стабилизированных клеточных ядер, пригодных для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре.

Материалы и методы. В работе изучали ядерную локализацию рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа (VEGF-R1). В качестве объекта исследования использовали линию опухолевых клеток человека A431. Интактность экстрагированных ядер оценивали путем микроскопического исследования окрашенных мазков из ядерной суспензии. Экспрессию рецептора регистрировали с помощью непрямой РИФ на проточном цитофлуориметре.

Результаты. Применение разработанного протокола позволило получить суспензию из одиночных неповрежденных клеточных ядер, что является необходимым условием постановки РИФ. На экстрагированных ядрах нам удалось выявить рецептор как на наружной мембране (интактные ядра), так и внутри ядра (пермеабиллизованные ядра). Причем внутриядерное содержание рецептора VEGF-R1 превышало таковое на ядерной поверхности в 3,8 раза ($17,9 \pm 1,04$ и $4,8 \pm 0,26$ % соответственно).

Заключение. Разработанный нами метод оказался пригодным для идентификации и установления локализации искомого ядерных белков на проточном цитофлуориметре. В сочетании с такими широко применяемыми методиками, как иммуноцитохимическое исследование, вестерн-блоттинг и др., РИФ на ядрах поможет исследователю сформировать более полное представление о свойствах ядерноассоциированных белков.

Ключевые слова: экстракция интактных ядер, проточная цитофлуориметрия, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа, клеточная линия A431

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-76-81

NEW METHOD OF EXTRACTION OF INTACT NUCLEI FROM CELLS FOR FLOW CYTOMETRY FLUORESCENCE IMMUNOASSAY

S.I. Nikulitskiy, E.G. Tyrsina, A.N. Inshakov, N.B. Borovkova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Identification of cellular proteins can be performed by indirect immunofluorescence assay using flow cytometry. However, this method allows to detect cellular proteins that are either on the cell surface or inside the cell and cannot demonstrate a protein distribution within cellular compartments, particularly in nucleus. Meanwhile, the nuclear localization of the protein of interest in many respects gives an indication of the mechanisms of its action. Therefore, the development of the protocol of extraction of nuclei suitable for analysis on a flow cytometer is able to complement the information about the localization and functional significance of many nucleus-associated proteins.

Objective. The aim of this study was to develop a method for extraction, purification and stabilization of intact nuclei suitable for flow cytometry analysis.

Materials and methods. In this work we studied the nuclear localization of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor (VEGF-R1). The A431 human cancer cell line was used as an object of the study. The quality of extracted nuclei was assessed by microscopic examination of stained smears of nuclear suspension. Expression of the receptor was determined by indirect immunofluorescence assay using flow cytometry.

Results. New method was successfully applied to obtain the suspension of intact cellular nuclei that is crucial to perform further flow cytometry. Applied method revealed the presence of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor at the external nuclear membrane and inside of the nucleus. Interesting to note that the presence of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor inside of the nucleus was 3,8 times as much as its surface location ($17,9 \pm 1,04$ % and $4,8 \pm 0,26$ % respectively).

Conclusions. The new method of extraction, purification and stabilization of the nuclei is applicable for proteins identification by flow cytometry. In combination with other methods (ICC, Western blotting, etc.) flow cytometry of intact nuclei is able to complement the information about the properties of nucleus-associated proteins.

Key words: extraction of nuclei, flow cytometry, receptor type 1 for vascular endothelial growth factor, A431 cell line

Введение

Целью многих исследований в различных областях биологии является регистрация определенных клеточных белков. Многие годы эту задачу с успехом позволяет реализовать реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием проточного цитофлуориметра. Несомненные достоинства этого метода заключаются в объективности, точности и высокой воспроизводимости результатов. Вместе с тем РИФ позволяет детектировать антигены либо на наружной поверхности клетки, либо внутри нее после предварительной пермеабилзации. Однако даже регистрация соответствующего белка внутри клетки не позволяет судить о его распределении по клеточным компартментам. Между тем данный вопрос неизбежно встает в ходе многих исследований, например при разработке чувствительных методов диагностики и мишененаправленного лечения онкологических заболеваний. Для решения вопроса о точной внутриклеточной локализации белка применяют, как правило, вестерн-блоттинг и иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование. Однако данные методики являются полуколичественными и лишь относительно сопоставимы с результатами РИФ. В связи с этим мы решили расширить возможности РИФ, а именно: разделить ядерные и цитоплазматические сигналы.

В доступной литературе мы не нашли работ об использовании меченных антителами ядер в проточной цитометрии. Необходимым условием постановки РИФ на ядрах является их наиболее щадящая экстракция из клеток для получения неповрежденных, одиночных и функционально активных ядер.

Получить более или менее целостные ядра удалось Г.П. Георгиеву с сотрудниками еще в 60-х гг. прошлого столетия [1]. Авторами был использован фенольный метод извлечения ядер из различных тканей млекопитающих. При этом основная задача работы заключалась в выделении ядерной РНК, а не в получении функционально активных ядер как таковых. Однако для поставки РИФ данный способ не подходит ввиду высокой токсичности фенольных соединений [2]. В частности, эти агенты приводят к денатурации белков, что изменяет антигенные детерминанты и, соответственно, искажает получаемые результаты.

В 1990 г. был описан другой метод выделения транскрипционно-активного ядерного экстракта из печени крыс [3]. Данная методика более приемлемая для сохранения целостности ядер, однако в связи с использованием лабораторных животных довольно трудоемкая и дорогостоящая. К тому же она не позволяет исследовать ядра человеческих клеток.

Для вестерн-блот-анализа также необходимо получение ядерной фракции. Объектами в данном случае служат культивируемые клетки, что дает возможность изучать в том числе различные клеточные линии опухолей человека. Вместе с тем метод нацелен исключительно на получение чистых белковых экстрактов цитоплазмы и ядра и не предполагает сохранения стабильных, функционально активных ядер в силу жестких условий выделения. Таким образом, на сегодняшний день не существует приемлемого метода «мягкой» экстракции цельных клеточных ядер, т. е. исследование белков в нативном ядре не представляется возможным. Чтобы решить эту проблему, нами был разработан метод выделения чистой фракции интактных клеточных ядер для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре.

Ранее с помощью непрямой РИФ (нРИФ) на клетках линии эпидермоидной карциномы человека A431 мы обнаружили преимущественную внутриклеточную локализацию VEGF-R1. Это подтвердилось и данными ИЦХ-окрашивания. Однако установить указанными методами, где именно внутри клетки расположен VEGF-R1, было невозможно. Например, не было понятно, связан ли рецептор с ядром.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось выяснение вопроса об ассоциации VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Для этого прежде всего необходимо было разработать методику щадящего выделения интактных ядер. Отправной точкой работы стало рассмотрение существующих модификаций разделения цитоплазматической и ядерной фракций при вестерн-блот-анализе, которое выявило значительные различия. Они касались числа циклов центрифугирования (от 1 до 3), скорости (от 1000 до 16 000 об/мин), количества клеток на пробу, а также состава буферов для выделения фракций [4–6]. Для вестерн-блоттинга сохранность ядер не имеет принципиального значения, поскольку этот метод пред-

полагает лишь получение «чистых растворов» ядерных и цитоплазматических белков. Но поскольку целью нашей работы было установление точной локализации VEGF-R1 в интактном ядре, вышеописанные условия разделения фракций нам не подходили. В связи с этим мы предприняли попытку разработки методики щадящего выделения интактных клеточных ядер для их дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа с применением проточной цитометрии. Важно, что полученные результаты на ядрах можно объективно сопоставлять с результатами РИФ, ранее полученными на клетках.

При разработке метода выделения интактных клеточных ядер нам необходимо было установить: минимально необходимое количество клеток для последующего выделения ядер; фазу клеточного роста, оптимальную для постановки эксперимента; наилучшие условия отделения цельных ядер от цитоплазмы (состав буфера и время инкубации в нем, режим очистки полученной суспензии, условия стабилизации ядер); оптимальное количество ядер на пробу для РИФ; наилучший пермеабилizующий реагент; концентрацию антител для мечения ядер; а также необходимо было разработать протокол для анализа проб на проточном цитофлуориметре.

Материалы и методы

Объекты исследования

Исзуемым белком являлся VEGF-R1, который, по данным литературы, представлен в клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431 [7]. Клетки A431 выращивали в среде DMEM («Gibco», Великобритания), содержащей глутамин, 10 % телячью эмбриональную сыворотку и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл), в пластиковой культуральной посуде («Costar», США) при температуре 37 °C и подаче влажного воздуха с 5 % CO₂. Клетки рассевали в концентрации из расчета $1,5 \times 10^5$ /мл каждые 3 сут. Для снятия клеток с подложки использовали 0,25 % раствор трипсина-ЭДТА.

В результате серии экспериментов мы установили, что наибольшую активность демонстрируют ядра, выделенные из клеток в логарифмической фазе роста. Определено оптимальное количество клеток, равное 1×10^7 на 1,5 мл.

Экстракция ядер

Основой буфера для отделения ядер от цитозольной фракции был выбран гипоосмолярный раствор, содержащий HEPES (10 ммоль, pH 7,9), MgCl₂ (5 ммоль), EDTA (0,1 ммоль). Для ингибирования протеазной активности использовали таблетированный антипротеазный «коктейль» («Complete Mini», Roche, Швейцария) по инструкции производителя. Далее к 50 мл полученного раствора прибавляли 2,0 мл 10 % Три-

тона-X100. Непосредственно перед применением добавляли дитиотреитол (DTT) из расчета 1 мкл на 1 мл буфера.

Среди всех изученных протоколов ядерной экстракции как наиболее щадящий нами был выбран метод, описанный в работах [6, 8]. Согласно данной методике клетки в количестве 1×10^7 отмывали от среды при 1000 об/мин в течение 5 мин. К осадку добавляли 1,0 мл холодного натрий-фосфатного буфера (PBS), ресуспендированные клетки переносили в чистую пробирку и повторно отмывали в течение 2 мин при 2000 об/мин. Супернатант полностью отбирали. Полученный осадок мягко ресуспендировали в 100 мкл приготовленного буфера с помощью дозатора с 1,0 мл наконечником с отрезанным концом и оставляли для инкубации на 30 мин при +4 °C. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду. Чтобы разрушить набухшие клетки, полученную суспензию 10 раз пропускали через 1 мл шприц с толщиной иглы 26G, после чего отделяли цитозольную фракцию путем 2-минутного центрифугирования при 7000 об/мин при +4 °C. Супернатант (цитоплазматическая фракция) отбирали и помещали на холод (–70 °C) до использования. Полученный осадок (ядерная фракция) 2–3 раза отмывали от остатков цитоплазмы в 800 мкл буфера в течение 2 мин при 7000 об/мин на холоде. Супернатант тщательно отбирали. Для стабилизации ядер осадок ресуспендировали в 1,0 мл PBS с 5 ммоль MgCl₂ и оставляли в полученном растворе минимум на 18 ч при +4 °C.

Мечение ядер

Экспериментальным путем было подобрано оптимальное количество ядер на пробу для постановки РИФ. Суспензию стабилизированных ядер переносили в каждую из пробирок для измерений в объеме 400–500 мкл, что по расчетам соответствовало количеству ядер $(4–5) \times 10^6$.

Успешность процедуры выделения ядер контролировали путем окрашивания ядерной суспензии трипановым синим с последующим подсчетом количества жизнеспособных ядер. Кроме этого, под микроскопом анализировали мазки из полученной суспензии, окрашенные азур-эозином по Романовскому и гематоксилином Майера. Для получения мазков ядерную суспензию дополнительно разбавляли в 5 раз.

Одну часть стабилизированной ядерной суспензии сразу окрашивали соответствующими антителами, а другую — подвергали пермеабилзации с последующим мечением. Для пермеабилзации ядер экспериментальным путем был выбран 90 % холодный метанол как наиболее щадящий и в то же время эффективный реагент. Его добавляли в каждую из опытных проб по 1,0 мл с последующей инкубацией в течение 10 мин при комнатной температуре.

Мечение ядер проводили с использованием в качестве первичных anti-mouse VEGF-R1 #MAB321 (R&D Systems, США) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу. Время инкубации составляло 30 мин при комнатной температуре. Вторичными антителами служили поликлональные goat anti-mouse IgG: FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу, инкубация длилась 30 мин при +4 °С. Чтобы проконтролировать отсутствие остатков цитоплазмы в ядерном экстракте, использовали первичные кроличьи антитела к бета-актину как специфичному цитоплазматическому белку, #4970L (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1: 200 по 50 мкл на пробу. Вторичными антителами служили goat anti-rabbit IgG: Alexa Fluor 488 #A-11008 (Invitrogen, США) 1: 1000 по 30 мкл.

Анализ ядер на проточном цитофлуориметре

Анализ ядер клеток A431 проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Область гейтирования интактных ядер определяли на логарифмическом графике «DotPlot» FSC/SSC. Для выбора гейта интактные стабилизированные ядра окрашивали раствором пропидия йодида (Becton Dickinson, США). Ядра в количестве $(4-5) \times 10^6$ инкубировали 30 мин в 500 мкл раствора пропидия йодида в концентрации 50 мкг/мл при +4 °С.

На графике «DotPlot» FSC/SSC целые ядра располагаются отдельным «облаком» в правой верхней области (рис. 1, а), что подтверждается гистограммой клеточного цикла окрашенных пропидия йодидом ядер (рис. 1, б).

Статистическая обработка результатов

Все результаты исследований подвергали статистической обработке по t-тесту Стьюдента. Достоверными различиями считали значения при $p < 0,05$.

Результаты

Данные 4 независимых экспериментов подтвердили, что выбранный нами алгоритм экстракции, очистки и стабилизации ядер подходит для их иммунофлуоресцентного исследования на проточном цитофлуориметре.

В капле неокрашенной ядерной суспензии практически не наблюдалось поврежденных и слипшихся ядер. Дальнейший анализ мазков, окрашенных трипановым синим, показал, что ~98 % ядер жизнеспособны. Эти данные были подтверждены также результатами микроскопического исследования препаратов, окрашенных азу-эозином и гематоксилином Майера (рис. 2). На представленных снимках хорошо видно, что ядерная мембрана не нарушена, в кариоплазме различимы ядрышки. Остатки цитоплазмы не выявляются, о чем свидетельствует отсутствие розовой окраски эозином.

Чистоту ядерной фракции также контролировали методом нРИФ путем определения цитоплазматического белка бета-актина в ядерной суспензии. Было показано, что во всех экспериментах уровень данного белка не превышал 1 %.

Для оценки локализации VEGF-R1 в пределах ядра использовали интактные ядра, а также ядра после пермеабиллизации метанолом. В первом случае сигнал указывал на наличие белка исключительно на наружной ядерной мембране, а во 2-м — еще и внутри ядра (либо на внутренней ядерной мембране, либо непо-

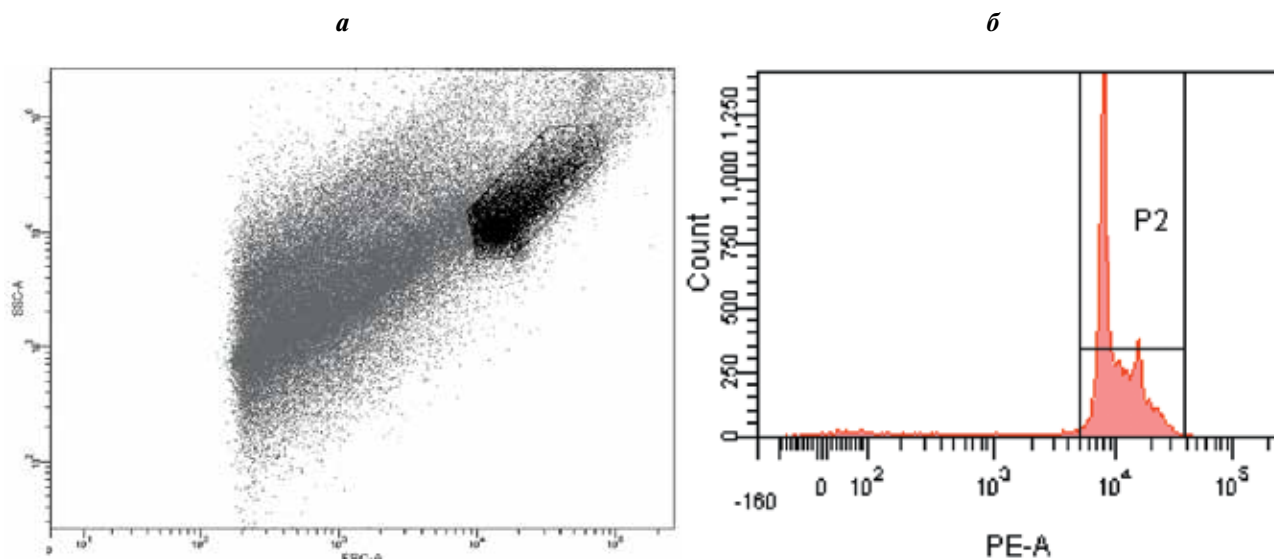


Рис. 1. Выбор гейта для интактных ядер клеток A431: а — график «DotPlot» FSC/SSC. Целые ядра расположены в верхней правой области рисунка отдельным пятном; б — гистограмма клеточного цикла (окраска пропидия йодидом) подтверждает правильность выбора гейта

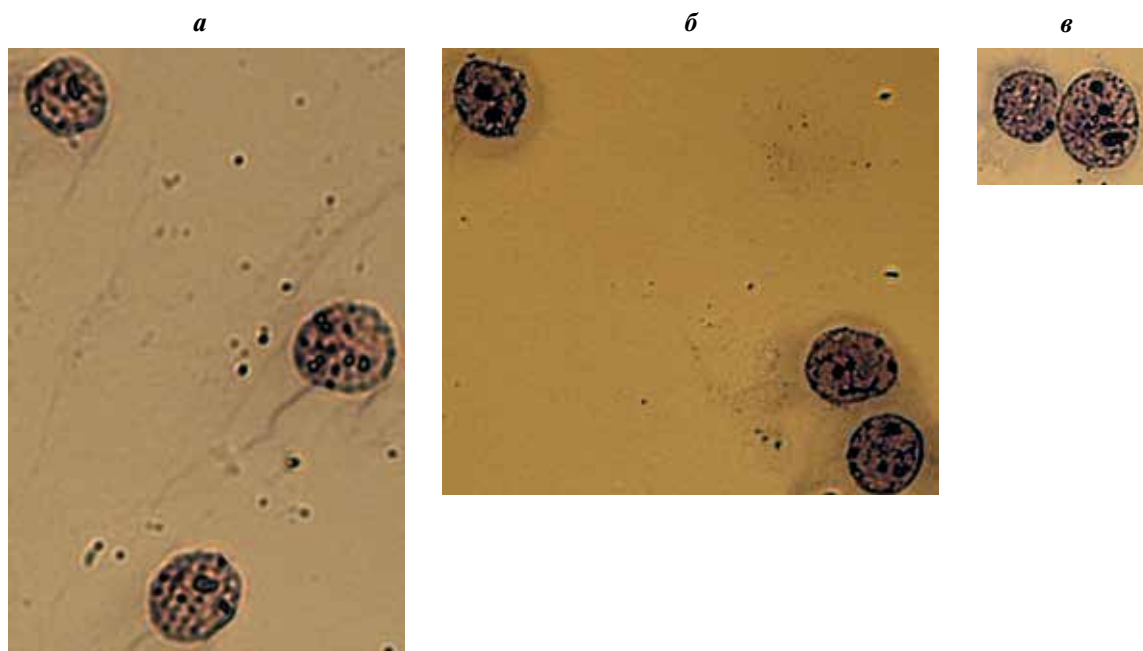


Рис. 2. Микрофотография выделенных intactных ядер клеток A431. Ув. $\times 400$: а — окраска гематоксилином Майера; б, в — окраска азур-эозином по Романовскому

средственно в кариоплазме) (рис. 3). Обнаружено, что уровень сигнала в пермеабилizованных ядрах (рис. 3, г) был выше, чем в intactных (рис. 3, б), в 3,8 раза

($17,9 \pm 1,04$ и $4,8 \pm 0,26$ % соответственно, $p = 0,003$). Это означает, что VEGF-R1 локализуется преимущественно внутри ядра. В обоих случаях доля ядер, не-

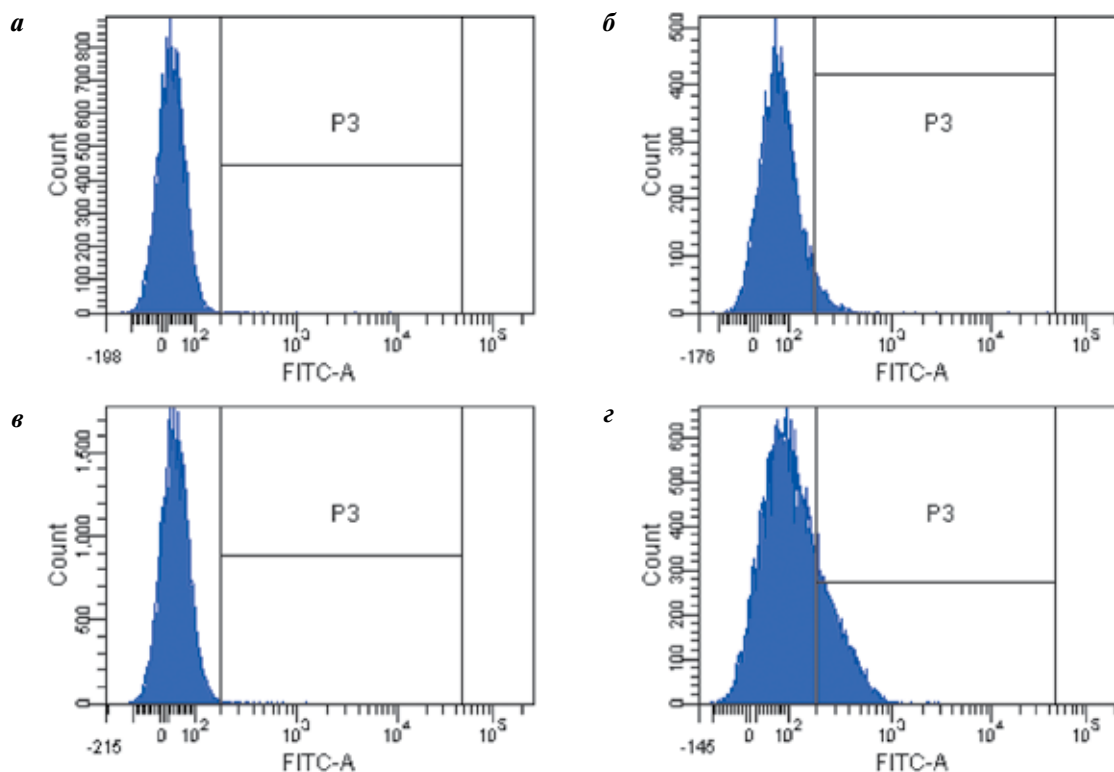


Рис. 3. Непрямая реакция иммунофлуоресценции с intactными ядрами. Уровень флуоресценции коррелирует с содержанием VEGF-R1: а — негативный контроль 1, окраска intactных ядер вторичными антимышиными антителами; б — опыт 1, intactные ядра, экспрессия VEGF-R1 на поверхности ядра; в — негативный контроль 2, окраска пермеабилizованных метанолом ядер вторичными антимышиными антителами; г — опыт 2, ядра после пермеабилizации метанолом. Видно значительное усиление экспрессии рецептора 1-го типа

специфически связавшихся со вторичными антителами, не превышала 0,5 % (рис. 3, а, в). При точном соблюдении вышеописанных условий результаты независимых экспериментов хорошо воспроизводились.

Заключение

Полученные в работе результаты наглядно свидетельствуют о том, что разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер пригоден для идентификации изучаемых ядерных белков на проточном цитофлуориметре. С его помощью нами была доказана ассоциация VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Причем внутри ядра содержание рецептора почти в 4 раза превышало таковое на наружной ядерной оболочке.

В доступной литературе связь рецептора 1-го типа с ядром была показана только в работе [5]. В этом исследовании ИЦХ-методом с применением конфокальной микроскопии авторы установили преимущественную ассоциацию рецептора 1-го типа с ламинами А/С. Ламины, как известно, ответственны за формирование ядерной оболочки и организацию хроматина, а их деградация приводит к апоптозу. Вероятно, VEGF-R1 каким-то образом поддерживает целостность ламинов А/С, чем способствует выживанию опухолевых клеток [9].

Наши результаты не только хорошо согласуются с данными вышеприведенного исследования, но и в ка-

кой-то мере даже дополняют информацию об ассоциации VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Дело в том, что ИЦХ-анализ не позволяет четко разделить окрашивание наружной и внутренней ядерных мембран, в то время как нРИФ дает такую возможность. Так, в случае интактных ядер разработанным методом определяется белок, расположенный исключительно на наружной ядерной мембране, а после ее пермеабиллизации — еще и внутриядерный. Вероятно, что обнаруженный в нашем исследовании резко возросший во 2-м случае уровень сигнала указывал, в том числе, и на VEGF-R1, связанный с ядерной ламиной. В то же время нельзя исключить возможность локализации рецептора и непосредственно в кариоплазме, например во взаимосвязи с хроматином.

Разумеется, наиболее точная информация о локализации и предполагаемых функциях любого белка будет получена лишь при сочетании различных методов исследования. Поэтому нРИФ на выделенных ядрах вместе с широко применяемыми ИЦХ-методом и вестерн-блоттингом позволит дополнить сведения о свойствах ядерноассоциированных протеинов.

Авторы выражают искреннюю благодарность за консультативную и практическую поддержку настоящего исследования сотрудникам компании ООО «ТераМАН» Д.Ю. Тырсину и С.А. Чувпило.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Георгиев Г.П., Мантьева В.Л. Выделение клеточных ядер фенольным методом и их характеристика. Биохимия 1960;25(1):143–50.
2. Mittag F., Leichtle C., Keickbusch I. et al. Cytotoxic effect and tissue penetration of phenol for adjuvant treatment of giant cell tumours. *Oncol Lett* 2013;5(5):1595–98. doi: 10.3892/ol.2013.1244. Epub 2013 Mar 11. PMID: 23760940.
3. Hattori M., Tugores A., Veloz L. et al. A simplified method for the preparation of transcriptionally active liver nuclear extracts. *DNA Cell Biol* 1990; 9(10):777–81. doi: 10.1089/dna.1990.9.777. PMID: 2264931.
4. Fan F., Wey J.S., McCarty M. F. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogen* 2005; 24(16):2647–53. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. PMID: 15735759.
5. Lee T.-H., Seng S., Sekine M. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007;4(6):1001–16. doi:10.1371/journal.pmed.0040186.
6. Tyrsin D. Autoregulation of NFATc1 gene. [Doctorate degree in Natural Sciences]. Wurzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2007.
7. Abcam. Product Datasheet for Anti-VEGF Receptor 1 antibody ab2350.
8. Chuvpilo S., Avots A., Berberich-Siebelt F. et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 1999;162(12):7294–301. PMID: 10358178.
9. Broers J.L. V., Ramaekers F.C. S. The role of the nuclear lamina in cancer and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2014;773: 27–48. doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_2. PMID: 24563342.