doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.014

不同固定液对体外细胞系荧光蛋白淬灭及对胞内蛋白荧光染色的影响*

林国豪[1,2,3] 蒋 旭[1,2,3] 孙丽纳[1,2,3,4] 王 昊[1,2,3,4] 姚 茜[1,2,3,4] 韦正波[4] 谢 莹[1,2△]

(1 广西医科大学生命科学研究院 广西 南宁 530021;2 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室 广西 南宁 530021;3 广西医科大学研究生学院 广西 南宁 530021;4 广西医科大学附属肿瘤医院头颈外科 广西 南宁 530021)

摘要 目的:比较不同细胞固定液对荧光蛋白淬灭情况以及核内、胞浆蛋白免疫荧光染色的影响。**方法:**分别对融合了 RFP 和 GFP 基因的鼻咽癌 HK1 细胞采用 95 %乙醇、75 %乙醇、甲醇、丙酮:甲醇 =1:1、5 %冰乙酸、Carnoy 固定液进行固定,然后采用免疫荧光法对细胞进行免疫染色。**结果:**六种固定液均能使荧光蛋白猝灭。免疫荧光染色方面,对于核蛋白染色,75 %乙醇、95 %乙醇、丙酮:甲醇 =1:1、Carnoy 固定液固定后核区获得明显的荧光染色,而采用甲醇、5 %冰乙酸固定后荧光染色不明显。对于胞质蛋白染色,按荧光染色的清晰程度分为固定于 Carnoy 固定液 > 丙酮:甲醇 =1:1> 甲醇 >5 %冰乙酸 >75 %乙醇 >95 %乙醇,前四者固定可见分布于胞质,75 %乙醇或 95 %乙醇固定的目标蛋白定位不清。**结论:**六种不同的固定液在有效失活荧光蛋白的情况下对核蛋白及胞浆蛋白抗原性的影响略有不同,可根据研究目的蛋白表达的部位及特点来选用合适的固定液。

关键词:荧光蛋白;猝灭;免疫荧光;固定方法

中图分类号:R-33;R739.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)11-2072-04

Effects of Different Fixatives on the Quenching of Fluorescent Proteins *in Vitro* Cell Lines and Intracellular Protein Fluorescence Staining*

LIN Guo-hao[1,2,3], JIANG Xu[1,2,3], SUN Li-na[1,2,3,4], WANG Hao[1,2,3,4], YAO Xi[1,2,3,4], WEI Zheng-bo[4], XIE Ying[1,2△]

(1 Life Science Institute, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 2 Key Laboratory for Early Prevention and Treatment of Endemic Tumors, Ministry of Education, Nanning, Guangxi, 530021, China; 3 Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 4 Department of Head and Neck Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

ABSTRACT Objective: Comparing the effects of different cell fixatives on the quenching of fluorescent proteins and the nuclear and cytoplasmic protein antigenicity. **Methods:** Nasopharyngeal carcinoma HK1 cells fused with RFP and GFP genes were fixed with 95% ethanol, 75% ethanol, methanol, acetone: methanol=1:1, 5% glacial acetic acid, Carnoy' fixative, respectively. All cells were stained by immunofluorescence method. **Results:** Six fixation buffers can quench the fluorescent protein. For immunofluorescence staining, for nucleoprotein staining, 75 % ethanol, 95 % ethanol acetone: methanol = 1:1 fixation, Carnoy's fixative fixed nuclear staining after obtaining significant fluorescent staining. The fluorescence signal was weakened by fixation with methanol, 5 % glacial acetic acid. For cytoplasmic protein staining, the performed according to the clarity of fluorescent staining was Carnoy's fixative > acetone: methanol = 1:1 > methanol fixation > 5 % glacial acetic acid > 75 % ethanol > 95 % ethanol, the first four were fixedly distributed in the cytoplasm, 75 % ethanol and 95 % ethanol was fixedly distributed in the nucleus. **Conclusions:** Six different fixatives have slightly different effects on the antigenicity of nuclear protein and cytosolic protein in the case of effective inactivation of fluorescent protein. The appropriate fixative can be selected according to the location and characteristics of the protein expression of the research object.

Key words: Fluorescent protein; Quenching; Immunofluorescence; Fixation method

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R739.6 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)11-2072-04

前言

荧光蛋白是生物学研究上的革新,通过对目标基因及蛋白的荧光标记,可以作为示踪剂观察到细胞的活动[1],也可以作为报告基因应用到多种生物学及分子生物学的研究中[2,3]。因为绿色荧光蛋白研究的突出贡献,美籍华人科学家钱永健也因此获得了 2008 年诺贝尔化学奖。然而,在许多研究中,需运用免疫荧光法对融合了荧光蛋白的细胞胞内蛋白进行定位观察,而荧光蛋白的发射波长会与部分荧光染料的发射波长发生重叠,特别是在多标记时,若不能有效的失活荧光蛋白,将会对目的蛋

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81760361);广西壮族自治区自然科学基金项目(2017GXNSFAA198064,2016GXNSFAA380096)

作者简介:林国豪(1991-),硕士研究生,主要研究方向:鼻咽癌综合防治,E-mail: 118022181@qq.com

△ 通讯作者:谢莹(1978-),硕士生导师,教授,主要研究方向:鼻咽癌综合防治,E-mail: xieying2002@hotmail.com,电话:0771-5358634

(收稿日期:2019-01-08 接受日期:2019-01-30)

白的定位以及相关的成像分析产生影响[4,5]。而部分固定液在失活荧光蛋白的同时会对目标抗原性造成一定的损伤，影响检测结果，为了检验不同固定液的作用，我们选取含 RFP 和 GFP 的鼻咽癌细胞作为研究模型，采用不同固定液进行固定，观察荧光蛋白猝灭情况以及对胞核和胞质蛋白免疫荧光染色的影响，为实验条件摸索奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

携带 GFP 和 RFP 的鼻咽癌 HK1 细胞均为本课题组前期构建过稳定表达 A 蛋白（定位在细胞核及部分线粒体中）的慢病毒感染细胞，分别为 HK1-RFP 和 HK1-GFP，慢病毒载体购于广州复能基因有限公司。B 为看家基因，常规主要表达于细胞胞浆中，经 WB 验证，两种 HK1 细胞中均稳定表达 B 蛋白和少量 A 蛋白。DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司。鼠抗 A 蛋白单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司，兔抗 B 蛋白单克隆抗体购于英国 Abcam 公司，荧光二抗 Anti-mouse IgG (H+L) F (ab')2 Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) 和 Anti-rabbit IgG (H+L) F(ab')2 Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate)购于美国 CST 公司。正常山羊血清、胰蛋白酶 -EDTA 消化液(0.25 %)和 Carnoy 固定液购于北京索莱宝公司。其余试剂均为国产分析纯级。载玻片培养系统（8 腔室）购置于德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与接种 将 HK1-RFP 和 HK1-GFP 分别接种于含 10 %胎牛血清 /DMEM 培养基的透气 T25 培养瓶，置于 5 % CO_2、37 ℃的 95 %湿度恒温培养箱中培养。待细胞生长至 80～90 %的融合度时，用胰蛋白酶 -EDTA 消化液(0.25 %)将细胞消化成 5× 10^6 个 /mL 的单细胞悬液。将细胞接种于载玻片培养系统内，每种细胞接种六个腔室，每腔室细胞密度为 8× 10^4 个。

1.2.2 细胞固定 当细胞贴壁生长密度达到 80～90 %时取出，吸净培养液，用 1PBS 缓冲液洗细胞三次，3 min/ 次。两种细胞每孔对应的固定液分为 6 种：① 95 %乙醇；② 75 %乙醇；③ 甲醇；④ 丙酮：甲醇 =1：1；⑤ 5%冰乙酸；⑥ Carnoy 固定液。固定条件均为室温下固定 20 min。固定完毕，用 1× PBS 缓冲液洗细胞三次，5 min/ 次。

1.2.3 免疫荧光反应 室温下用 5 %正常山羊血清封闭已固定好的细胞，30 min。每孔加入用抗体稀释液以 1：500 稀释比例的一抗（蛋白 A、B 抗体混合液），4 ℃过夜。一抗孵育完毕，用 1× PBS 缓冲液洗细胞三次，5 min/ 次。每孔加入用抗体稀释液以 1：1000 稀释比例的荧光二抗（兔抗、鼠抗混合液）37 ℃孵育 1 h。用 1PBS 缓冲液洗后，加 DAPI 复染核，最后镜检。

2 结果

2.1 6 种不同的固定液对荧光蛋白 RFP 和 GFP 的影响

将 6 种固定液同时加入对应的孔内，镜下实时观察。甲醇、丙酮：甲醇 =1：1、5 %冰乙酸和 Carnoy 固定液在加入细胞时，细胞内荧光蛋白 RFP 和 GFP 的荧光立即消失。95 %乙醇和 75 %乙醇下的 RFP 和 GFP 随时间增加强度显著降低，且 RFP 和 GFP 的荧光在 95 %乙醇条件下先于 75 %乙醇条件下消失，两者荧光在 75 %乙醇约 20 分钟时消失。综上，6 种不同的固定液均能使荧光蛋白 RFP 和 GFP 猝灭，见图 1 和图 2。

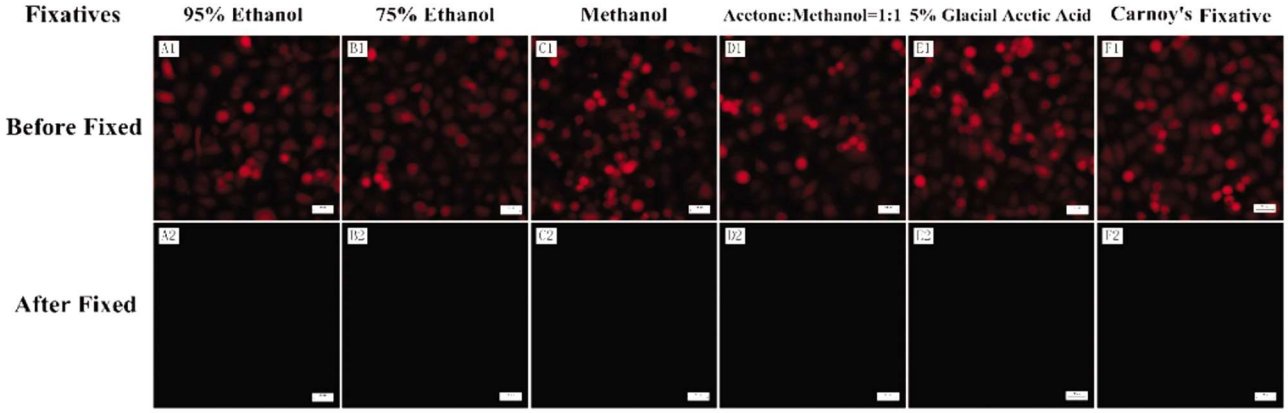


图 1 不同固定液对 HK1-RFP 细胞内 RFP 的影响（室温 20 min）

Fig.1 Effect of different fixatives on RFP in HK1-RFP cells (Room temperature for 20 min)

2.2 6 种不同的固定液对细胞内核内及胞浆蛋白抗原性的影响

由研究结果可知，无论是 HK1-RFP 还是 HK1-GFP 细胞，对于核蛋白 A 来说，除甲醇和 5 %冰乙酸获得的荧光染色较弱外，见图 3C1、3E1、4C1、4E1，95 %乙醇、75 %乙醇、甲醇：丙酮 1:1 和 Carnoy 固定液固定后均能获得清晰的染色结果，见图 3A1、3B1、3D1、3F1、4A1、4B1、4D1、4F1，其中 75 %乙醇固定后荧光强度最高。

对于胞质蛋白 B，甲醇、丙酮：甲醇 =1:1、5 %冰乙酸和 Carnoy 固定液进行细胞固定后，荧光染色清晰，定位准确，见图 3C2、3D2、3E2、3F2、4C2、4D2、4E2、4F2，其中以 Carnoy 固定液固定的荧光强度最高。而 75 %和 95 %的乙醇组胞浆抗原会出现向核移位的现象，95 %的乙醇组尤为明显。见图 3A2、3B2、4A2、4B2。

3 讨论

荧光蛋白是由基因编码的[6]，在研究过程中可以将目的基因与荧光蛋白基因构成融合基因，转染进入合适的细胞进行表达，可以起到对细胞进行标记和便于筛选的作用[7]。作为一种常

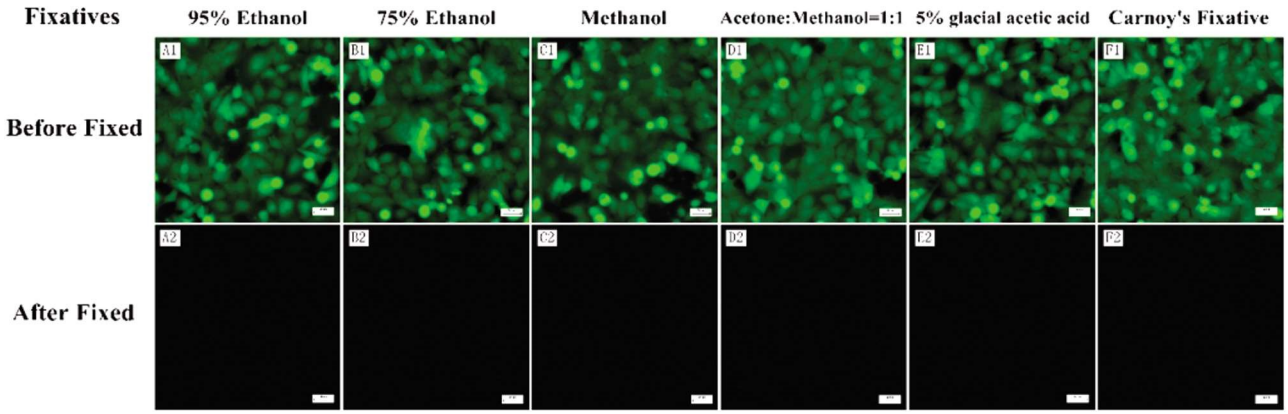


图 2 不同固定液对 HK1-GFP 细胞内 GFP 的影响(室温 20 min)

Fig.2 Effect of different fixatives on RFP in HK1-RFP cells (Room temperature for 20 min)

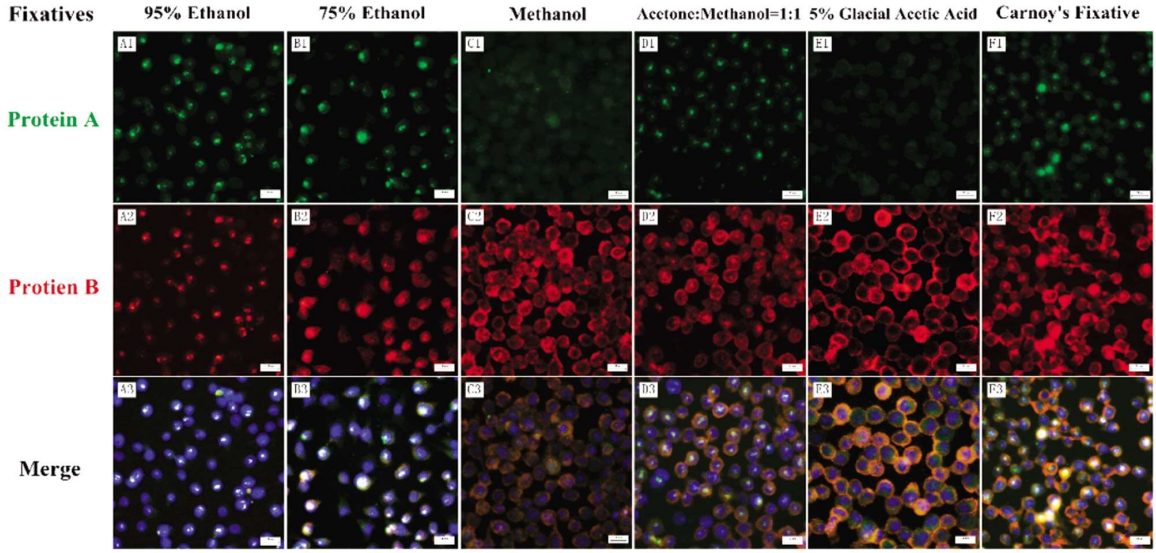


图 3 不同固定液对 HK1-RFP 细胞内蛋白免疫染色的影响

Fig.3 Effect of different fixatives on protein immunostaining in HK1-RFP cells

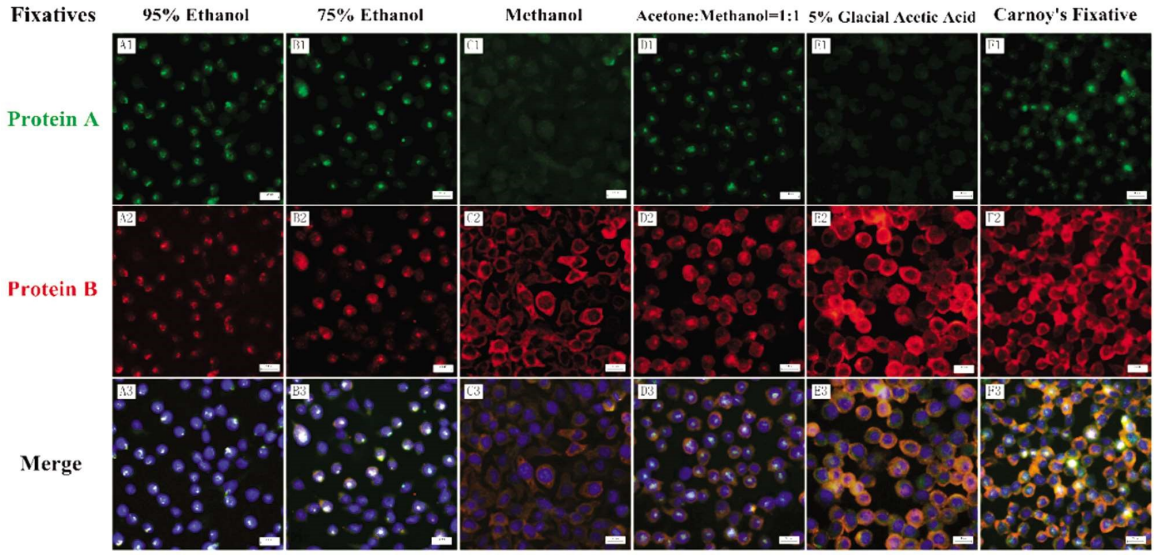


图 4 不同固定液对 HK1-GFP 细胞内蛋白免疫染色的影响

Fig.4 Effect of different fixatives on protein immunostaining in HK1-GFP cells

用的报告基因,荧光蛋白已应用在生物学的许多研究领域中[8,9],特别是在肿瘤研究中,它的出现使科研人员能清晰观测到癌细胞的动态,如癌细胞的生长、入侵、运动和新生成等。常见的荧光蛋白有红色荧光蛋白(Red fluorescent protein, RFP)、绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)和黄色荧光蛋白(Yellow fluorescent protein, YFP)等。免疫荧光技术是标记免疫技术中发

展最早的一种,常用于生物学及医学实验中,该技术可对特定分子的位置和细胞结构的信息以图像的形式直观呈现[10]。在许多研究中,转染荧光蛋白融合基因的细胞由于后续实验的要求也常常需要进行免疫荧光染色,用于细胞生物学中以研究组织,细胞和亚细胞水平上的差异蛋白质表达,定位及分布[11,12]。由于荧光二抗所发出的荧光在波长上常常与荧光蛋白的重叠,如何避免荧光蛋白对实验结果的干扰同时最大程度的保持胞内蛋白的抗原性显得尤为重要。所以,实验结果准确性的关键所在取决于选取合适的固定液。

在免疫荧光实验中,固定这一步骤的目的在于保持细胞或组织的原有形态结构完整性。固定液能阻止内源性溶酶体酶对自身细胞和组织的自溶、抑制细菌和霉菌的生长,其化学性质使细胞中的蛋白质、脂肪、糖、酶等成分转变为不溶性物质,以保持生前的形态,同时使组织内各种物质成分产生不同的折光率,便于染色、观察和鉴定。固定液可分为醛类固定液、醇类固定液、氧化剂类固定液、苦味酸盐类固定液等,较为常用的固定液如醛类中的多聚甲醛和福尔马林、醇类中的甲醇和乙醇。由于多聚甲醛和福尔马林不能有效的猝灭荧光蛋白,所以本研究主要选取了 95 %乙醇、75 %乙醇、甲醇、丙酮:甲醇 =1:1、5 %冰乙酸、Carnoy 固定液作用于融合了 RFP、GFP 基因的鼻咽癌模型进行研究,观察细胞内荧光蛋白猝灭情况以及对胞核和胞质蛋白免疫荧光染色的影响。为了避免实验条件所带来的误差,故所有细胞实验条件设定均为室温下固定 20 min。研究结果显示,在相同的处理温度和时间下,95 %乙醇、75 %乙醇、甲醇、丙酮:甲醇 =1:1、5 %冰乙酸、Carnoy 固定液均能使荧光蛋白猝灭,这与张广峰等的研究结果相似[13]。

本研究还发现,不同固定液对胞内蛋白抗原性产生不同影响。就乙醇固定而言,乙醇是一种蛋白质沉淀剂,一般认为能较好地保存抗原,特别是核内抗原,可见核染色清晰,有研究指出乙醇对某些蛋白免疫识别可能在很大程度上得到保护[14]。而对于胞质蛋白 B,75 %乙醇固定可见分布于胞质和胞核,95 %乙醇固定的可见分布于胞核,这可能和乙醇的性质有关,乙醇具有固定、硬化和脱水的作用,其特点是杀死快,渗透强,可使细胞或组织变硬。同时乙醇固定使细胞发生收缩[15],能使某些胞质蛋白易位到核内的原理有关[16],从实验结果来看,提示胞质蛋白易位程度可能和乙醇的浓度有关。使用甲醇固定时,其脂溶性会损伤细胞通透性,使得核区荧光染色不明显[17],这可能和甲醇固定液对细胞核固定不良且会使蛋白降解有关[18],同时甲醇固定影响结构完整性的特性使得胞质蛋白荧光染色较为弥散[19]。而使用丙酮:甲醇 =1:1 固定后可见核蛋白有清晰的染色,这可能与丙酮存在有关,丙酮中和了甲醇对核区抗原不利的影响,在室温下能保持靶蛋白的抗原性[20],而胞质蛋白染色清晰度稍显不足,推测与丙酮固定不完全有关[21]。此外,5 %冰乙酸固定后核区无明显的荧光染色,胞质固定后所获得的染色效果也较差,推测与冰乙酸属有机强酸有关,导致细胞膨胀破裂、细胞内结构散失,会损伤细胞抗原性。而对于使用 Carnoy 固定液,核区和胞质区域获得了较为清晰的荧光染色,这可能与其成分有关,该固定液含 60 %乙醇、30 %氯仿和 10 %冰乙酸[22],其特点是能迅速穿透细胞,将其固定并维持染色体等结构的完整性,还能够增强染色体的嗜碱性,达到优良染色效果。有文献报道了 Carnoy 固定液适用于蛋白质的组织化学检测,已用于许多常规和特殊染色技术中[23],并能保留细胞形态和分子完整性[24]。

综上所述,本研究主要阐述了 6 种不同的固定液对细胞内荧光蛋白淬灭情况以及胞内蛋白免疫染色的影响。6 种不同的固定液均能使荧光蛋白猝灭。而对于选择细胞固定液来说,各种固定液均有自己的特点,实验人员还需根据目的蛋白的特性、定位及分布来选择较为合适的固定液进行固定。同时,也要控制好固定的时间及温度,以获得满意的结果。

参 考 文 献(References)

[1] Hostettler L, Grundy L, Kaser-Pebernard S, et al. The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo[J]. G3 (Bethesda), 2017, 7: 607-615

[2] Richie CT, Whitaker LR, Whitaker KW, et al. Near-infrared fluorescent protein iRFP713 as a reporter protein for optogenetic vectors, a transgenic Cre-reporter rat, and other neuronal studies [J]. J Neurosci Methods, 2017, 284: 1-14

[3] Cui Y, Gao C, Zhao Q, et al. Using Fluorescent Protein Fusions to Study Protein Subcellular Localization and Dynamics in Plant Cells [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1474: 113-123

[4] Saunders MJ, Block E, Sorkin A, et al. A bifunctional converter: fluorescein quenching scFv/fluorogen activating protein for photostability and improved signal to noise in fluorescence experiments[J]. Bioconjug Chem, 2014, 25: 1556-1564

[5] Valm AM, Oldenbourg R, Borisy GG. Multiplexed Spectral Imaging of 120 Different Fluorescent Labels [J]. PLoS One, 2016, 11: e0158495

[6] Sanford L, Palmer A. Recent Advances in Development of Genetically Encoded Fluorescent Sensors[J]. Methods Enzymol, 2017, 589: 1-49

[7] Renaud E, Martineau P, Guglielmi L. Solubility Characterization and Imaging of Intrabodies Using GFP-Fusions [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1575: 165-174

[8] Santos-Beneit F, Errington J. Green fluorescent protein as a reporter for the spatial and temporal expression of actIII in Streptomyces coelicolor[J]. Arch Microbiol, 2017, 199: 875-880

[9] Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, et al. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca^{2+} in organelles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 2584-2589

[10] Donaldson JG. Immunofluorescence Staining[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2015, 69: 431-437

[11] Maity B, Sheff D, Fisher RA. Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments [J]. Methods Cell Biol, 2013, 113: 81-105

[12] Sellars LE, Bryant JA, Sanchez-Romero MA, et al. Development of a new fluorescent reporter:operator system: location of AraC regulated genes in Escherichia coli K-12[J]. BMC Microbiol, 2017, 17: 170

[13] 张广峰, 陈祥贵, 帅培强, 等. 细胞固定剂对 GFP 发光特性影响的研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27: 38-40

[14] Otali D, He Q, Grizzle WE. The effect of antigen retrieval on cells fixed in 10% neutral buffered formalin followed by transfer to 70% ethanol[J]. PLoS One, 2013, 8: e82405

[15] Kuzmin AN, Pliss A, Prasad PN. Changes in biomolecular profile in a single nucleolus during cell fixati on [J]. Anal Chem, 2014, 86: 10909-10916

(下转第 2050 页)

cient Macrophages[J]. J Biol Chem, 2017, 292(11): 4651-4662

[22] Bekpen C, Marques-Bonet T, Alkan C. Death and resurrection of the human IRGM gene[J]. PLoS Genet, 2009, 5(3): e1000403

[23] Brest P, Lapaquette P, Souidi M, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease [J]. Nat Genet, 2011, 43: 242-245

[24] Mehto S, Jena KK, Nath P, et al. The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy[J]. Mol Cell, 2018

[25] Xu Y, He Z, Li Z, et al. Irgm1 is required for the inflammatory function of M1 macrophage in early experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(2): 507-517

[26] Zhaorigetu S, Rodriguez-Aguayo C, Sood AK, et al. Delivery of negatively charged liposomes into the atherosclerotic plaque of apolipoprotein E-deficient mouse aortic tissue [J]. J Liposome Res, 2014, 24(3): 182-190

[27] Wiśniewska A, Olszanecki R, Totoń-Żurańska J, et al. Anti-Atherosclerotic Action of Agmatine in ApoE-Knockout Mice[J]. Int J Mol Sci, 2017,18(8): pii: E1706

[28] Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, et al. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction [J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 146

[29] Fucan Xia, Rui Li, Chaodong Wang, et al. IRGM1 regulates oxidized LDL uptake by macrophage via actin-dependent receptor internalization during atherosclerosis[J]. Sci Rep, 2013, 3: 1867

[30] Bisgaard LS, Mogensen CK, Rosendahl A, et al. Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression—Implications for atherosclerosis research[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35234

[31] Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis Biochemistry (Mosc), 2016, 81 (11): 1358-1370

[32] Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 9582430

（上接第 2075 页）

[16] Panda R, Krieger T, Hopf L, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Selected Antigens of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies[J]. Front Immunol, 2017, 8: 439

[17] 韩陈陈, 马旸, 李亦凡, 等. 不同固定液对内皮细胞形态和 EP4 荧光染色的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51: 1372-1374

[18] 林哲绚, 罗红军, 李慧, 等. 免疫荧光技术中不同固定剂对细胞 p65 核移位观察效果的影响[J]. 山西医药杂志, 2012, 41: 211-212

[19] Smith-Clerc J, Hinz B. Immunofluorescence detection of the cytoskeleton and extracellular matrix in tissue and cultured cells [J]. Methods Mol Biol, 2010, 611: 43-57

[20] Rogers GL, Hoffman BE. Optimal Immunofluorescent Staining for Human Factor IX and Infiltrating T Cells following Gene Therapy for Hemophilia B[J]. J Genet Syndr Gene Ther, 2012 Aug 15;S1. pii: 012

[21] Yamanushi TT, Boyett MR, Yamamoto Y, et al. Comparison of formaldehyde and methanol fixatives used in the detection of ion channel proteins in isolated rat ventricular myocytes by immunofluorescence labelling and confocal microscopy [J]. Folia Morphol (Warsz), 2015, 74: 258-261

[22] Hasegawa Y, Mark Welch JL, Rossetti BJ, et al. Preservation of three-dimensional spatial structure in the gut microbiome [J]. PLoS One, 2017, 12: e0188257

[23] Rieger J, Twardziok S, Huenigen H, et al. Porcine intestinal mast cells. Evaluation of different fixatives for histochemical staining techniques considering tissue shrinkage [J]. Eur J Histochem, 2013, 57: e21

[24] Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, et al. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity [J]. Histopathology, 2015, 66: 388-397