

保卫细胞液泡活体标记方法的比较

高新起* 任秋萍¹ 王转斌²(山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018; ¹聊城大学农学院, 聊城 252059;²曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165)

摘要 液泡的活体标记是研究保卫细胞液泡动态的前提。结合作者的研究, 介绍了利用丫啶橙(acridine orange, AO)、Lysotracker Red DND-99、二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)、2', 7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄(BCECF-AM)以及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因等活体标记保卫细胞液泡的方法。研究表明, AO可以方便和快捷的标记保卫细胞液泡; FDA标记可以显示液泡的边界, 也可以用于保卫细胞液泡的标记。利用转染GFP融合基因的方法也是标记保卫细胞液泡的最好选择。

关键词 保卫细胞; 液泡; 活体标记

液泡参与植物的多种生理活动过程^[1], 也是保卫细胞调节气孔运动的重要的细胞器之一。气孔运动过程中保卫细胞的液泡是一个动态的结构, 液泡的动态对气孔的运动是必须的^[2]。液泡动态的研究依赖于液泡的活体标记。观察液泡的动态多是采用活体标记然后在显微镜下观察。中性红是较早用于植物液泡标记的试剂, 为弱碱性染料, 专一在酸性的细胞器中积累。在中性或微碱性环境中, 植物活细胞的液泡吸收中性红。进入液泡的中性红解离出阳离子⁺而呈现红色, 因此可以清楚的在普通光学显微镜下观察到液泡的分布。随着荧光显微镜的应用, 特别是共聚焦显微镜的发明, 使光学显微镜的分辨率和图像质量大大提高。因此利用荧光染料和荧光蛋白标记亚细胞结构成为研究活细胞首选的方法。本文结合我们在研究保卫细胞液泡过程中积累的一些荧光标记的经验, 着重比较了几种不同液泡活体标记方法的适用范围和优缺点。

1 材料与方法

实验材料为蚕豆(*Vicia faba* L.)和烟草(*Nicotiana glauca* L.), 种植在光/暗周期为 12 h/12 h, 光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度为 22 $^{\circ}\text{C}/17^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 70% 的温室中。取蚕豆和烟草生长幼苗顶端完全展开的叶片, 撕取下表皮放入缓冲液中进行实验。缓冲液为 10 mmol/L 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES, pH 6.1)、丫啶橙(acridine orange, AO, Fluka 公司)、二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA, Sigma 公司)、

Lysotracker Red DND-99(Molecular Probes 公司)、2', 7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄(BCECF-AM, Molecular Probes 公司)均用MES缓冲液配制或者稀释到所需要的浓度。叶片下表皮用AO、FDA、Lysotracker Red DND-99、BCECF-AM染色后, MES缓冲液冲洗。荧光标记的材料均在Zeiss LSM510 META型共聚焦激光扫描显微镜观察。经AO、FDA、BCECF-AM标记的材料均用488 nm 氩离子激光激发, 505~530 nm 滤光片检测信号。Lysotracker Red DND-99标记的材料用543 nm He/Ne 激光激发, 580~615 nm 滤光片检测信号。保卫细胞液泡绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的标记, 采用农杆菌介导的方法将35S-GFP-KCO1转入烟草, 经PCR鉴定, 阳性苗用于保卫细胞液泡的观察。Zeiss LSM 510 META型共聚焦激光扫描显微镜观察, 488 nm 激光激发, 505~530 nm 滤光片检测信号。图像先经LSM 5 Image Browser (Zeiss)处理, 输出为TIFF图像后, 用Adobe Photoshope 6.0处理。

2 结果

2.1 AO 标记保卫细胞的液泡

AO是一种弱碱性染料, 可以在酸性的细胞器中积累, 这个积累过程可能依赖液泡膜质子泵V-AT-Pases的作用^[3]。AO被广泛的应用于标记各种植物

收稿日期: 2007-12-07 接受日期: 2008-02-04

国家自然科学基金资助项目(No.30770193)

* 通讯作者。Tel: 0538-8246020, E-mail: gaoxq@sdau.edu.cn

组织的液泡。标记蚕豆下表皮气孔时,用10 $\mu\text{mol/L}$ AO, 25 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min, MES 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min。共聚焦显微镜下可以清晰的观察到蚕豆保卫细胞中的小液泡发出明亮的绿色荧光(图 1A)。由于 AO 也能够与核酸结合发出荧光, 因此在利用 AO 标记蚕豆保卫细胞液泡时需要注意试剂的浓度和标记的时间。如果条件不合适, 不仅保卫细胞的液泡呈现绿色, 细胞核也出现绿色荧光, 妨碍对液泡的观察(图 1B)。

2.2 LysoTracker Red DND-99 标记保卫细胞的液泡

由于 AO 在标记液泡时也能标记细胞核, 有时会对实验结果造成影响, 人们又开发了多种专门用于标记酸性细胞器的荧光染料。Molecular Probes 公司开发的 LysoTracker 系列荧光探针可以特异的在酸性细胞器中积累, 荧光的颜色有绿、红、黄、蓝等。LysoTracker 是一种可以自由跨膜的试剂, 在动物细胞和酵母细胞中研究证明, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 浓度是 50 nmol/L LysoTracker 在 30 min 内就能标记酸性的细胞器^[4]。我们利用 50 nmol/L LysoTracker Red DND-99 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育蚕豆保卫细胞时, 短时间内很难标记液泡, 即使标记的时间延长到 2 h 很难得到理想的结果。我们推测保卫细胞增厚的细胞壁可能是标记效果不好的原因。此外, 由于担心 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下标记可能会影响保卫细胞的活性, 所以我们在标记时温育的温度较低也可能是原因之一。最后,

我们利用 100 nmol/L LysoTracker Red DND-99 染色 40~60 min, 能够标记保卫细胞的液泡(图 1C)。但是长时间标记和高浓度染料处理, 可能会产生非特异的标记, 经常会产生类似于图 1D 的标记结果, 从图中观察, 染料标记在细胞质中的结构上。

2.3 BCECF-AM 标记保卫细胞的液泡

BCECF 是 Molecular Probes 公司开发的用于测定 pH 的荧光试剂, 其酯化的形式 BCECF-AM 能够自由跨膜。进入细胞后被酯酶水解为 BCECF, 发出荧光。最初 BCECF-AM 是被用于测定动物细胞的胞质 pH 值。尽管有的研究表明 BCECF 在细胞质中积累, 而且也被用于测定保卫细胞细胞质的 pH^[5]。但是也有研究发现, BCECF 在液泡内积累^[6], 而且也被用于保卫细胞液泡 pH 值的测定^[7]。可能的原因是 BCECF-AM 需要在细胞质中被酯酶水解为 BCECF, 然后再进入液泡^[8]。的确, 我们利用 20 $\mu\text{mol/L}$ BCECF-AM 溶液 25 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min, 有时观察到类似图 1E 的标记结果, 可以清楚得观察到液泡。但是, 有时也经常观察到整个保卫细胞的细胞质中都充满绿色荧光(图 1F)。

2.4 FDA 标记保卫细胞的液泡

FDA 是一种可以自由跨膜的荧光染料, FDA 进入细胞质后, 被细胞质中的脂酶分解, 释放出荧光素。死细胞中酶的活性丧失, FDA 不被分解, 细胞不会呈现绿色荧光, 所以 FDA 经常用于鉴定细胞的活性。由于 FDA 被排除在液泡外不能进入液泡^[9], 因

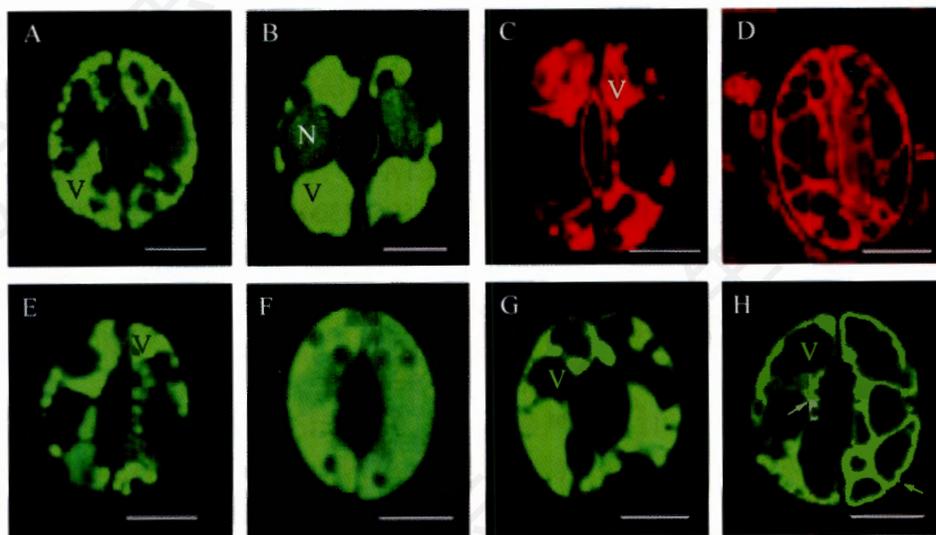


图 1 保卫细胞液泡的荧光标记

A: AO 标记的蚕豆未开放气孔保卫细胞的液泡; B: AO 标记的蚕豆开放气孔保卫细胞的液泡, 保卫细胞的细胞核也被标记; C: LysoTracker Red DND-99 标记的蚕豆半开放气孔保卫细胞的液泡; D: LysoTracker Red DND-99 标记蚕豆未开放气孔的保卫细胞, 细胞质被标记; E: BCECF-AM 标记的蚕豆未开放气孔保卫细胞的液泡; F: BCECF-AM 标记的蚕豆保卫细胞; G: FDA 标记的蚕豆半开放气孔保卫细胞的液泡; H: 35S-GFP-KCO1 标记的烟草关闭气孔保卫细胞的液泡膜(箭头)。V: 液泡; N: 细胞核; Bar=10 μm 。

此液泡内没有荧光, 只有细胞质中呈现绿色荧光, 细胞质明亮的荧光和液泡的暗区域形成对比, 也能反映出液泡的轮廓。标记的结果与特异标记液泡膜的染料 FM4-64 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide] 标记结果^[10]类似, 也能够标记液泡的边界。我们用 1 $\mu\text{mol/L}$ FDA 溶液 25 $^{\circ}\text{C}$ 染色 1~5 min, MES 缓冲液冲洗, 也能清楚的标记蚕豆保卫细胞的液泡的边界(图 1G), 在开放气孔的保卫细胞中, 通常只有几个大的液泡。标记的结果与在透射电镜上观察的结果相似^[2]。

2.5 GFP 标记保卫细胞的液泡

GFP 是海洋生物水母(*Aequoria victoria*)体内的一种发光蛋白。人工改造的 GFP 基因能在活细胞内稳定表达而且对受体细胞无毒性, 可以很方便的进行活体观察。GFP 标记在细胞生物学研究中的应用越来越广泛^[11]。已经有多个利用 GFP 标记植物细胞液泡成功的例子。AtKCO1 是定位在保卫细胞液泡膜上的 K^{+} 通道蛋白^[12]。在烟草中表达 35S-GFP-KCO1, 能清晰的观察到保卫细胞液泡膜的分布状态(图 1H)。

3 讨论

研究液泡的动态变化, 要求标记染料对细胞活力的影响要小, 标记时间也要尽量缩短。尽管 LysoTracker 已经被证明在标记动物和酵母以及植物细胞原生质体的酸性细胞器方面是有效的^[9], 但是我们的实验结果表明, 用 LysoTracker 系列试剂标记保卫细胞的液泡, 需要较长的标记。此外标记的浓度要比在动物细胞的标记浓度高。但是 LysoTracker 试剂有一个优点, 就是在活体标记后, 即使用甲醛固定杀死细胞, 染料仍然保持在原来的位置, 荧光特性也不改变, 因此适于需要进行免疫定位的组织中液泡的研究。尽管 AO 也可以结合核酸, 使细胞核发出荧光。但是, 有很多实验证据表明, AO 可以标记植物液泡^[13,14]。与 LysoTracker 相比较而言, AO 可以在较低的浓度、短时间内标记保卫细胞的液泡。我们发现只要控制标记的时间和试剂浓度, 仍然可以很好地标记保卫细胞的液泡。因此和 LysoTracker 系列试剂相比较, AO 更适合标记保卫细胞的液泡。Molecular Probes 公司开发用于测定 pH 值的试剂 BCECF-AM 也可被用于液泡的标记。从他人的研究结果和我们标记的结果来看, BCECF-AM 的确可以标记保卫细胞的液泡, 但是在很多情况下, 细胞质也发出荧光。因此如果利用

BCECF-AM 标记保卫细胞的液泡, 研究 BCECF-AM 的运动和水解的机制以及合适标记的条件是必要的。

液泡动态研究的主要内容在于研究液泡膜的动态, 因此在研究中更注重的是液泡膜的标记。Molecular Probes 公司开发的 FM4-64 是目前最常用的膜标记试剂。FM4-64 已经成功地标记多种植物组织的液泡膜。但是, 研究发现, 利用 FM4-64 保卫细胞液泡膜时, 即使标记时间达到 4 h, 保卫细胞内液泡膜的荧光强度也比质膜的亮度低的多, 而且细胞质中的其他结构也被标记^[15]。此外, 长达 4~6 h 浸泡在染色溶液中, 对保卫细胞的活力也会造成很大的影响, 必然影响到液泡膜的动态, 也就失去了在研究液泡膜动态方面的应用价值。因此 FM4-64 可能不适于标记保卫细胞的液泡膜。相比之下, FDA 能在短时间内标记到保卫细胞的细胞中, 而且能够显示液泡的边界轮廓^[10]。对于粗略研究液泡来讲, FDA 染色不失为一种标记液泡的简便方法。我们用 FDA 标记蚕豆保卫细胞, 可以清楚地观察到液泡的边界, 对研究保卫细胞液泡的动态过程, 特别是液泡膜的动态有一定的帮助^[2]。自从被证明可以用于植物细胞标记以来, GFP 标记就成为活体标记细胞结构首选的方法。通过转染 GFP 基因的方法来标记植物细胞结构已经是很成熟的方法^[11,16]。GFP 标记液泡有两种策略, 一是利用特异在液泡膜上表达的基因和 GFP 基因序列克隆在一起^[17], 用于标记液泡膜。另一种方法是把特异在液泡腔中积累的蛋白质的基因序列和 GFP 基因序列克隆在一起^[18], 用于标记液泡腔。前一种策略可以用于液泡膜的研究。AtKCO1 是定位在保卫细胞液泡膜的蛋白质, 我们转染 35S-GFP-KCO1 的烟草保卫细胞的荧光也证实了这一点, 对我们进一步研究保卫细胞液泡膜动态有很大帮助。

感谢导师王学臣教授的指导。感谢 Katrin Czempinski 教授 (Potsdam University, Germany) 提供 35S-GFP-KCO1 质粒。

参考文献(References)

- [1] 廖祥儒等。细胞生物学杂志, 2002, 24: 95
- [2] Gao XQ et al. Plant Physiol, 2005, 139: 1207
- [3] Zoccarato F et al. J Neurochem, 1999, 72: 625
- [4] Zucker R et al. J Histochem Cytochem, 2000, 48: 781
- [5] Suhita D et al. Plant Physiol, 2004, 134: 1536
- [6] Swanson S et al. Plant Cell, 1998, 10: 685
- [7] 李艳霞等。中国农业大学学报, 2005, 10: 10

- [8] Swanson SJ *et al.* *Plant Cell*, 1996, **8**: 2211
 [9] Fricker M *et al.* In: Hawes C *et al.* (eds.) *Plant Cell Biology*, New York: Oxford University Press, 2001, 35
 [10] Mathur J *et al.* *Plant Cell*, 2003, **15**: 1632
 [11] Brandizzi F *et al.* *J Microsc*, 2004, **214**:138
 [12] Czempinski K *et al.* *Plant J*, 2002, **29**: 809
 [13] Newell J *et al.* *J Exp Bot*, 1998, **49**: 817
 [14] Verbelen JP *et al.* *Plant Cell Reports*, 1998, **17**: 917
 [15] Meckel T *et al.* *Plant J*, 2004, **39**: 182
 [16] Dixit R *et al.* *Plant J*, 2006, **45**: 599
 [17] Hicks G *et al.* *Plant Physiol*, 2004, **134**: 1227
 [18] Di Sansebastiano GP *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **126**: 78

Methods for Vital Fluorescent Labeling of Guard Cells Vacuole

Xin-Qi Gao*, Qiu-Ping Ren¹, Zhuan-Bin Wang²

(State Key Lab of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

¹Agricultural College, Liaocheng University, Liaocheng 252029, China;

²College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract Vital labeling of vacuole is required for the study of vacuolar dynamics. Several methods for vacuole labeling of guard cells *in vivo* were introduced in this paper by using of acridine orange, LysoTracker Red DND-99, BCECF-AM, fluorescein diacetate and GFP fusion protein. We found that the procedures of vacuolar labeling by acridine orange and fluorescein diacetate are simple and the results are better. In addition, GFP fusion protein might be the best strategy for vital vacuolar labeling in the future.

Keywords guard cell; vacuole; vital labeling

Received: December 7, 2007

Accepted: February 4, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30770193)

*Corresponding author. Tel: 86-538-8246020, E-mail: gaoxq@sdau.edu.cn

The Anatomical Record 杂志征稿简则

——欢迎中国学者以英文或中文投稿

美国 The Anatomical Record (AR) 杂志系月刊, 是具有百年历史的老牌生物科学杂志, 2006 年的影响因子(IF)为 2。AR 杂志不收版面费(包括不收彩页印刷费), 稿件采用率为 30%~45%, 从作者投稿至收到编辑部录用或退稿决定的平均时间为 27 天。近年来, AR 杂志关注中国学者的来稿, 欢迎来自中国的高水平论文。为此, AR 杂志主编、犹他大学教授 Kurt H. Albertine 博士专程访华, 聘请浙江大学医学院李继承教授为 AR 杂志副主编, 负责中国区稿件征稿、组稿、审稿、指定来稿评审人和定稿录用等。

AR 杂志优先发表细胞和分子生物学研究的内容, 尤其欢迎: (1)细胞和分子生物学在形态学和功能方面的新发现; (2)由于基因缺损、活化、过度表达等对于细胞、组织和器官结构造成的形态学的新发现和功能改变; (3)通过影像模式作出的新发现、新进展等。

来稿的具体要求, 请参阅 AR 杂志的网页: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/grouphome/ForAuthors.html>。

来稿均以网上投稿的方式提交。请首先在以下网页免费创建作者的个人帐号: <http://mc.manuscriptcentral.com/ar-wiley>。

鉴于部分中国作者英语写作上的困难, 从而未能及时将自己的科研成果发表于国际学术杂志, AR 杂志副主编办公室决定, 组织精通中英双语的留美专家教授, 帮助英语写作困难的作者将论文整理并翻译成适合发表的英文稿, 推荐给 AR 杂志发表。

The Anatomical Record 杂志中国区副主编办公室地址: 浙江大学医学院 56 号信箱, 杭州 310058; 电话: 0571-88208153, 传真: 0571-88208094, e-mail: anatomicalrecord@zju.edu.cn。