

## 植物激素的免疫细胞化学定位

杨军\* 赵洁 杨弘远

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室 武汉 430072)

植物激素是植物体内天然存在的一系列小分子有机化合物,能够影响植物生长发育的各个方面。近一个世纪的研究已经比较详细地描述了它们不同的生物学效应,大量的分析化学结果也阐明了这些生物活性分子的化学本质,但是我们仍不清楚它们的作用机理。生长素类(Auxins)、细胞分裂素类(Cytokinins,CTKs)、乙烯(Ethylene,ETH)、赤霉素类(Gibberellins,GAs)和脱落酸(Absciscic acid,ABA)是五大类经典的植物激素,油菜素甾体类(Brassinosteroids,BRs)、茉莉酸(Jasmonic acid,JA)和水杨酸(Salicylic acid,SA)最近也被接纳为三类新的植物激素。同位素标记等灵敏分析方法的应用为这些化合物的内源水平及其代谢相关的生物合成途径研究提供了大量的信息。分子生物学和遗传学的介入,例如诱导突变和转基因技术,从根本上推动了植物激素的研究。通过多种方法,已经发现了某些激素作用机理的部分组成要素。如,ETH和ABA信号转导的途径已基本被揭示<sup>[1]</sup>。

植物体的形成以及生命活动的循环都需要细胞分裂、伸长和分化的严格控制。启动任何一个信号转导过程的首要前提就是信号的真实存在,一个被广泛接受的主要机制就是控制这些过程的激素分布。对激素的定量分析已经揭示了植物的生长发育和生理过程与激素水平的变化存在相关性,但对于它们在植物器官和组织中的分布情况的了解却仍然很少。研究激素在特定的细胞和组织内的作用需要能精确描述其分布的技术。由Coons等<sup>[2]</sup>开创的利用免疫球蛋白高特异性来检测组织切片中抗原决定簇的免疫细胞化学技术为植物激素的定位研究提供了有效手段。

为了定位组织中的抗原,我们需要特异的抗体、能完整保留抗原决定簇的固定程序以及能显示结合抗体的标记物。本文主要阐述Auxin、ABA、GAs和CTKs的免疫定位,但并不打算详细列举不同的免疫细胞化学定位程序,因为这可以在其他文献中查到。我们的目标是勾勒出对于植物激素研究的特异

方法,以及免疫学技术在激素生理研究中的应用。

### 一、植物激素抗原的设计

植物激素是一些小分子化合物,缺乏免疫原性,被称为半抗原,需要与载体蛋白偶联后才能诱导宿主动物对它们产生良好的免疫响应。迄今使用过的载体蛋白有牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)与血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)等。BSA是其中最常用的,具有大量的反应基团,能在水中或某些有机溶剂中充分溶解。而KLH是一种价格昂贵的免疫原性很强的优质载体蛋白,但是水溶性差,难免影响其免疫原性;另外一个缺点是其溶液常较浑浊,难以根据280nm吸光度计算其浓度。目前有的公司已推出了多种兼具高免疫原性及良好水溶性的KLH新产品。

李宗霆和周燮<sup>[3]</sup>认为,设计植物激素免疫原时应注意以下几点:首先,抗原的构像是决定所产生的免疫球蛋白特异性的主要因素,因此应根据检测的需要选用合适的半抗原免疫决定簇,使偶联部位尽可能远离这个决定簇。其次,在合成免疫原时,应防止植物激素分子重要基团的损害,并力求在植物激素与蛋白质分子之间插入一个长度适宜的“桥”,以增强半抗原决定簇在植物激素抗原分子中的暴露程度。此外,产生抗体的可能性还与偶联载体蛋白的半抗原数目直接相关,一般以每1 mol BSA结合5-15 mol植物激素为佳。目前,一致认为抗植物激素抗体的专一性主要取决于半抗原-蛋白质的偶联途径,而与供试动物的种类和个体差异的关系不大。为了制备得到预期性状的抗体,必须重视设计和合成特定的免疫原。

### 二、植物激素抗体的制备

为了获得吲哚乙酸(Indole-acetic acid, IAA)的抗血清,设计了3种抗原。IAA可以通过吡咯部分

\*联系人

的N原子与BSA偶联<sup>[4]</sup>,或者通过乙酸侧链羧基端的C<sub>1</sub>与BSA偶联<sup>[5-7]</sup>,还可以通过苯环的C<sub>5</sub>与BSA偶联<sup>[8]</sup>。C<sub>1</sub>-IAA的单克隆与多克隆抗体被证实对IAA甲酯的亲合力明显强于游离IAA<sup>[6,9]</sup>,它非常适合定量分析但不是理想的免疫细胞化学的抗体。通过比较实验, Marcussen等<sup>[8]</sup>证实C<sub>5</sub>-BSA多克隆抗体的特异性要强于N<sub>1</sub>-BSA的抗血清。基于以上结果,亲和纯化的IAA-C<sub>5</sub>抗体是最适合做免疫细胞化学的抗体。

GAs都具有四个环的赤霉素烷基本结构,其种类繁多,到目前已超过120多种。为了提高抗体的专一性,使它能够在众多的GAs中仅仅识别其中的一种或几种,曾从以下几种偶联途径进行过研究:(1)以GA的C<sub>7</sub>-COOH作为偶联部位,但只有抗GA<sub>9</sub>的抗体才显示出高度的专一性。Atzorn和Weiler<sup>[10]</sup>以GA<sub>9</sub>-C<sub>7</sub>-BSA为免疫原,获得了专一性极好的抗体,对其他GAs都几乎不识别,其原因可能是GA<sub>9</sub>分子的高度非羟基化。(2)以GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub>或GA<sub>4</sub>的C<sub>3</sub>β-OH作为偶联部位。Knox等<sup>[11]</sup>获得了抗GA<sub>1</sub>与GA<sub>4</sub>的两种单克隆抗体,郑志富等<sup>[12]</sup>获得了抗GA<sub>4/7</sub>的单克隆抗体。(3)利用D环外的亚甲基作为偶联部位。

Weiler<sup>[13]</sup>设计了两种能产生抗(+)-ABA抗血清的抗原。第一种抗原是(+)-ABA通过羧基部分与BSA相偶联。第二种抗原是(+)-ABA通过C<sub>4</sub>原子与BSA相偶联。把这两种抗原注射到家兔体内后,一方面产生了一种特异识别ABA及其结合物的抗血清,另一方面产生了一种特异识别非结合态ABA的抗血清。

常用的用于产生不同CTKs抗体的抗原是细胞分裂素核苷与蛋白的复合物。载体蛋白与核糖部分偶联,则使N<sub>6</sub>-取代基完全暴露,这有利于产生高特异性的抗体。获得这种抗原的方法之一就是用过碘酸来氧化糖基,使其易于与载体蛋白的氨基起反应,随后此反应可以被氢硼化物的还原作用所稳定。利用这样的抗原,已经获得了一系列的抗CTKs的高特异性兔多克隆抗体和鸡蛋卵黄的单克隆抗体<sup>[13-15]</sup>。不同核苷结合物的抗体特异地识别不同的侧链,而且它们对侧链的空间构型也是具有选择性的。然而,由于核糖基的存在使得与抗体的结合活性没有选择性。为了获得某个单一抗CTKs的抗体,Strnad及其合作者们<sup>[15]</sup>设计了一种N<sub>6</sub>-亚基仍然暴露在外面的替代型细胞分裂素核苷复合物以

及细胞分裂素复合物。半琥珀酰衍生物、核糖缩醛和羧基乙基细胞分裂素被证明是利用过碘酸偶联核苷最有价值的替代物,但是这些抗原不能诱导产生特异识别单一的抗CTKs和抗细胞分裂素核苷的抗体。此外,利用羧基乙基衍生物作为半抗原, Brandon及其合作者获得了选择性结合N<sub>6</sub>-O-葡萄糖亚基的单克隆抗体<sup>[16]</sup>。

与产生单克隆抗体相比,生产多克隆的抗血清需要较少的时间和劳动力投入。然而,要用于免疫细胞化学则需要经过严格的免疫亲和层析后才能使用<sup>[17]</sup>。

### 三、植物激素的原位固定

对于植物激素这类小分子的免疫定位,除了在制片过程中力求保持植物结构的原状外,还应使待检测的小分子保持免疫原性(immunogenicity),不发生流失或漂移,力求“原位原量固定”。它们在植物细胞基质中的固定可以通过适当的化学或物理方法获得。

理论上讲,对材料进行及时的冰冻将能最大限度地固定这些化合物在它们生活状态时的位置。事实上,快速的超微冰冻固定优于化学固定,因为与常规的化学固定相比,它能够较快地固定样品。而且,在包埋和免疫定位过程中必须防止扩散。在脱水过程中的扩散问题已经通过采用诸如冰冻替代和分子蒸馏等低温流程获得了解决。脱水后的低温包埋也是最合适的。为了免疫定位低分子量的化合物,如植物激素等,结合高压冰冻固定和分子蒸馏是非常有效的。目前,高压冰冻固定技术已经可以固定0.6mm厚的样品而没有损伤性的冰晶产生,并且已经成功地应用于植物样品中的原生质体<sup>[18]</sup>、细胞悬浮液<sup>[19]</sup>、腺毛柄细胞和幼苗叶片细胞<sup>[20]</sup>的冰冻固定。分子蒸馏可以除去无定形态的水分而免除了玻璃化和再脱水的麻烦,因此它在超微定位中不会使可容性的分子本身改变、重新分布和流失。最初在烟草根尖的CTKs和环核苷酸免疫定位结果显示,高压冰冻固定结合分子蒸馏的方法可以很好地保存超微结构和抗原性。然而,对细胞的保存依赖于组织特异性,例如在气生的植物组织中就不能获得令人满意的结果。把这些技术应用于其他的实验模式如细胞悬浮培养物和原生质体可能具有巨大的潜力。

利用化学方法把植物激素固定到内部蛋白的程序已经广为人知。EDC反应后,ABA和IAA等可

以通过偶联剂将它们固定结合在周围的蛋白质上。经过戊二醛反应后, IAA 同样也能通过吡啶环上的氨基部分与蛋白相连。然而, 植物中还没见到有关 ABA 和 IAA 通过苯环被固定的报道。这种固定方法将使 ABA 的异戊二烯链或 IAA 的乙酸侧链和吡啶环易于被抗体所接近。

CTKs 在醛的作用下, 在植物体内与体外均可与蛋白相连。此外, 还可以通过与制备其抗原一样的方法, 利用细胞分裂素核苷的间位氧化后再与内部蛋白相连。因此, 对这两种化学固定方法的选择有利于利用同样的 N<sub>6</sub>-取代基的特异抗体来特异地检测是 CTKs 还是细胞分裂素核苷<sup>[14]</sup>。感兴趣的抗原决定簇被固定后, 多数研究者还进行弱的醛固定以保存切片中的细胞结构。

#### 四、植物激素免疫定位和对照

固定完成后就可以在组织切片、原生质体或单细胞中进行免疫定位了。为了让抗体易于进入单细胞, 在固定完成后需要用酶部分或全部除掉细胞壁, 切片也要用去污剂处理。材料可以来自于包埋或冰冻后切片, 也可利用徒手或震荡切片获得。基本上, 除特殊的固定程序外, 植物激素的免疫定位与普通蛋白的免疫定位没有什么区别。它也必须进行阻断处理以中和残留的醛基部分和饱和非特异性的结合位点。在用一抗温育后, 需要进一步的清洗以除去未结合的过量抗体。一抗的结合位点可以通过偶联了荧光物质、电子(或光)不透明标记物或酶的二抗来显示。但荧光标记的二抗仅适合于在光镜水平下观察抗原在组织中的分布, 不仅容易受到切片中一些自发荧光的影响, 而且切片也不能长期保存, 使它的应用受到一定的限制。利用胶体金作为二抗的超微免疫细胞化学定位可以利用电子显微镜来显示抗原的分布。目前所报道的绝大多数植物激素免疫细胞化学定位的结果都是利用胶体金法来完成的。

免疫定位可以在树脂包埋前进行, 也可在树脂包埋的材料切片后进行。胶体金免疫电镜定位必须兼顾超微结构保存和抗原活性保存两个方面。尽管包埋后免疫定位更好地保存了超微结构, 但是由于包埋剂的影响, 抗原性总会降低。目前国际上广泛接受的可用于免疫电镜定位的是 LR White 和 Lowicryl K<sub>4</sub>M 等水溶性低温包埋剂。对疏水树脂中的材料进行蚀刻可以提高抗原性。包埋前免疫反应的优点就是可以允许利用光镜检测切片中的免疫反应, 然后可以根据需要进一步用电子显微镜来检

测。如果对相对较大的植物材料进行免疫定位, 震荡切片机的切片就能满足需要<sup>[17]</sup>。

植物激素的免疫细胞化学定位染色程序中存在着两个问题, 即非特异性染色和交叉反应。造成非特异性吸附的主要原因有以下 3 点: (1) 一抗或二抗在切片上的非特异性吸附。这可以通过在缓冲液中添加蛋白质或正常血清的方法加以改善, 用高度稀释的抗体溶液温育也是一种有效的方法。此外, 充分地洗涤也是必要的。(2) 内源性显色物质的存在, 如内源荧光物质和内源酶等, 可以在染色前通过适当的切片处理加以消除。(3) 切片中存在与标记物特异性结合的物质。所以抗体必须经过高度纯化, 具有很强的特异性。

Pool 等<sup>[21]</sup>对产生可靠结果的免疫定位程序提出了以下几个标准: 所采用的方法应该是标准的免疫细胞化学定位程序; 滴定一抗, 直到不能再检测到免疫反应应该是可能的; 免疫反应可以被类似化合物抑制, 这种方法应该可以用改变抗原数目的生物学对照来检测; 材料必须用非免疫学的方法来评估抗原水平。此外, 必须进一步检测相关化合物交叉反应。

为了提高定位结果的可比性, 降低背景值, 增加阴阳性之间的差异, 在实验中应设以下对照: (1) 用同种的最好是同一个动物免疫前的正常血清代替植物激素的抗血清。(2) 用过量的植物激素先与抗血清反应, 使抗体饱和, 不能再与切片中的该种植物激素分子结合。(3) 用过量的未标记的“二抗”先封闭“一抗”。

大多数作者都认真地考虑了以上的要求, 有的甚至有所发展。如在醛固定前用甲醇处理组织材料后, Chriqui 等<sup>[22]</sup>没有在烟草切片中检测到抗 CTKs 抗体的免疫反应。这个结果清晰地表明只有可溶于甲醇的化合物才能被固定并且可以被 CTKs 的抗体所识别。同样, 在醛固定前省略细胞分裂素核苷的偶联步骤也会明显地减弱免疫染色<sup>[14]</sup>。此外, 一些研究表明, 植物提取物的免疫反应活性仅局限于那些与抗原具有相同保留时间的层析组分<sup>[6, 15]</sup>。虽然设计了足够的对照, 正如所有的免疫反应那样, 在理论上仍然存在反应位点是一些高度集中的未知化合物的可能, 从而使分析结果出现难以避免的偏差。

#### 五、免疫细胞化学定位在生理学研究中的应用

许多研究表明, 内源植物激素在同一器官不同

组织之间、甚至同一组织各个细胞之间的分布往往是十分悬殊的。这些差异的确认,仅凭单纯的定量测定技术是不能完成的,需要同时取得定位的证据才行。对于细胞内各种植物激素区域化分布的认识则更有赖于免疫定位技术的发展。可是,由于植物细胞存在结构致密的细胞壁,比动物细胞更难以被抗体分子穿透。加上植物激素是小分子,在组织的固定、脱水与包埋过程中,往往容易流失。另外还存在内源激素含量低微以及非特异结合值有时偏高等困难,导致植物激素免疫定位的进展十分缓慢,仅极少数的文章涉及到这方面的研究。大多数研究者采用胶体金作为标记物,并倾向于电镜观察,一般着重于方法学的探索和生理学的研究。

### 1. IAA 的免疫定位

IAA 是研究最广泛和深入的一种植物激素,但 IAA 的免疫定位仍处于早期阶段。直到 1990 年,Ohmiya 等<sup>[23]</sup>才首次发表一例 IAA 的免疫胶体金定位实验。遗憾的是该例很可能是一种假像,因为他们利用 EDC 将 IAA 的羧基侧链固定在细胞内的蛋白质上,却用抗环连接的 IAA-N-BSA 抗体进行定位,因而结果的可靠性很值得怀疑。抗 IAA-N-BSA 抗体对自由的 IAA 羧基侧链是特异的,如果将其封闭必将导致 IAA 对抗 IAA-N-BSA 抗体免疫反应性的丧失。

陈以峰等<sup>[24]</sup>观察到授粉 24 小时后,烟草花柱中段薄壁组织细胞内的 IAA 显著增加,主要分布在淀粉体和液泡中;花粉管壁上也观察到 IAA 的分布。陈以峰等<sup>[25]</sup>还发现烟草卵细胞内的 IAA 在受精前后几乎没有变化。

### 2. ABA 的免疫定位

自 Sotta 等<sup>[26]</sup>开始 ABA 的免疫定位研究以来,免疫细胞化学已经成为研究与干旱胁迫相关的 ABA 生理效应的一个有用的工具。他们观察到植株内有一个 ABA 梯度。在较老的芽中,ABA 主要集中在茎类的静止分生细胞内,中柱细胞以及叶绿体中也较多,但形成层的薄壁细胞内则无。在水分胁迫条件下,上述存在 ABA 的部位染色会增加,表明 ABA 水平的增加。Sossountzov 等<sup>[27]</sup>发现 ABA 主要集中在两个部位:一是和筛管及导管相连的薄壁细胞内;二是侧芽顶端和原形成层细胞的细胞质以及核内。他们的观察结果还证实了 ABA 在细胞质内合成,在细胞成熟后再转移到质体内的假说。对植物进行水分胁迫会明显地增强 ABA 的免疫反应,这与豌豆和熏衣草中内源 ABA 含量的增加一

致<sup>[28,29]</sup>。在可利用水分极少的情况下,烟草和熏衣草中的 ABA 在质外体空间积累。但在质外体空间的 ABA 增加的同时未检测到叶绿体中 ABA 含量的下降,这与早期推测的水分胁迫下 ABA 的释放来自于叶绿体的模式不一致。该结果暗示了来自根部的 ABA 生物合成和输出的增加<sup>[29]</sup>。

贾文锁等<sup>[30]</sup>用 ABA 的胶体金免疫电镜技术研究了水分胁迫下蚕豆气孔关闭与 ABA 的区域化分布的关系,ABA 主要分布在叶绿体中,细胞质和细胞核中也有少量,但液泡和细胞壁中无。王学臣和贾文锁<sup>[31]</sup>观察到水分胁迫可导致蚕豆表皮细胞质外体 ABA 含量的增加;而保卫细胞在水分胁迫前就已经含有大量的 ABA,它主要分布在叶绿体和细胞核中,细胞的腹壁及相邻的外壁和内壁也有大量的 ABA 存在,但背壁 ABA 的量很少;气孔完全开放时,背壁的 ABA 含量更少;当水分胁迫导致气孔关闭时,保卫细胞背壁 ABA 含量大增,说明气孔运动与保卫细胞中 ABA 的区隔化分布与再分配密切相关。

### 3. GAs 的免疫定位

Yamaguchi 等<sup>[32]</sup>在  $-78^{\circ}\text{C}$  将水稻花药快速冷冻,用 2%  $\text{OsO}_4$  的丙酮溶液置换水分并使细胞内的 GAs 固定,再用抗  $\text{GA}_1$  和抗  $\text{GA}_4$  等的单克隆抗体和胶体金标记的二抗对花药的超薄切片进行电镜观察,发现表皮细胞的核、线粒体和角质层中均有 GAs 存在。

陈以峰等<sup>[24]</sup>观察到烟草雌蕊的花粉管生长途径中,花柱穿过的引导组织内  $\text{GA}_{4,7}$  显著增加,主要分布于淀粉体和胞间基质。正在发育的烟草原胚的大部分细胞器内广泛分布  $\text{GA}_{4,7}$ ,在 6-12 胞原胚中,由胚到胚柄存在  $\text{GA}_{4,7}$  由高到低的梯度分布,暗示胚与胚柄之间出现了 GAs 的跨壁转运<sup>[33]</sup>。

### 4. CTKs 的免疫定位

CTKs 的免疫细胞化学研究主要被用于说明一些与形态发生、生理和细胞分裂有关的问题。Zavala 等<sup>[34]</sup>对二氢玉米素核苷的组织化学定位结果发现,在根尖静止中心周围的分生细胞内有特异的二氢玉米素核苷的染色,而静止中心细胞内则无,从而否定了根尖静止中心是 CTKs 的主要合成部位的假说。对野生型和无侧枝的番茄突变体中的玉米素和异戊烯基类细胞分裂素的免疫定位结果表明,番茄侧芽的形成依赖于细胞分裂素的含量。在番茄植株上沿茎及根存在着一个向基的逐渐减弱的梯度。免疫反应主要集中在茎的顶端分生组织和幼嫩

的叶片中,野生型比突变体中要强得多,野生型的幼嫩腋芽中还表现出一定的免疫染色<sup>[14]</sup>。

在一些诱导模式实验系统中,花诱导时在茎的顶端分生组织中观察到了细胞分裂素的增加<sup>[35]</sup>。推测细胞分裂素的流入是与花诱导相关的生理信号之一,或者说明细胞分裂素参与了花的形成。为了研究一种日中性烟草从营养生长向生殖生长转变的过程中茎顶端分生组织细胞分裂素类的变化,利用免疫定位和串联质谱仪检测了异戊二烯类细胞分裂素水平的动态变化。两种方法均发现与无器官发生的过渡期相比,叶和花诱导时期的茎顶端分生组织含有较高含量的细胞分裂素。而且,免疫定位分析表明,与异戊烯基腺嘌呤和二氢玉米素相比,玉米素多均一地集中在核区,提示玉米素在核的分裂过程中具有特殊的作用<sup>[17]</sup>。

Ivanova等<sup>[36]</sup>利用免疫细胞化学的方法研究了体细胞胚中细胞增殖与CTKs之间的关系。细胞核中显示出很强的玉米素信号,异戊烯基腺嘌呤也显示出与植物有丝分裂蛋白类似物和BM28(一种与人MCM族细胞增殖特异蛋白的核基质蛋白类似的蛋白)共同存在于核中。在这个实验模式系统中,第一次揭示了核中的CTKs与细胞分裂之间的密切联系。

Chriqui等<sup>[22]</sup>采用细胞分裂素的免疫细胞化学定位技术回答了有关体外培养木本植物再生的一些问题。利用这一技术,他们发现了分化时木本植物比草本植物的细胞分裂素水平下降迅速得多。此外,他们还提供了额外的证据表明细胞分裂素对木本植物茎的诱导起促进作用。

烟草雌蕊的花粉管生长途径中,花柱引导组织、珠孔、丝状器及助细胞内存在较多的顺式玉米素(t-Zeatin, t-Z),花粉管穿过引导组织或受精后,这些部位的t-Z显著减少<sup>[24]</sup>。陈以峰等<sup>[25]</sup>还观察到受精前烟草卵细胞内有大量的t-Z,主要位于细胞核、内质网与线粒体上;与卵细胞相邻的助细胞合点端及中央细胞珠孔端亦有较多的t-Z。受精后,合子与宿存助细胞t-Z显著减少,正在加厚的合子细胞壁中有t-Z的分布。

#### 5. 其他植物激素的免疫定位

何宇炯等<sup>[37]</sup>利用胶体金免疫电镜定位技术研究了绿豆上胚轴细胞中BR的分布,他们发现叶绿体、核仁和液泡内有大量的金颗粒标记,细胞膜和淀粉粒中也有,但细胞壁中无。Taylor等<sup>[38]</sup>观察到随着花粉发育过程中造粉体的成熟,BR在淀粉粒中

的分布依次增加,支持了淀粉粒是BR贮藏器官的推论;而且在花粉粒吸水后,BR能够迅速从淀粉粒中转运出来供花粉萌发所需。

## 六、结 语

为了精确地定位植物激素,两个主要的问题需要解决。第一个问题就是减少扩散,而扩散又是这些低分子化合物的共同特点。为了解决这个问题,可以利用化学的或物理的方法来固定细胞中的这些化合物,在几分钟内就能固定的化学方法虽然没有冰冻法好,但是它不需要精密和昂贵的实验仪器。而且,化学固定是基于与植物激素特定基因的反应,它能够特异地连接某一类型的分子而排除那些竞争抗体的类似物。例如,在细胞分裂素的免疫细胞化学研究中,我们可以分别固定CTKs或CTKs的核苷<sup>[14]</sup>。固定方法的选择应该依所要解决的问题而定。如果我们只关心植物激素在不同组织的分布,化学固定也许要好一些;如果我们要探查化合物在细胞内的定位以及要求细胞结构的完整性,冰冻固定则更可取。

第二个问题所应注意的就是检验的特异性,这也是所有免疫细胞化学定位所需考虑的问题。这个问题主要决定于抗体的特异性。正如前文定位程序中所提到的一样,需要进行一些严格的对照实验。

至今,对于植物激素的免疫定位技术的探索虽已经历了20多年的历史,但仍未见直接应用于生理生化研究取得重要发现的论文。究其原因,一是难以准确估计在制片过程中待测植物激素分子的流失率。这种流失率不仅与固定技术有关,还取决于植物组织与细胞中各自的蛋白质含量。但可望用偶联剂的蒸汽固定法、光亲和标记固定法结合模拟实验法减少或测定流失率。第二个限制因素是免疫学试剂(一抗或标记二抗)难以透入植物细胞以及胞内干扰物质较多。今后有待于更多的探索与创新,才能使这项技术实用化。

未来植物激素的免疫定位的发展将极大地获益于显微镜技术如共聚焦激光扫描显微镜和图像分析软件等的发展<sup>[14,17,29]</sup>。此外,利用光亲和标记的<sup>[3H]</sup>,5-N<sub>3</sub>IAA,Fischer等<sup>[39]</sup>观察到辐射对称胚向两侧对称胚的转变与IAA的重新分布有关。Senger等<sup>[40]</sup>把抗ABA抗体的scFv转入烟草的结果表明ABA对于花后10天左右的球形胚的形成有很重要的作用。

利用免疫染色来完全定量不同组织的激素水平

仍然存在极大的困难。我们必须考虑到细胞器和细胞体积的差别、抗体渗透性的差别、以及固定的有效率等。不过,在同样实验系统的比较研究中,它还是可以提供相对定量的信息。

植物激素的免疫定位将能加深我们对植物激素作用的理解,它的普及和应用必将给植物激素作用机理的研究带来突破性的进展。目前,它是惟一可以用来研究植物激素原位分布的研究方法,而且它对定量分析的结果提供了有力的补充。应该注意的是,这种方法所能提供的仅仅是这些化合物时空分布的信息,其本身并不能得出作用位点和源库关系的结论。在突变体或转基因研究中采用这种方法,可以勾划出更加完整的植物激素作用机理的模型,以及鉴别特定的靶细胞或细胞器。而且,结合免疫细胞化学技术和利用报告基因或融合蛋白的研究手段,将是植物激素信号转导机制研究的强有力工具。

### 摘 要

本文介绍了植物激素免疫细胞化学定位研究中常用抗原与抗体的制备、激素小分子在植物细胞内的原位固定及其在激素生理研究中的应用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Iten. M. et al. , 1999, *J. Recept Signal Transduct Res.* , 19:41 - 58.
- [ 2 ] Coons. A. H. et al. , 1942, *J. Immunol.* , 45:159 - 170.
- [ 3 ] 李宗霆、周燮, 1996, 植物激素及其免疫检测技术, 江苏科学技术出版社, 250 - 298.
- [ 4 ] Pastor, A. et al. , 1995, *Plant Growth Regul.* , 16: 287 - 292.
- [ 5 ] Fuchs, S. and Fuchs, Y. , 1969, *Biochem. Biophys. Acta* , 192:528 - 530.
- [ 6 ] Weiler. E. W. , 1981, *Planta* , 153:319 - 325.
- [ 7 ] 张能刚等, 1990, 南京农业大学学报, 13:116 - 119.
- [ 8 ] Marcussen, J. et al. , 1989, *Plant Physiol.* , 89: 1071 - 1078.
- [ 9 ] Mertens. R. et al. , 1985, *Planta* , 100:389 - 393.
- [ 10 ] Atzorn, R. and Weiler, E. W. , 1983, *Planta* , 159:1 - 6.
- [ 11 ] Knox, J. P. et al. , 1987, *Planta* , 170:86 - 91.
- [ 12 ] 郑志富等, 1995, 生物工程学报, 11:310 - 314.
- [ 13 ] Weiler, E. W. , 1980, *Planta* , 148:262 - 272.
- [ 14 ] Sossountzov, L. , et al. , 1988, *Planta* , 175:291 - 304.
- [ 15 ] Strnad, M. , et al. , 1992b In: Kaminek, M. , et al. , (eds) *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. The Hague:SPB Academic Publishing, 437 - 447.
- [ 16 ] Brandon, D. L. , et al. , 1992, In: Kaminek, M. , et al. , (eds) *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. The Hague:SPB Academic Publishing, 447 - 453.
- [ 17 ] Dewitte, W. , et al. , 1999, *Plant Physiol.* , 119: 111 - 121.
- [ 18 ] Galway, M. E. , et al. , 1993, *J. Cell Sci.* , 106: 847 - 858.
- [ 19 ] Zhang, G. F. , et al. , 1993, *J. Cell Sci.* , 104:819 - 831.
- [ 20 ] Kaneko, Y. and Walther, P. , 1995, *J. Electron Microscopy* , 44:104 - 109.
- [ 21 ] Pool. C. W. , et al. , 1983, In: Cuello, A. C. , (ed) *Immunocytochemistry*. Chicester: Wiley. 1 - 46.
- [ 22 ] Chriqui, D. , et al. , 1999, In: Altman, A. , et al. , (eds) *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 33 - 37.
- [ 23 ] Ohmiya, A. , et al. , 1990, *Plant Cell Physiol.* , 31: 711 - 715.
- [ 24 ] 陈以峰等, 1999a, 武汉植物学研究, 17:297 - 302.
- [ 25 ] 陈以峰等, 1999b, 植物学报, 41:1145 - 1149.
- [ 26 ] Sotta, B. , et al. , 1985, *J. Histochem. Cytochem.* , 33: 201 - 208.
- [ 27 ] Sossountzov, L. , et al. , 1986, *Planta* , 168:471 - 481.
- [ 28 ] Welbaum, G. E. , et al. , 1997, *J. Exp. Bot.* , 48: 643 - 654.
- [ 29 ] Pastor, A. , et al. , 1999, *Physiol. Plant.* , 105:272 - 279.
- [ 30 ] 贾文锁等, 1994, 植物生理学报, 20:380 - 328.
- [ 31 ] 王学臣、贾文锁, 1995, 植物生理学报, 21:324 - 328.
- [ 32 ] Yamaguchi, I. and Weiler, E. W. , 1991 In: Takahashi, N. , et al. , (eds) *Gibberellins*. Springer-Verlag, 146 - 165.
- [ 33 ] 陈以峰等, 1998, 植物学报, 40:478 - 480.
- [ 34 ] Zavala, M. E. and Brandon. D. L. , 1983, *J. Cell Biol.* , 97:1235.
- [ 35 ] Berner. G. , et al. , 1993, *Plant Cell* , 5:1147 - 1155.
- [ 36 ] Ivanova, M. I. , 1994, *J. Exp. Bot.* , 45:1009 - 1017.
- [ 37 ] 何宇炯等, 1998, 植物生理学报, 24:24 - 30.
- [ 38 ] Taylor, P. E. , et al. , 1993, *Planta* , 189:91 - 100.
- [ 39 ] Fischer-Iglesias, C. , et al. , 2001, *Plant J.* , 26: 115 - 129.
- [ 40 ] Senger. S. , et al. , 2001, *Plant Cell Rep.* , 20:112 - 120

## 单核苷酸多态性(SNPs)原理及其在植物功能基因组学中的应用前景

刘健毅 潘建伟 朱睦元\*

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

顾青

(杭州商学院生物工程系 杭州 310035)

2001年11月诞生了人类基因组SNPs(Single Nucleotide Polymorphisms, 即单核苷酸多态性)图谱,这是第一张精确的SNPs图谱<sup>[1]</sup>。同时在植物基因组学研究中,各国科学家在拟南芥(*Arabidopsis*

*thaliana*)基因组测序完成后,也正积极绘制其

基金项目:国家自然科学基金(39770420, 30100115)和浙江省自然科学基金(300255)资助项目。

\* 通讯作者。