

② 加入 0.1% 或 1% 盐酸酸性甲醇进行浸泡, 置冰库过夜提取出花青素, 如要求所得结果正确, 应按此方法反复提取 2—3 次。

③ 将获得的提取液减压浓缩。用真空泵在 5 mmHg 以下减压的回复式蒸发器中在 15°C 以下进行浓缩, 将浓缩物中含有多量脂肪、盐份等杂质, 用图 4 所示方法可将其纯化。

④ 提取物用少量水溶解并用阳离子交换树脂 (Dawex) 吸附。经水、甲醇洗去杂质后, 用 0.1% 盐酸酸性甲醇洗出花青素。洗出液减压干燥后, 再用少量水溶解。聚酰胺柱吸附, 用水、甲醇洗脱杂质。最后用 0.1% 盐酸酸性甲醇将花青素洗出, 再次将洗出液减压干燥, 获得花青素粗制品。

⑤ 提取物用少量水溶解, 随后加入乙醚反复洗净到乙醚层不着色, 除去脂肪物质。取出水层减压干燥后加入冷甲醇, 从干固体中提取花青素。除去不溶于甲醇中的盐类残余物, 减压除去甲醇, 获得粗花青素。

⑥ 提取物用少量水溶解, 加入乙醚反复洗净到

乙醚层不着色。于水层中每次加入一滴 1% 醋酸铅水溶液, 直到不发生青色沉淀为止, 然后过滤沉淀物。沉淀物加入 0.1% 盐酸酸性甲醇, 过滤除去所产生的白色沉淀 (氯化铅), 将过滤液减压干燥, 获得粗花青素。

④、⑤、⑥ 工序可单独应用, 配合使用时则可提高制品的精度。

⑦ 将粗制品用滤纸、纤维素薄膜层析分离、纤维素色层分离 (Cellulose Chromatograph)、液相色谱分离、再结晶等方法, 单独或配合使用, 从而获得精制品。

⑧ 将提纯花青素用滤纸、纤维素薄膜层析法、核磁共振、气体色谱质谱联合法、显微分光镜、红外线、液相色谱等进行鉴定。由于花青素不稳定, 用分光光度计鉴定花青素常发生困难。为此, 通常多采用色层分离法鉴定。但是最近正在使用 FT-核磁共振、气体色谱质谱联合法来鉴定花青素。

(周荣仁译, 编辑部校)

大蒜根尖细胞微管的免疫荧光观察

张金忠 朱 激

(北京大学生物系)

1963 年, 先后在动物和高等植物细胞中发现微管结构。已经知道微管不仅具有支持功能, 而且在运动、运输和分泌等一系列细胞活动中发挥重要作用。在高等植物细胞中, 微管明显地参与形态建成^[1,2]。周质微管 (Cortical microtubules) 可能与细胞壁中纤维素微纤丝的排列与定向有关。早前期带 (Preprophase Bands) 预示胞质分裂时细胞板的位置。成膜体微管参与细胞板的形成等等。

70 年代中期, 免疫荧光技术在以动物组培细胞为材料的微管研究中获得很大成功^[3,4]。使用该方法研究微管不受其它细胞骨架成分的干扰, 在荧光显微镜下能对完整细胞内的微管

系统进行三维的观察。然而, 到目前为止, 还没有一个从高等植物中提取微管蛋白的成熟方法。1977 年, Franke 等人在用猪脑微管蛋白抗体研究高等植物胚乳微管时, 证明动植物微管蛋白有免疫交叉反应^[5]。近几年, Wick 等人^[6-8]成功地将这一技术用于具壁的高等植物细胞的微管研究上。植物细胞有相当厚的、坚固的细胞壁和大的液泡, 用免疫荧光技术研究微管更有它的优越性。

目前, 国内有关植物微管方面的研究工作还很少^[9], 用免疫荧光技术研究植物微管则未见报道。我们用组装-去组装超速离心方法提取猪脑微管蛋白, 制备兔抗微管蛋白血清,

并首次用免疫荧光方法观察了大蒜(*Allium sativum* L.)根尖细胞在细胞周期中四种主要的微管排列方式。

材料与 方法

1. 参照 Shelanski 等人的方法^[10], 经过两个循环的组装-去组装超速离心提取猪脑微管蛋白(图 1)。提取的样品在 37℃ 保温 30 分钟后, 经磷酸盐负染, 在电镜下看到成束的微管(图 2)。

2. 以上述猪脑微管蛋白制备的兔抗微管蛋白血清在双向免疫扩散实验中, 与 SDS-PAGE 纯化的猪脑微管蛋白亚基有沉淀反应。此抗血清在动物培养细胞上染出标准的细胞质微管网, 不显示其它细胞成分。

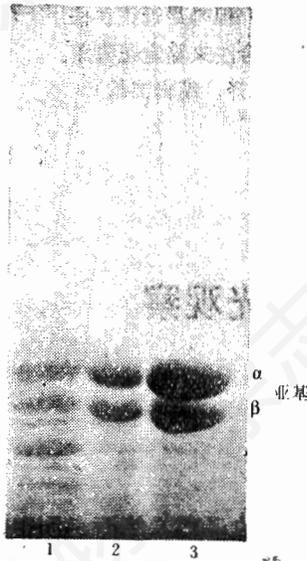


图 1 提取猪脑微管蛋白的 SDS-PAGE 图

(1) 高速上清液 (2) 第一循环上清液 (3) 第二循环上清液(微管蛋白)

电泳参照 Laemmli 的方法^[11], -3% 浓缩胶, 10% 分离胶。

3. 参照 Wick 等人的方法^[6]制备大蒜根尖细胞。做了下述改动: (1) 使用三种酶消化细胞壁(1% Cellulase, 0.5% Macerozyme 和 0.5% Rhozyme); (2) 在半导体致冷器上冰冻揭盖片; (3) 用硼氢化钠(N_2H_4)、冷甲醇和 Triton X-100 处理细胞。

4. 制备好的细胞进行标准的间接免疫荧光显微术和对照实验^[4]。二级抗体为羊抗兔 IgG 荧光(FITC)

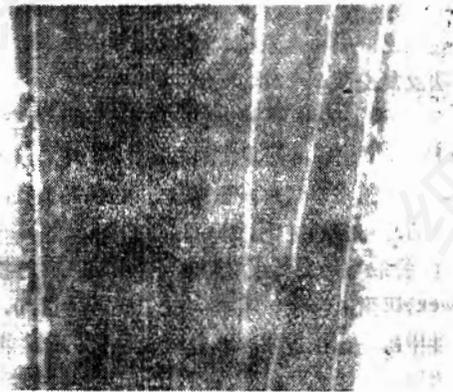


图 2 猪脑微管蛋白在体外聚合成微管的磷酸盐负染色电镜照片, $\times 30,000$
微管直径约 28 nm

诊断血清(卫生部北京生物制品所产品)。在 Olympus BH-RFL-W 荧光装置和相差装置下观察和照相。荧光系统是激发滤光片 B(IF—490), 双色镜 B(Dm 500 + 0 515)及阻挡滤光片 0 530 的组合。

结 果

对于大多数高等植物材料来说, 要想成功地应用免疫荧光技术首先要解决两个问题。第一, 要从多细胞的组织中分离出结构稳定的细胞。第二, 使大分子抗体进入细胞内部。为此, 我们参照前人的方法对大蒜根尖进行了下列处理: (1) 以甲醛作为固定剂(每次实验前用聚甲醛配制), 求得细胞结构和抗原性保存之间的平衡。(2) 用酶法分离细胞。控制酶解的时间, 使之既能破坏细胞壁的完整性和细胞间的联结, 又保持细胞的原有形状和内部结构。最后通过压片使细胞分散。(3) 用冷甲醇处理细胞, 增加细胞膜的通透性。经过上述步骤, 在一张片子上能得到大量分散得很好, 且处于不同细胞周期的结构完整的细胞。

在整个细胞周期中, 大蒜根尖细胞中主要有四种微管排列方式。经过对同一细胞在荧光和相差装置下的双重观察, 我们肯定了它们是细胞间期的周质微管、有丝分裂前期的早前期带、有丝分裂中期和后期的纺锤体和胞质分裂过程中的成膜体微管等。

一、细胞间期的细胞质周质微管

在大蒜根尖细胞中,间期微管主要分布在周缘细胞质中,它们沿着细胞的侧壁平行地排列在质膜下面。周质微管的缠绕方向一般与细胞长轴垂直,这在伸长的细胞中特别明显(图版I,图1)。在荧光显微镜下看到的纤丝是相邻微管集合在一起形成的微管束。未见到微管之间有明显的相互交叉的情况。在植物悬浮培养细胞的原生质体膜片上,与质膜紧密结合的微管呈杂乱分布^[12],与此完全不同。

二、早前期带及核被膜(Nuclear envelope) 荧光

在荧光显微镜下常常可以看到在有些细胞的中部有一圈很亮的带状结构,它们就是早前期带(图版,图2—5)。在相差显微镜下看到,这时细胞核中的染色质还没有可见的浓缩,细胞处于早前期。组成早前期带的微管在细胞上的缠绕方式与周质微管一样,但它们集中在细胞中部。早前期带发育早期,可以清楚地看出它们是由平行排列的微管组成的(图版,图2)。当早前期快要结束时,早前期带变得很窄,微管的密度很大,即使微管束也难以区别。这时在荧光显微镜下只能看到很亮的一圈,它们象腰带一样系在细胞的中部(图版,图3,4)。

在早前期还有一个与早前期带同时存在的荧光图案,即围绕细胞核的核被膜荧光区(图版,图3—5)。核被膜荧光多少呈弥散状,估计它们主要是由未聚合的微管蛋白组成的^[7]。在一些细胞中也可以看到核表面有丝状的聚合形式的微管存在(图版,图5)。核被膜微管在以往的电镜照片上很少注意到,值得进一步观察。

三、纺锤体微管

在一张含有大量分裂细胞的片子上,可以看到各种各样的纺锤体图象。早前期结束时,纺锤体极已在核表面形成(图版,图6)。当染色体排列到赤道板上时,从每个染色单体发出的着丝点纤丝(Kinetochores fibers)分别指向细

胞的两极(图版,图7)。随着染色体的分离,纺锤体荧光也逐渐移向两极,这时可以看到从一极伸向另一极的纺锤体极纤丝(Polar fibers)(图版,图8)。最后,随着细胞分裂进入后期和细胞核移向两极,纺锤体微管呈两个伞状结构相对地呈现在细胞的两端(图版,图9)。

四、胞质分裂过程中的成膜体微管

从末期开始直到胞质分裂结束,存在另外一种微管排列方式,即成膜体微管(图版,图10—12)。成膜体是由平行排列的微管组成的,微管的取向与赤道板垂直。在整个胞质分裂过程中有各种形状的成膜体。最初,成膜体出现在细胞中央。这时组成成膜体的微管还比较长,有时还可以看到极纤丝从中穿过(图版,图10)。以后成膜体变成扁桶状(图版,图11)。当胞质分裂快要结束时,只在细胞边缘存在一圈很窄的微管(图版I,图12)。从侧面观察,在成膜体中部有一个不发光的环(图版,图10,11)。Wick等人^[6]认为这种现象是由于密度很大的细胞板物质阻止抗体分子接近微管造成的。

实验结果表明,我们制备的兔抗猪脑微管蛋白血清适用于植物细胞。对植物细胞周期中现知的四种类型的微管结构都有满意的染色效果。

讨 论

细胞骨架系统是当今细胞生物学领域中一个活跃的研究课题。在各种研究手段中,免疫荧光技术是比较有效和简便的方法之一。到目前为止,有关植物细胞周期中微管排列方式的变化,只在洋葱上有过比较系统的报道^[6-8]。本文为植物细胞微管排列的周期性变化提供了一个新的实例。

植物细胞周期中微管的排列方式与植物细胞的形态建成和细胞的空间构型密切相关^[7]。有关这方面的研究刚刚开始。我们观察到,除了上面谈到的四种微管排列方式外,在整个细胞周期中还有很多过渡类型。似乎表明在它们

之间存在一个动态的变化过程。在胞质分裂过程中,成膜体微管活跃的变化与细胞板的形成和壁物质的运输显然也是密切相关的。早前期核被膜荧光区的性质和意义也尚不清楚。所有这些问题都值得进一步研究。

图版说明

大蒜根尖细胞的间接免疫荧光照片,使用兔抗猪脑微管蛋白血清,羊抗兔IgG-FITC二级抗体。Olympus BH-RFL-W荧光显微镜观察,激发波长490 nm,阻挡滤光片0530。

图 1×600,图 2—12×1200

- 图 1 一个伸长细胞,示周缘微管。
 图 2 一个有丝分裂前期细胞,示发育早期的早前期带。
 图 3—4 前期细胞,示早前期带和核被膜荧光。
 图 5 一个前期细胞,示核表面聚合形式的微管。
 图 6 一个前期细胞,示纺锤体极在核表面形成。
 图 7 一个中期细胞,示对角分裂细胞的纺锤体。
 图 8—9 后期细胞,示有丝分裂后期纺锤体,可见纺锤体极丝(图 8)。
 图 10 一个末期细胞,示发育早期的成膜体微管。
 图 11 一个末期细胞,示扁桶状成膜体微管,中间有一不发光的环。
 图 12 一个末期细胞,示胞质分裂后期的成膜

体微管。

参 考 文 献

- [1] Gunning, B. E. M. & A. R. Hardham, 1982, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 651-698.
 [2] Lloyd, C. W., 1982, *Cytoskeleton in plant growth and development*. London: Academic.
 [3] Weber, K. et al., 1975, *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 459-463.
 [4] Osborn, M. et al., 1978, *J. Cell Biol.*, 77: R 27-R 34.
 [5] Franke, W. W. et al., 1977, *Cytobiologie*, 15: 24-48.
 [6] Wick, S. M. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 89: 685-690.
 [7] Wick, S.M. & J. Duniec, 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 235-243.
 [8] Wick, S. M. & J. Duniec, 1984, *Protoplasma*, 122: 45-55.
 [9] 简令成、孙龙华、孙德兰, 1984, 小麦叶片细胞周质微管的研究, *实验生物学报*, 17: 149-159
 [10] Shelanski, M. L. et al., 1973, *proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 765-768.
 [11] Laemmli, U. K., 1970, *Nature*, 227: 680-685.
 [12] Valk, P. Van der. et al., 1980, *protoplasma*, 105: 27-43.

(接封三)

pBR 322-AFP₁ 由 Tilghman 构建, 周光宇教授赠送。用 Hind III 切出其中的 cDNA_{AFP₁} 并按 Rigby 等^[4]方法作缺口移位标记。

对 RNA, 特别是对 mRNA 的保存和检测, 此法具有以下优点: (1) 电泳前 RNA 不需用醛等试剂变性, 而试剂变性有时重复性较差; (2) 电泳后不需转移, 而转移前的处理(微碱溶液)往往容易引起 RNA 的降解, 并在转移过程中大分子 RNA 在胶上很难转移完全, 小分子 RNA 又会穿过薄膜而丢失。原位杂交图谱表明, RNA 的杂交带紧密清晰, 没有扩散现象。

此外, 在实际操作过程中, 我们还有以下几点体会: (1) 用乙醇浸泡凝胶既可防止核酸的降解而利于核酸的保存, 又可加快凝胶的干燥进程。(2) 如果在凝胶尚未完全干燥前动用, 容易使它变成皱缩不平, 即使发生了这种情况, 还可将它重新浸泡而得到纠正。

(3) 用预杂交液简短地平衡凝胶, 可使本底更清楚, 也可维持杂交液的体积。(4) 凝胶在干燥过程中会稍微膨胀, 但这不会影响杂交结果, 在作放射自显影之前把凝胶充分干燥可以保持杂交信号的强度和降低本底。(5) 凝胶的干燥用真空干燥法比吸水干燥法更有利于核酸样品的保留。(6) RNA 不经醛化及碱处理仍可检测。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
 [2] Alwine, J. C., et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350-5354.
 [3] 张志新等, 1985, *细胞生物学杂志* 7, 171-174.
 [4] Rigby, P. W. J., et al., 1977, *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.