

用于本科教学的间接免疫荧光法观察玉簪 保卫细胞微管骨架

谢冰亮 王语涵 张琳 王可玥 卢存福*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 细胞骨架的观察是生命科学类专业本科生一个很重要的实验。目前, 在细胞生物学实验教学中常用考马斯亮蓝染色法观察植物细胞骨架, 但存在诸多不足。该研究选取洋葱、大叶黄杨、玉簪三种植物材料, 利用间接免疫荧光法对微管进行观察比较。结果表明, 三种植物中, 玉簪作为一种常见的绿化观赏花卉植物, 取材方便、撕片容易, 其气孔保卫细胞微管骨架免疫荧光图像显示清晰, 在低温处理后也可观察到微管解聚现象。因此, 玉簪可作为本科生实验教学中利用免疫荧光法观察微管骨架的一种易得、观察效果好的实验材料。

关键词 玉簪; 保卫细胞; 微管; 低温处理; 实验教学

Observation on Guard Cell Microtubules from *Hosta plantaginea* by Immunofluorescence Method for Undergraduate Teaching

Xie Bingliang, Wang Yuhan, Zhang Lin, Wang Keyue, Lu Cunfu*

(College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Cytoskeleton observation is a significant experiment for undergraduate students majoring in biology. In the experimental teaching of cell biology, coomassie brilliant blue staining is the common method to observe plant cytoskeletons. However, it is not a good method to detect and distinguish different cytoskeletons specifically. In present study, we used *Allium cepa*, *Hosta plantaginea*, and *Buxus megistophylla* to observe cell microtubules by immunofluorescence method. The results indicated that *Hosta plantaginea*, as an ornamental flower plant, is a suitable plant to observe clear fluorescent microtubule images in leaf guard cells. Microtubule depolymerization was detected in samples that treated at 4 °C or –20 °C, indicating that low temperature induced disintegration of the microtubule in guard cells. Therefore, *Hosta plantaginea* is a proper plant for observing microtubule by immunofluorescence microscopy for undergraduate teaching.

Keywords *Hosta plantaginea*; guard cell; microtubule; cold treatment; experimental teaching

细胞骨架是存在于真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 主要包括微管、微丝以及中间纤维。细胞骨架是本科生细胞生物学理论和实验课程中的重要教学内容^[1]。为了使学生更好地掌握细胞骨架的相

关知识及高效地观察细胞骨架结构, 各个高校都进行了大量的探索^[2]。

目前, 细胞骨架的观察取材多为动物培养细胞或洋葱内表皮。为了节省时间、简化实验操作过

收稿日期: 2016-12-05 接受日期: 2017-02-15

国家自然科学基金(批准号: J1310005、J1103516)和北京林业大学细胞生物学精品课程教学改革项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62338346, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

Received: December 5, 2016 Accepted: February 15, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.J1310005, J1103516) and Beijing Forestry University Teaching Reform Project for High Quality Curriculum of Cell Biology

*Corresponding author. Tel: +86-10-62338346, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2017-04-11 10:34:30 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170411.1034.012.html>

程,经常采用考马斯亮蓝染色法^[3],但考马斯亮蓝并不是细胞骨架蛋白的特异性染色剂,而是利用Triton X-100处理细胞后可以保留细胞骨架蛋白而去除其他蛋白的特性来对细胞骨架蛋白进行染色^[4]。因此,考马斯亮蓝染色法不能够特异性地区分不同的细胞骨架组分。微管主要维持细胞形态和结构,并与细胞分裂、分化和细胞运动等活动密切相关,是细胞生物学活跃的研究领域^[5]。目前,细胞生物学实验指导中关于植物细胞微管骨架的免疫细胞化学荧光观察,所用实验材料多为原生质体或花粉^[3,6],实验耗时长、操作繁杂、不易获得理想实验结果。鉴于此,我们用大叶黄杨、洋葱、玉簪等三种植物材料按照间接免疫荧光法显示细胞内微管的技术流程,反复探索、比较,确认观赏花卉植物玉簪叶片下表皮气孔保卫细胞可以显示清晰的荧光信号,是一种理想的细胞骨架教学实验的材料。

1 材料与方法

1.1 材料

取北京林业大学校园花坛内生长的玉簪[*Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers]、大叶黄杨叶片,撕取其叶片下表皮作为材料进行实验。另取市售的洋葱鳞茎内表皮为材料进行实验。

1.2 试剂与仪器

免疫荧光实验中用到的主要试剂有:纤维素酶、果胶酶、甘露醇、 β -微管蛋白一抗(兔抗)异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗(羊抗兔)等。主要仪器为荧光显微镜(LEICA DM 1000,德国Leica公司)。

1.3 实验方法

本实验具体操作流程如下。(1)取新鲜采取的玉簪叶,在清水中浸泡10 min,将叶片表面水分擦干。用刀片在下表皮两条相邻平行叶脉之间划出一条划痕,用镊子夹住裂口处,向叶子顶端沿叶脉平行方向撕取,撕下一块只有单层细胞的下表皮,然后剪取适宜大小即可。将材料分为六组,分别置于1.5 mL离心管中,加入PBS缓冲液(pH7.4)。(2)将六组材料两两一组分为三大组,分别在室温、4 °C冰箱以及-20 °C冰箱内放置5 h。(3)取出离心管,待管内PBS融化后,吸出PBS,加入4%多聚甲醛固定1 h。(4)PBS缓冲液洗去固定液,洗3次,每次5 min。(5)PBS配制的酶液(1%纤维素酶、1%果胶酶和0.4 mol/L甘露醇),材料中加入酶液,酶解10 min。(6)PBS缓冲液洗去

酶液,洗3次,每次5 min。(7)加入Triton X-100抽提液,抽提20 min。(8)PBS缓冲液洗去抽提液,洗3次,每次5 min。(9)加 β -微管蛋白一抗,浓度为1:500,室温放置1 h;对照组不加一抗。(10)PBS缓冲液洗去一抗,洗2次,每次5 min。(11)加入FITC标记的二抗,浓度为1:1 000,黑暗放置45 min。(12)用荧光显微镜观察并照相。以大叶黄杨和洋葱为材料的实验,除低温处理外,其他步骤同前述。

2 结果

2.1 大叶黄杨、玉簪、洋葱细胞微管骨架的免疫荧光定位

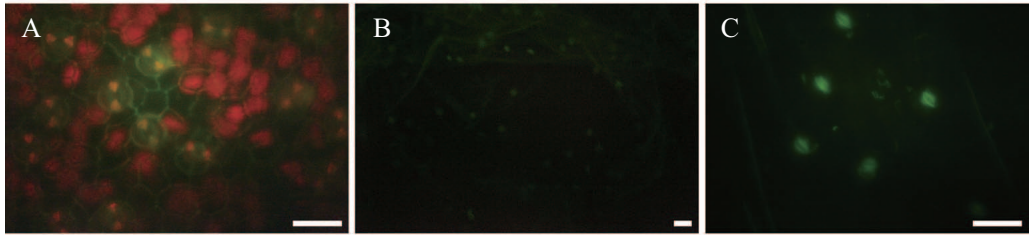
大叶黄杨下表皮中红色的荧光比较强烈,推测为叶绿素的自发荧光。而在一对肾形保卫细胞的尖端有红色的荧光,推测大叶黄杨的保卫细胞叶绿体分布在两端(图1A)。大叶黄杨容易取材,但难以撕取,在荧光显微镜下观察,会有强烈的红色自发荧光,不方便观察。

洋葱鳞茎内表皮细胞的免疫荧光信号较弱,图像不清晰(图1B)。虽然洋葱容易取材,但是在实验过程中洋葱样品难以保持形态,较为脆弱,极易被破坏,为实验带来困难,难以观察到细胞内清晰的微管骨架结构。

玉簪下表皮保卫细胞内侧有强烈的绿色荧光(图1C),推测微管分布在保卫细胞内侧,而由阴性实验可以确证绿色荧光显示的是微管蛋白的存在(图2A、图2E和图2I)。本实验中,在常温条件下,玉簪保卫细胞周围没有叶绿素自发荧光信号,推测可能是由于玉簪叶片背面近地面处光照较弱,导致表皮细胞叶绿素合成极少;或者因为撕下的为玉簪单层表皮细胞,叶绿素含量极少。因此,玉簪易于取材,较易撕取,实验过程中可保持良好形态,得到的免疫荧光图像清晰,没有红色荧光干扰,便于观察,利于实验顺利进行并取得良好结果。

2.2 低温使玉簪叶下表皮保卫细胞微管骨架解聚

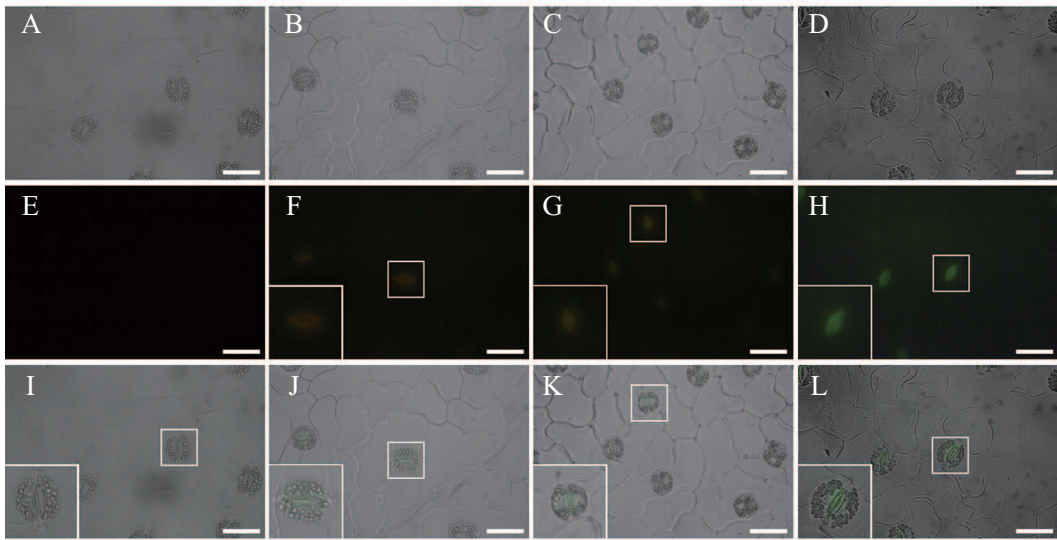
在确定利用免疫荧光细胞化学技术可以清楚地观察玉簪叶片表皮气孔细胞内微管骨架后,我们又探究了不同温度(室温、4 °C和-20 °C)下处理5 h后微管骨架的稳定性。结果表明,在室温条件下,保卫细胞微管荧光信号清晰可见;4 °C条件下处理5 h后,微管荧光信号减弱,但仍有微弱的信号存在;而在-20 °C下处理5 h后微管荧光信号非常弱,表明微管解聚(图2)。



A: 大叶黄杨保卫细胞; B: 洋葱鳞茎内表皮细胞; C: 玉簪保卫细胞。标尺=200 μm。
A: guard cells of *Buxus megistophylla*; B: cells of *Allium cepa*; C: guard cells of *Hosta plantaginea*. Scale bars=200 μm.

图1 三种植物的细胞微管骨架免疫细胞化学荧光定位

Fig.1 Fluorescent images of cell microtubules in three kinds of plants



A: 明场下未加一抗的对照组; B: 明场下-20 °C处理5 h的实验组; C: 明场下4 °C处理5 h的实验组; D: 明场下25 °C处理5 h的实验组; E: 暗场下未加一抗的对照组, 未见荧光信号; F: 暗场下-20 °C处理5 h的实验组, 荧光信号弱; G: 暗场下4 °C处理5 h的实验组, 荧光信号弱; H: 暗场下25 °C处理5 h的实验组, 荧光信号强; I: 未加一抗的明暗场叠加图; J: -20 °C处理5 h的明暗场叠加图; K: 4 °C处理5 h的明暗场叠加图; L: 25 °C处理5 h的明暗场叠加图。标尺=200 μm。

A: the bright-field image of control group without primary antibody. B: the bright-field image of sample treated at -20 °C for 5 h. C: the bright-field image of sample treated at 4 °C for 5 h. D: the bright-field image of sample treated at 25 °C for 5 h. E: the dark-field image of control group without primary antibody. No fluorescence signal was captured. F: the dark-field image of sample treated at -20 °C for 5 h. Little fluorescence signal was captured. G: the dark-field image of sample treated at 4 °C for 5 h. Little fluorescence signal was captured. H: the dark-field image of sample treated at 25 °C for 5 h. Strong fluorescence signal can be seen. I: the superposition of bright-field and dark-field image of the group without primary antibody. J: the superposition of bright-field and dark-field image. Sample was treated at -20 °C for 5 h. K: the superposition of bright-field and dark-field image. Sample was treated at 4 °C for 5 h. L: the superposition of bright-field and dark-field image. Sample was treated at 25 °C for 5 h. Scale bars=200 μm.

图2 不同温度处理下保卫细胞微管骨架的变化

Fig.2 Microtubule dynamics in relation to low temperature treatment

3 讨论

在对比实验中, 相比大叶黄杨叶片下表皮、洋葱鳞茎细胞, 玉簪叶片下表皮有着易于撕取、非特异性荧光少、处理过程中保持坚韧等优点。非特异性荧光可以通过一定的步骤去除^[7], 但是用玉簪做实验材料, 免去了这步操作, 避免了长时间试剂处理对材料的破坏, 使得最终成像效果较好。同时, 从玉簪叶下表皮撕取的样品几乎为单层细胞, 这避免了在表皮下方栅栏组织中叶绿体产生自发荧光对微管

观察产生的影响。但样品本身足够坚韧, 可在固定、酶解的过程中仍然保持较好的形态, 这是玉簪优于洋葱鳞茎、大叶黄杨的地方。

目前已有的观察植物细胞微管的方法主要以花粉、原生质体作为实验材料^[3,6]。然而, 以花粉作为材料首先需要取得足量的花粉, 同时, 实验对花粉的状态也有一定的要求。再者, 实验过程中的多次离心极大地增加了实验的时间及难度。而原生质体的获取, 也需要复杂的实验过程才能完成。以玉簪

保卫细胞作为实验材料则简化了实验步骤,可在简单易行的操作下对微管进行免疫荧光观察,得到良好的图像。

在确定玉簪为理想实验材料的基础上,经过多次实验探索,我们认为,酶解是免疫荧光方法显示微管骨架最关键的一步。在使用传统的组织化学方法对玉簪材料进行处理时,极易因处理时间过长和酶解液浓度过高而导致细胞受损、组织重叠,后者也可能导致非特异性荧光的产生。经过多次实验摸索,我们发现,1%的纤维素酶加1%果胶酶对玉簪组织的酶解效率高且易控制,处理时间在10 min以内为宜。若时间过长则容易出现组织堆叠,产生非特异性荧光,不利于结果的观察。在酶解液中加入0.4 mol/L甘露醇可以使酶解液渗透势与细胞相近,利于保存细胞以及微管结构的完整。

细胞微管骨架对低温等非生物胁迫敏感^[8-10]。简令成等^[11]利用免疫荧光细胞化学技术对番茄、黄瓜、菠菜、甜菜以及小麦进行了比较研究,结果表明,微管的冷稳定性与植物的抗寒性成正相关。从本实验的结果可以看出,随着温度的降低,玉簪保卫细胞微管解聚,这与前人的报道一致^[12-13]。本实验中,我们没有进行恢复温度是否微管重新聚合的实验,但是可以推测,低温下微管解聚可能是细胞非生物胁迫的应急适应,即微管解聚,通过影响到细胞内各个代谢途径,使得细胞生理生化反应受到抑制,为植物争取时间,度过不良环境。

参考文献 (References)

- 1 翟中和,丁明孝,王喜忠. 细胞生物学,第4版. 北京:高等教育出版社,2011,193-226.
- 2 何大澄. 对细胞骨架教学的体会. 中国细胞生物学学报(He Dacheng. Experience from cytoskeleton teaching. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(5): 78-9.
- 3 李素文. 细胞生物学实验指导. 北京:高等教育出版社,2011,147-8.
- 4 李冉,杨文理,覃扬. 不同固定方法对细胞免疫荧光染色结果的影响. 西部医学(Li Ran, Zhang Wenli, Tan Yang. The effects of different fixation methods on cellular immunofluorescence. Med J West) 2013; 25(11): 1608-10.
- 5 Lahav M, Abu-Abied M, Belausov E, Schwartz A, Sadot E. Microtubules of guard cells are light sensitive. Plant Cell Physiol 2004; 45(5): 573-82.
- 6 杨汉民. 细胞生物学实验,第2版. 北京:高等教育出版社,2006,73-4.
- 7 汪澈,张立军,李楠. 一种改进的观察植物细胞微管的免疫荧光染色方法. 植物生理学通讯(Wang Che, Zhang Lijun, Li Nan. An improved immunofluorescence microscopy for observing microtubule cytoskeleton in plant cells. Plant Physiology Communications) 2009; 45(7): 699-701.
- 8 Wang QY, Nick P. Cold acclimation can induce microtubular cold stability in a manner distinct from abscisic acid. Plant Cell Physiol 2001; 42(9): 999-1005.
- 9 Lu B, Gong Z, Wang J, Zhang J, Liang J. Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in Zea mays roots. J Exp Bot 2007; 58(10): 2565-72.
- 10 Wang C, Li J, Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 2007; 48(11): 1534-47.
- 11 简令成,孙龙华,林忠平. 微管的冷稳定性与植物抗寒性关系的研究. 植物学报(Jian Lingcheng, Sun Longhua, Lin Zhongping. Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness. Journal of Integrative Plant Biology) 1989; 31(10): 737-41.
- 12 Bartolo ME, Carter JV. Effect of microtubule stabilization on the freezing tolerance of mesophyll cells of spinach. Plant Physiol 1991; 97(1): 182-7.
- 13 Bartolo ME, Carter JV. Microtubules in mesophyll cells of nonacclimated and cold-acclimated spinach: Visualization and responses to freezing, low temperature, and dehydration. Plant Physiol 1991; 97(1): 175-81.