

教学研究

活体染色显微技术和绿色荧光蛋白在 本科实验教学中的应用

冯金林* 王 津 韩 榕

(山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004)

摘要 激光扫描共聚焦显微镜的原理和使用是本科生细胞生物学实验教学中的重要内容。目前, 在细胞生物学实验教学中常使用绿色新鲜的植物叶片作为实验材料, 在激光扫描共聚焦显微镜下对叶绿体的自发荧光进行观察。叶绿体的自发荧光信号强而且范围广, 使学生难以清晰地理解特异性的荧光信号。该文通过对转 $p35S::Naa10-GFP$ 基因拟南芥幼苗的根尖进行活体染色[碘化丙啶(propidium iodide, PI)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色], 在不同的激发光下, 收集相应的荧光信号, 通过计算机辅助成像, 获得不同颜色叠加的特异荧光信号图像。该实验设计简单可行, 获得的图像清晰且便于观察, 能够使初学者直观并且深刻理解激光扫描共聚焦显微镜的原理和使用方法, 适合在高校细胞生物学实验教学中推广, 同时也为研究其他蛋白质亚细胞定位提供技术参考。

关键词 激光扫描共聚焦显微镜; 拟南芥; 绿色荧光蛋白; PI; DAPI

The Application of Intravital Staining Microtechnic and Green Fluorescent Protein in the Experimental Course for Undergraduates

Feng Jinlin*, Wang Jin, Han Rong

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract The principle and usage of laser scanning confocal microscope are very important content in cell biology experimental course for undergraduates. In the current teaching procedures, green fresh leaves are used as material to observe the auto-fluorescent of chloroplast. The auto-fluorescent signal of chloroplast is strong and extensive, which leads to the result that the students cannot understand the specific fluorescent signal clearly. In this paper, the author stained the root tip of $p35S::Naa10-GFP$ transformed *Arabidopsis* with PI (propidium iodide) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and collected different fluorescent signal under relative wave length laser. Specific fluorescent signals merged images were obtained by using computer aided imaging technique. The design of this experiment is simple and the resulted images are clear and easy to observe, which make the beginners understand the principle and usage of laser scanning confocal microscope easily and deeply. The method introduced

收稿日期: 2017-01-15 接受日期: 2017-04-09

国家自然科学基金(批准号: 31600248)和山西师范大学教学改革创新项目(批准号: 2016JGXM-12)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0357-2051196, E-mail: jinlin_feng@163.com

Received: January 15, 2017 Accepted: April 9, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31600248) and the Foundation of Teaching Reform and Innovation of Shanxi Normal University (Grant No.2016JGXM-12)

*Corresponding author. Tel: +86-357-2051196, E-mail: jinlin_feng@163.com

网络出版时间: 2017-06-05 12:13:59 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170605.1213.006.html>

in this paper can be generalized in undergraduate experimental course in colleges and provides technical reference to study subcellular localization of a protein.

Keywords laser scanning confocal microscope; *Arabidopsis*; green fluorescent protein; PI; DAPI

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是本科生细胞生物学实验教学中的重要内容^[1]。LSCM用于研究蛋白质定位、蛋白质-蛋白质之间的相互作用(包括双分子荧光互补实验和荧光共振能量转移实验等)^[2]。相对于荧光显微镜, LSCM可以挡住来自焦平面以外的散射荧光, 通过对样品进行点扫描, 计算机辅助高速收集荧光信号和成像系统, 获得反差强和分辨率高的二维图像和三维重构图像^[2-3]。在目前LSCM的细胞生物学实验中, 经常使用绿色幼嫩的菠菜叶片进行叶绿体自发荧光的观察^[1]。幼嫩菠菜叶片的叶绿体含量丰富, 因此其自发荧光信号强度大且范围广, 在LSCM下获得的图像充满了荧光信号, 使学生无法直观地分辨特异的荧光信号, 也无法深刻地掌握和理解LSCM的原理和特点。

拟南芥是一种常用的模式植物, 拟南芥Naa10蛋白质是N-末端乙酰转移酶A复合体的组分, 定位在细胞质中^[4]。通过将Naa10基因与绿色荧光蛋白GFP(green fluorescent protein)基因融合, 转化植物, 获得包含Naa10-GFP融合蛋白的转基因拟南芥株系, 在LSCM下可获得来自细胞质的特异荧光信号^[4]。碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种荧光染料, 可以特异地对植物的细胞壁进行染色^[5]; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)是一种可以穿过细胞膜, 与DNA紧密结合的荧光染料^[6]。本文通过对转基因拟南芥株系生长6 d的根尖进行PI和DAPI染色, 在LSCM下分别进行PI和GFP荧光信号、DAPI和GFP荧光信号的收集, 通过计算机辅助的成像系统, 可以获得不同颜色荧光信号的叠加图像。获得的图像中, 两种不同荧光信号特异分布, 使学生更加准确地把握LSCM使用原理和范围。该实验设计简单可行, 针对性强, 适合在高校细胞生物学实验中推广, 同时也为研究其他蛋白质亚细胞定位提供技术参考。

1 实验原理

1.1 激光扫描共聚焦显微镜成像原理

LSCM采用激光束作为光源, 通过共聚焦成像

系统, 使得只有聚光镜聚焦到样品中某个焦点上所产生的激发荧光才能成像, 而来自焦点以外的散射光被小孔或狭缝遮挡, 无法在显示器上面显示荧光信号。通过计算机辅助成像系统, 采集和汇聚每一个点上的荧光信号, 形成清晰的二维图像。由于LSCM可以通过程序控制自动调节并改变焦平面, 所以可以通过光学切片改变焦平面而获得不同切片的图像, 通过图像叠加, 可以获得样品的三维结构^[1-2]。

1.2 绿色荧光蛋白

GFP最初是从水母中分离得到, 在蓝光波长的激发光作用下, 能发出绿色的荧光。通过载体构建, 将GFP基因与目的基因融合, 表达出含GFP的融合蛋白, 可用于报告目的蛋白的定位及表达情况。

1.3 PI和DAPI染色原理

1.3.1 PI染色原理 PI是溴化乙啶的类似物, 一种可对DNA染色的荧光染料, 它能够穿过破损的细胞膜而嵌入双链DNA。PI-DNA复合物在535 nm激发光下, 发出615 nm的红色荧光。PI也可以特异地对植物的细胞壁进行染色^[5]。

1.3.2 DAPI染色原理 DAPI是一种可以穿过细胞膜, 与DNA紧密结合的荧光染料, 因此, DAPI可用于标示细胞核。DAPI-DNA复合物在358 nm激发光下, 发出461 nm的蓝色荧光。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

本实验的教学目的主要包括三点内容: (1)掌握LSCM的原理和成像特点; (2)掌握PI和DAPI染色的原理和方法; (3)了解蛋白质亚细胞定位的研究方法。

2.2 教学的重点和难点

本实验的教学重点和难点包括: (1)LSCM的使用原理和成像特点(重点); (2)蛋白质亚细胞定位的研究方法(难点)。

2.3 实验材料与设备

2.3.1 材料与试剂 Naa10-GFP转基因拟南芥株系由实验室保存; PI、DAPI、MS盐和植物凝胶购自

Sigma公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、浓盐酸、蔗糖和1.5%的次氯酸钠溶液为国产分析纯试剂。

2.3.2 仪器设备 本实验用到的仪器设备包括超净工作台、植物培养箱(Percival, CU36L5)和LSCM(Zeiss Oberkochen, Zeiss LSM 5)。

2.4 教学安排

实验课前由实验员准备相关材料, 包括拟南芥幼苗(提前9 d消毒种子并培养)和实验相关试剂。学生需要提前预习相关内容, 包括植物根尖的形态结构(根冠、分生区、伸长区和成熟区)、PI和DAPI染色原理、LSCM成像原理和GFP相关知识。在LSCM教学实习中, 结合LSCM的成像原理, 在教师的讲解示范下, 使学生了解显微镜的结构及各部分的功能, 掌握显微镜和相关软件的操作方法和操作规范。LSCM除包括普通光学显微镜的基本构造外, 还包括高压汞灯、激光光源、扫描和成像系统、软件控制系统。操作流程包括开启高压汞灯、激光器和启动成像软件, 在高压汞灯的光源下对荧光信号进行预观察, 图像扫描参数的设置, 图像的获取和保存, 关闭控制软件、激光器和汞灯。通过动手操作训练, 加深学生对LSCM成像原理和成像特点的理解。建议实验中每组三人, 其中两人分别主要负责DAPI和PI染色, 一人主要负责显微镜的操作和图像获取, 组员之间协调配合, 共同完成实验。通过教学实习和实验过程, 使学生上机率达到80%, 单人操作率达到30%。实验课学时安排为3学时。

3 实验步骤

3.1 植物培养

消毒种子: 分100粒拟南芥种子到1.5 mL EP管中, 然后加入1 mL 1.5%的次氯酸钠溶液, 消毒5 min, 期间不断颠倒EP管, 使种子和次氯酸钠溶液充分接触。短暂离心, 吸除次氯酸钠溶液, 用无菌水洗涤种子4次。

配制含1%蔗糖的MS平板: 称取4.4 g MS盐和10 g蔗糖到1 L超纯水中, 搅拌使MS盐和蔗糖充分溶解, 用1 mol/L的KOH溶液调MS溶液的pH到5.8, 加入3 g植物凝胶, 121 °C灭菌15 min, 倒平板, 静置到凝固。

将消毒的种子种到MS平板上, 4 °C黑暗处理3 d,

然后转移到植物培养箱, 培养条件为16 h光照(22 °C)/8 h黑暗(18 °C), 培养6 d。

3.2 PI工作液的配制

PBS缓冲液的配制: 量取超纯水约800 mL到烧杯, 称取磷酸二氢钾0.27 g, 磷酸氢二钠1.42 g, 氯化钠8 g, 氯化钾0.2 g, 充分搅拌溶解, 然后加入浓盐酸调pH至7.4, 最后定容到1 L。PI用PBS缓冲液溶解成10 mg/mL的母液, 用水1:1 000稀释, 得到工作液。

3.3 DAPI工作液的配制

DAPI用PBS缓冲液溶解成0.1 mg/mL的母液, 用水1:1 000稀释, 得到工作液。

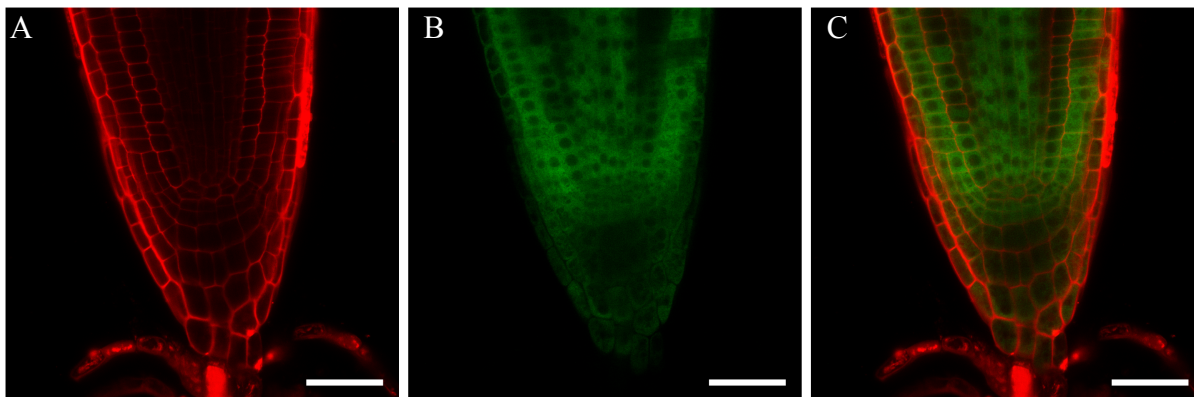
3.4 染色与观察

取生长6 d拟南芥幼苗的根, 黑暗下浸泡在PI工作液和DAPI工作液中, 分别染色1 min和10 min, 用超纯水制作根的装片, 在LSCM下进行观察。首先在低倍镜下找到根尖, 然后换到高倍镜下进行荧光信号的收集。使用488 nm的激发光对GFP蛋白进行激发, 使用535 nm的激发光对PI进行激发, 使用358 nm的激发光对DAPI进行激发, 分别获得单独激发光激发和叠加的荧光信号图像。使用没有染色的野生型拟南芥作为阴性对照进行荧光信号的观察。

4 实验结果

在LSCM下, 用535 nm的激发光激发转基因拟南芥幼苗的根尖, 收集荧光信号, 获得红色的PI荧光信号(图1A), PI特异地使根细胞壁着色, 可以用于标示细胞的轮廓; 在488 nm的激发光下, 收集荧光信号, 获得绿色的GFP荧光信号(图1B), 荧光信号来自细胞质; 通过计算机辅助系统, 获得以上两种荧光信号的叠加图像(图1C), 可以清楚地看到每一个细胞的细胞质发出的荧光信号。阴性对照野生型拟南芥在不同的激发光下收集不到荧光信号。

用358 nm的激发光激发转基因拟南芥幼苗的根尖, 收集荧光信号, 获得蓝色的DAPI荧光信号(图2A), DAPI特异地使根细胞核着色, 可以用于标示细胞核; 在488 nm的激发光下, 收集荧光信号, 获得绿色的GFP荧光信号(图2B), 荧光信号来自细胞质; 通过计算机辅助系统, 获得以上两种荧光信号的叠加图像(图2C), 可以清楚地看到每一个细胞核及Naa10蛋白的细胞质定位。阴性对照野生型拟南芥在不同的激发光下收集不到荧光信号。

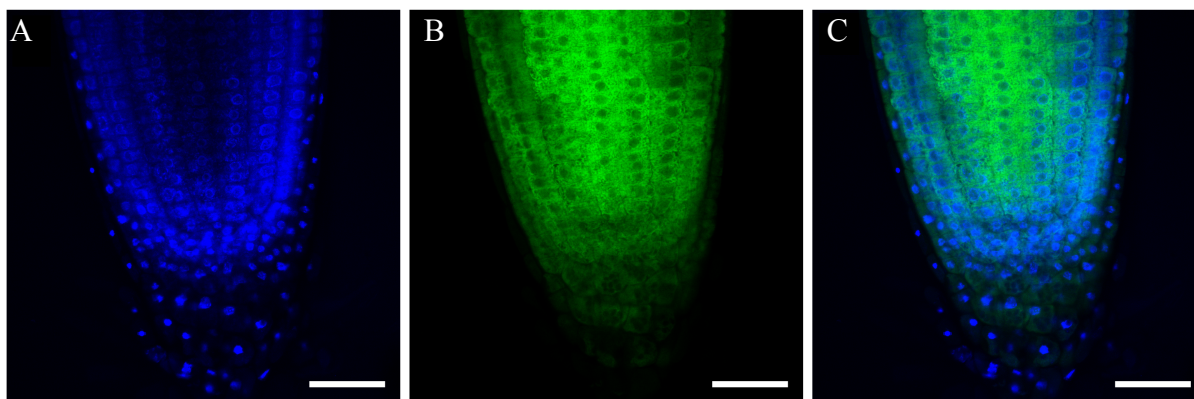


A: *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖PI染色图像; B: *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖GFP荧光信号图像; C: A和B叠加的图像; 标尺=20 μm 。

A: propidium iodide staining of *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip; B: GFP signal from *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip; C: merged image of A and B; scale bars=20 μm 。

图1 *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖的PI染色的荧光信号图像

Fig.1 Images of fluorescence signal from *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip with propidium iodide staining



A: *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖DAPI染色图像; B: *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖GFP荧光信号图像; C: A和B叠加的图像; 标尺=20 μm 。

A: DAPI staining of *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip; B: GFP signal from *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip; C: merged image of A and B; scale bars=20 μm 。

图2 *Naa10-GFP*转化拟南芥根尖的DAPI染色的荧光信号图像

Fig.2 Images of fluorescence signal from of *Naa10-GFP* transformed *Arabidopsis* root tip with DAPI staining

5 讨论

活体染色和GFP表达都是通过荧光信号反映特定结构或生物大分子(蛋白质或核酸)的定位和分布;不同的是,本实验中PI用于特异性地标示细胞壁位置,DAPI用于特异性地标示细胞核的位置,而GFP用于特异性地标示与其融合蛋白的位置,GFP的定位取决于与其融合蛋白的定位。

本实验中对拟南芥幼苗的根尖进行活体染色的时间长短对于是否获得特异性荧光信号具有决定作用。染色时间过短可能会染色失败;染色时间过长会增加非特异的荧光信号,降低染色的信号噪音比。学生可以通过设置不同长短的染色时间,确定获得清晰图像的最佳染色时间。

本文通过改进LSCM实验教学中使用的植物材料,结合根尖的活体染色,获得直观、特异和清晰的图像,使初学者能够更好地理解LSCM的成像优点和应用范围。该实验设计简单可行,适合在高校细胞生物学实验教学中推广,是将科研成果应用于教学实践的具体实例,为进一步加强科研成果促进教学改革提供了思路和参考,同时也为研究其他蛋白的亚细胞定位提供了技术参考。

参考文献 (References)

- 1 韩榕. 细胞生物学实验教程. 北京: 科学出版社(Han Rong. Cell biology experimental course. Beijing: Science Press), 2013, 24-7.
- 2 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学, 第4版. 北京: 高等教育出

- 版社(Zhai Zhonghe, Wang Xizhong, Ding Mingxiao. Cell Biology, 4th edition. Beijing: Higher Education Press), 2011, 30-48.
- 3 孙学俊, 闫喜中, 郝 赤. 激光共聚焦扫描显微镜技术简介及其应用(Sun Xuejun, Yan Xizhong, Hao Chi. Confocal laser scanning microscope, a general guideline and its applications. Journal of Shanxi Agricultural University) 2016; 36(1): 1-14.
- 4 Feng J, Li R, Ma S, Wu C, Li Y, Cao Y, *et al.* Protein N-terminal acetylation is required for embryogenesis in *Arabidopsis*. J Exp Bot 2016; 67(15): 4779-89.
- 5 Chaiwanon J, Wang Z. Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in *Arabidopsis* roots. Curr Biol 2015; 25(8): 1031-42.
- 6 Li Y, Xia C, Feng J, Yang D, Wu F, Cao Y, *et al.* The SNW domain of SKIP is required for its integration into the spliceosome and its interaction with the Paf1 complex in *Arabidopsis*. Mol Plant 2016; 9(7): 1040-50.