



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102147417 A

(43) 申请公布日 2011.08.10

(21) 申请号 201110007883.5

(22) 申请日 2011.01.14

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 韩振海 吴婷 王忆 贾文锁  
张新忠

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用。本发明所提供的植物生长素免疫组织定位方法,包括以下步骤:(1)对植物组织进行固定,得到固定后的植物组织;(2)在步骤(1)基础上对固定后的植物组织进行制片,得到植物组织切片;(3)在步骤(2)基础上对得到植物组织切片进行免疫染色,并通过观察阳性信号的位置确定所述激素在植物组织中的分布。本发明所提供的苹果属植物生长素免疫组织定位的方法可消除木本植物组织容易出现非特异性染色的影响,并可清晰地辨识出阳性信号所在。本发明通过该免疫组织定位的方法证实了在缺铁胁迫下,生长素在苹果茎尖和根尖组织上其分布具有组织特异性。

1. 一种定位检测植物中激素的方法,包括以下步骤:

(1) 对植物组织进行固定,得到固定后的植物组织;

(2) 在步骤(1)基础上将固定后的植物组织制成石蜡切片,得到植物组织切片;

(3) 在步骤(2)基础上对得到植物组织切片进行免疫染色,并通过观察阳性信号的位置确定所述激素在植物组织中的分布。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中所述对植物组织进行固定的方法包括如下步骤:先将植物组织浸入到1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐水溶液中抽真空,然后将植物组织在FAA固定液中浸泡;

每100mL所述FAA固定液由90mL体积百分比浓度为50%的乙醇水溶液、5mL乙酸和5mL甲醛组成;

所述步骤(2)中所述对固定后的植物组织进行制片的方法包括如下步骤:对所述固定后的植物组织依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、粘片和烘片的处理,得到植物组织切片;

所述步骤(3)中所述对得到植物组织切片进行免疫染色的方法包括如下步骤:对得到植物组织切片依次进行脱蜡、复水、过氧化氢孵育、修复、一抗孵育、二抗孵育和染色。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

所述步骤(3)中,所述一抗孵育的方法包括如下步骤:将所述修复后的植物组织切片加入激素单克隆抗体溶液中,4℃放置10h,得到一抗孵育后的植物组织切片;

所述步骤(3)中,所述二抗孵育的方法包括如下步骤:将一抗孵育后的植物组织切片加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体溶液,25℃放置30min,得到二抗孵育后的植物组织切片;

所述步骤(3)中,所述染色的方法包括如下步骤:将二抗孵育后的植物组织切片加入AEC染色剂,放置10min,或加入DAB染色剂,放置2min,即得到染色后的植物组织切片;

所述步骤(1)中,所述抽真空的温度为4℃、时间为1小时;所述在FAA固定液中浸泡温度为4℃、时间为10小时;

所述步骤(2)中,所述脱水的方法包括如下步骤:将固定后的植物组织依次用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡,得到脱水后的植物组织;

所述步骤(2)中,所述透明的方法包括如下步骤:将所述脱水后的植物组织依次用不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液和二甲苯进行浸泡,得到透明处理后的植物组织;

所述步骤(2)中,所述浸蜡的方法包括如下步骤:将所述透明处理后植物组织先在45℃的熔化石蜡中浸渍3天,然后在60℃的熔化纯蜡中浸渍3天,得到浸蜡后的植物组织;

所述步骤(2)中,所述包埋的方法包括如下步骤:向盒中倒入60℃的熔化纯蜡,再将所述浸蜡后的植物组织和纯蜡一起倒入盒中,待纯蜡凝固后即得到包埋好的植物组织;

所述步骤(2)中,所述切片的方法包括如下步骤:将所述包埋好的植物组织切成厚度为10 $\mu$ m的薄片;

所述步骤(2)中,所述粘片的方法包括如下步骤:将所述薄片先在温度为37℃的水中展片,再用防脱载玻片捞片,即得到粘片后的植物组织切片;

所述步骤(2)中,所述烘片的方法包括如下步骤:将所述粘片后的植物组织切片在

40℃ -70℃放置 1 小时 -24 小时,具体为在 70℃放置 1 小时或在 55℃放置 6 小时或在 65℃放置 8 小时或在 40℃放置 24 小时,得到烘片后的植物组织切片;

所述步骤 (3) 中,所述脱蜡的方法包括如下步骤:将所述烘片后的植物组织切片用二甲苯进行浸泡,得到脱蜡后的植物组织切片;

所述步骤 (3) 中,所述复水的方法包括如下步骤:将所述脱蜡后的植物组织切片依次用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡,得到复水后的植物组织切片;

所述步骤 (3) 中,所述过氧化氢孵育的方法包括如下步骤:将复水后的植物组织切片放入过氧化氢溶液中放置 20min,得到过氧化氢孵育后的植物组织切片;

所述步骤 (3) 中,所述修复的方法包括如下步骤:将所述过氧化氢孵育后的植物组织切片浸入到枸橼酸缓冲液中放置 10min,得到修复后的植物组织切片;每 500mL 所述枸橼酸缓冲液由 9mL 0.1mol/L 枸橼酸、41mL 0.1mol/L 枸橼酸钠和水组成,用水补足体积,pH 值为 6.0。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤 (3) 中,所述一抗孵育的方法中,所述激素单克隆抗体溶液按照包括如下步骤的方法制备得到:用抗体溶解液将激素单克隆抗体进行溶解得到激素单克隆抗体溶液;所述激素单克隆抗体溶液的浓度为 1mg/mL;每 100mL 所述抗体溶解液由 0.73g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.79g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3.766g  $\text{NaCl}$  和水组成,用水补足体积。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的,其特征在于:

所述步骤 (2) 中,所述脱水的方法中,所述不同浓度的乙醇水溶液和乙醇依次为:50%乙醇水溶液、70%乙醇水溶液、80%乙醇水溶液、90%乙醇水溶液、95%乙醇水溶液和 100%乙醇;所述浓度为体积百分比浓度;所述用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡的时间为:各浓度均为 0.5 小时、1.5 小时或 2 小时;

所述步骤 (2) 中,所述透明的方法中,所述不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液依次为:由体积比为 2:1 的乙醇和二甲苯组成的混合液、由体积比为 1:1 的乙醇和二甲苯组成的混合液和由体积比为 1:2 的乙醇和二甲苯组成的混合液;所述用不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液和二甲苯进行浸泡的时间为:各浓度均为 0.5 小时、1.5 小时或 2 小时;

所述步骤 (3) 中,所述复水的方法中,所述不同浓度的乙醇水溶液依次为:100%乙醇水溶液、90%乙醇水溶液、80%乙醇水溶液和 70%乙醇水溶液;所述浓度为体积百分比浓度;所述用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡的时间为:各浓度均为 10 分钟。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的,其特征在于:

所述步骤 (1) 中所述 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐水溶液的质量百分比浓度为 3%;

所述步骤 (3) 中所述过氧化氢溶液为质量百分比浓度为 3%的过氧化氢溶液;每 100mL 所述 3%的过氧化氢溶液由 90mL 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液和 10mL 质量百分比浓度为 30%的过氧化氢水溶液组成;每 1000mL 所述 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液由 8g  $\text{NaCl}$ 、0.2g  $\text{KCl}$ 、1.44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和水组成,用水补足体积。

7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的方法,其特征在于:所述植物为多年生植物;所述多年生植物具体为苹果属植物;所述苹果属植物具体为小金海棠;所述植物组织具体为茎尖。

8. 根据权利要求 1-7 中任一所述的方法,其特征在于:所述激素为生长素;所述激素单克隆抗体为生长素单克隆抗体。

9. 权利要求 1-8 中任一所述的方法在定位检测植物中激素中的应用。

10. 根据权利要求 9 中所述的应用,其特征在于:

所述植物为多年生植物;所述多年生植物具体为苹果属植物;所述苹果属植物具体为小金海棠;

所述激素为生长素。

## 苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 植物激素是一些在植物体内合成的能从产生部位运送到作用部位,并在低浓度时对生长发育具有显著生理作用的微量有机物,其可以调控植物生命活动的整个进程。因此对植物激素的研究不仅是了解植物生长发育基本规律的途径,而且是对植物遗传、化学和环境调控的有效手段,所以植物激素的研究与应用具有十分重要的理论意义和广阔的应用前景。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。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 (Iten, M, 1999)。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。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。

[0003] 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,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。利用化学方法把植物激素固定到内部蛋白的过程如 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,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和通过苯环被固定的报道。

[0004] 植物激素的免疫定位中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。

[0005] 植物细胞内存在复杂的信号转导网络体系 (networks)。了解不同信号之间的相互作用对于我们理解这一复杂的信号转导网络体系越来越重要。这一类研究已成为信号转导领域的研究热点 (Chary J, 2001)。生长素是最早发现的一类植物激素,在植物细胞的信号转导网络体系中起主导作用,与其他信号协同作用调节植物细胞的分裂、伸长和分化等发育过程。而对植物特别是木本植物的复杂的应答反应通路中生长素的细胞定位变化研究,对生长素调节植物信号转导是十分必要的。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种定位检测植物中激素的方法。

[0007] 本发明所提供的定位检测植物中激素的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 对植物组织进行固定,得到固定后的植物组织;

[0009] (2) 在步骤(1)基础上将固定后的植物组织制成石蜡切片,得到植物组织切片;

[0010] (3) 在步骤(2)基础上对得到植物组织切片进行免疫染色,并通过观察阳性信号的位置确定所述激素在植物组织中的分布。

[0011] 所述步骤(1)中所述对植物组织进行固定的方法包括如下步骤:先将植物组织浸入到 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐水溶液中抽真空,然后将植物组织在 FAA 固定液中浸泡;

[0012] 每 100mL 所述 FAA 固定液由 90mL 体积百分比浓度为 50% 的乙醇水溶液、5mL 乙酸和 5mL 甲醛组成;

[0013] 所述步骤(2)中所述对固定后的植物组织进行制片的方法包括如下步骤:对所述固定后的植物组织依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、粘片和烘片的处理,得到植物组织切片;

[0014] 所述步骤(3)中所述对得到植物组织切片进行免疫染色的方法包括如下步骤:对得到植物组织切片依次进行脱蜡、复水、过氧化氢孵育、修复、一抗孵育、二抗孵育和染色。

[0015] 所述步骤(3)中,所述一抗孵育的方法包括如下步骤:将所述修复后的植物组织切片加入激素单克隆抗体溶液中,4℃放置 10h,得到一抗孵育后的植物组织切片;

[0016] 所述步骤(3)中,所述二抗孵育的方法包括如下步骤:将一抗孵育后的植物组织切片加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体溶液,25℃放置 30min,得到二抗孵育后的植物组织切片;

[0017] 所述步骤(3)中,所述染色的方法包括如下步骤:将二抗孵育后的植物组织切片加入 AEC 染色剂,放置 10min,或加入 DAB 染色剂,放置 2min,即得到染色后的植物组织切片;

[0018] 所述步骤(1)中,所述抽真空的温度为 4℃、时间为 1 小时;所述在 FAA 固定液中浸泡温度为 4℃、时间为 10 小时;

[0019] 所述步骤(2)中,所述脱水的方法包括如下步骤:将固定后的植物组织依次用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡,得到脱水后的植物组织;

[0020] 所述步骤(2)中,所述透明的方法包括如下步骤:将所述脱水后的植物组织依次用不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液和二甲苯进行浸泡,得到透明处理后的植物组织;

[0021] 所述步骤(2)中,所述浸蜡的方法包括如下步骤:将所述透明处理后植物组织先在 45℃的熔化石蜡中浸渍 3 天,然后在 60℃的熔化纯蜡中浸渍 3 天,得到浸蜡后的植物组织;

[0022] 所述步骤(2)中,所述包埋的方法包括如下步骤:向盒中倒入 60℃的熔化纯蜡,再将所述浸蜡后的植物组织和纯蜡一起倒入盒中,待纯蜡凝固后即得到包埋好的植物组织;

[0023] 所述步骤(2)中,所述切片的方法包括如下步骤:将所述包埋好的植物组织切成厚度为 10 μm 的薄片;

[0024] 所述步骤(2)中,所述粘片的方法包括如下步骤:将所述薄片先在温度为 37℃的水中展片,再用防脱载玻片捞片,即得到粘片后的植物组织切片;

[0025] 所述步骤(2)中,所述烘片的方法包括如下步骤:将所述粘片后的植物组织切片

在 40℃ -70℃ 放置 1 小时 -24 小时, 具体为在 70℃ 放置 1 小时或在 55℃ 放置 6 小时或在 65℃ 放置 8 小时或在 40℃ 放置 24 小时, 得到烘片后的植物组织切片;

[0026] 所述步骤 (3) 中, 所述脱蜡的方法包括如下步骤: 将所述烘片后的植物组织切片用二甲苯进行浸泡, 得到脱蜡后的植物组织切片;

[0027] 所述步骤 (3) 中, 所述复水的方法包括如下步骤: 将所述脱蜡后的植物组织切片依次用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡, 得到复水后的植物组织切片;

[0028] 所述步骤 (3) 中, 所述过氧化氢孵育的方法包括如下步骤: 将复水后的植物组织切片放入过氧化氢溶液中放置 20min, 得到过氧化氢孵育后的植物组织切片;

[0029] 所述步骤 (3) 中, 所述修复的方法包括如下步骤: 将所述过氧化氢孵育后的植物组织切片浸入到枸橼酸缓冲液中放置 10min, 得到修复后的植物组织切片; 每 500mL 所述枸橼酸缓冲液由 9mL 0.1mol/L 枸橼酸、41mL 0.1mol/L 枸橼酸钠和水组成, 用水补足体积, pH 值为 6.0。

[0030] 所述步骤 (2) 中, 所述脱水的方法中, 所述不同浓度的乙醇水溶液和乙醇依次为: 50% 乙醇水溶液、70% 乙醇水溶液、80% 乙醇水溶液、90% 乙醇水溶液、95% 乙醇水溶液和 100% 乙醇; 所述浓度为体积百分比浓度; 所述用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡的时间为: 各浓度均为 0.5 小时、1.5 小时或 2 小时;

[0031] 所述步骤 (2) 中, 所述透明的方法中, 所述不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液依次为: 由体积比为 2:1 的乙醇和二甲苯组成的混合液、由体积比为 1:1 的乙醇和二甲苯组成的混合液和由体积比为 1:2 的乙醇和二甲苯组成的混合液; 所述用不同浓度的二甲苯和乙醇的混合溶液和二甲苯进行浸泡的时间为: 各浓度均为 0.5 小时、1.5 小时或 2 小时;

[0032] 所述步骤 (3) 中, 所述复水的方法中, 所述不同浓度的乙醇水溶液依次为: 100% 乙醇水溶液、90% 乙醇水溶液、80% 乙醇水溶液和 70% 乙醇水溶液; 所述浓度为体积百分比浓度; 所述用不同浓度的乙醇水溶液和乙醇进行浸泡的时间为: 各浓度均为 10 分钟。

[0033] 所述步骤 (1) 中所述 1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐水溶液的质量百分比浓度为 3%;

[0034] 所述步骤 (3) 中所述过氧化氢溶液为质量百分比浓度为 3% 的过氧化氢溶液; 每 100mL 所述 3% 的过氧化氢溶液由 90mL 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液和 10mL 质量百分比浓度为 30% 的过氧化氢水溶液组成; 每 1000mL 所述 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液由 8gNaCl、0.2g KCl、1.44g Na<sub>2</sub>HP04、0.2g KH<sub>2</sub>P04 和水组成, 用水补足体积。

[0035] 所述植物为多年生植物; 所述多年生植物具体为苹果属植物; 所述苹果属植物具体为小金海棠; 所述植物组织具体为茎尖。

[0036] 所述激素为生长素; 所述激素单克隆抗体为生长素单克隆抗体。

[0037] 本发明的另一个目的是提供所述方法在定位检测植物中激素中的应用。

[0038] 所述植物为多年生植物; 所述多年生植物具体为苹果属植物; 所述苹果属植物具体为小金海棠;

[0039] 所述激素为生长素。

[0040] 本发明所提供的苹果属植物生长素免疫组织定位的方法可消除木本植物组织容易出现非特异性染色的影响, 并可清晰地辨识出阳性信号所在。本发明通过该免疫组织定

位的方法证实了在缺铁胁迫下,生长素在苹果茎尖和根尖组织上其分布具有组织特异性。

### 附图说明

[0041] 图 1 为在不同二抗标记及染色系统下的 IAA 免疫组织定位结果。

[0042] 图 2 为缺铁诱导刺激下 IAA 茎尖定位。

### 具体实施方式

[0043] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0044] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0045] 苹果属植物小金海棠 (*Malus Xiaojinensis* Cheng et. Jiang) (公众可从中国农业大学获得,记载过小金海棠的非专利文献是:陈竹,王忆,张新忠,韩德果,韩振海. 小金海棠类黄色条纹蛋白基因 (MxYSL5) 启动子的克隆与表达. 农业生物技术学报. 2010, 18(6):1084-1090)。

[0046] 试剂说明:除文中标注出处试剂,其余试剂均购自广达恒益公司。

[0047] 实施例 1、苹果属植物的 IAA 免疫组织化学定位

[0048] 一、固定

[0049] 将小金海棠组培苗在生长培养基 (MS+0.5mg/L IBA+0.2mg/L 6-BA) 中培养,待其生长到茎木质化后,转移至生根培养基 (1/2MS+1.0mg/L IBA),组培苗生出白色根后,移至 1/2 全营养液 (组成见表 2,初始 pH 值用 NaOH 调至 6.0) 中覆膜保湿培养 2 周,之后转入全营养液 (组成见表 1,初始 pH 值用 NaOH 调至 6.0) 培养一个月,每周换一次全营养液,培养条件为:光照培养 16 小时 (光量子通量密度  $250 \mu E \cdot M^{-2} \cdot S^{-1}$ ),温度为  $25 \pm 2^{\circ}C$ ;黑暗培养 8 小时,温度为  $17 \pm 2^{\circ}C$ 。之后进行缺铁诱导,方法为:将植株从全营养液中转至含  $4 \mu mol$  Fe 营养液 (组成见表 3,初始 pH 值用 NaOH 调至 6.0),转移前去离子水冲洗。然后取经上述缺铁诱导的小金海棠的茎尖组织约 0.5cm 长,浸入到 2mL3% (质量百分比) 乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (EDC,购自于北京赛驰生物科技有限公司) 水溶液中, $4^{\circ}C$  抽真空固定 1 小时,然后将茎尖组织浸泡在固定液内 (固定液组成见表 4),在  $4^{\circ}C$  下固定 10 小时。结果表明,FAA 固定液容易渗透入茎尖组织,而 PFA 固定液难于渗透入茎尖组织,说明 FAA 固定液的效果较好。

[0050] 全营养液的配方如下表 1:

[0051] 表 1 全营养液的配方

[0052]

大量元素营养液		微量元素营养液	
盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-3} mol \cdot L^{-1}$ )	盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$ )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	11	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	18
KNO <sub>3</sub>	5	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.5
CaCl <sub>2</sub>	5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.39
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3	Fe-EDTA	400

[0053] 1/2 全营养液的配方如下表 2:

[0054] 表 2 1/2 全营养液的配方

[0055]

大量元素营养液		微量元素营养液	
盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5.5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	9
KNO <sub>3</sub>	2.5	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.75
CaCl <sub>2</sub>	2.5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.45
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5	(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.195
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.5	Fe-EDTA	200

[0056] 含 4 μmol Fe 营养液的配方如下表 3 :

[0057] 表 3 含 4 μmol Fe 营养液的配方

[0058]

大量元素营养液		微量元素营养液	
盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	11	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	18
KNO <sub>3</sub>	5	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.5
CaCl <sub>2</sub>	5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.39
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3	Fe-EDTA	4

[0059] 表 4 固定液的组成

[0060]

FAA 固定液	50%乙醇 90ml	乙酸 5ml	甲醛 5ml
PFA 固定液	多聚甲醛 40g	NaHPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 16.88g	NaOH 3.86g

[0061] 二、制片

[0062] 从步骤一的固定液中捞出植物组织,用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液(组成见表 7)冲洗 3 次,再将冲洗后的植物组织依次投入到 2mL 50%乙醇水溶液、2mL 70%乙醇水溶液、2mL 80%乙醇水溶液、2mL 90%乙醇水溶液、2mL 95%乙醇水溶液、和 2mL 100%乙醇水溶液(乙醇水溶液的浓度均为体积百分比浓度)中进行浸泡,即进行乙醇梯度脱水。各梯度的处理时间见表 5;然后将脱水后的植物组织依次投入到 2mL 由体积比为 2 : 1 的乙醇和二甲苯组成的混合液、2mL 由体积比为 1 : 1 的乙醇和二甲苯组成的混合液、2mL 由体积比为 1 : 2 的乙醇和二甲苯组成的混合液和 2mL 二甲苯进行浸泡,即进行二甲苯梯度透明,各梯度的处理时间见表 5。结果表明组合 3 处理下的包埋组织,在切片过程中能保证组织完整不易被切碎。组合 1 和组合 2 由于脱水透明时间过长造成组织易碎,不能保持组织的完整性。将透明处理后植物组织先在 45℃ 的熔化石蜡中浸渍 3 天,然后在 60℃ 的融化纯蜡中浸渍 3 天,得到浸蜡后的植物组织。

[0063] 表 5 脱水 and 透明处理的时间

[0064]

	乙醇梯度脱水各梯度的处理时间	二甲苯梯度透明各梯度的处理时间
组合 1	2 小时	2 小时

组合 2	1.5 小时	1.5 小时
组合 3	0.5 小时	0.5 小时

[0065] 向盒中倒入 60℃ 的熔化纯蜡,再将所述浸蜡后的植物组织和纯蜡一起倒入小纸盒中,用加热的镊子迅速把材料按需要的切面和一定的间隔 (0.5cm 左右) 排列整齐使其竖直,待纯蜡凝固后即得到包埋好的植物组织。将所述包埋好的植物组织用解剖刀切成小块,在酒精灯上加热解剖刀将蜡块修成梯形。然后将小块固定在木块上,用切片机切成厚度为 10 μm 的薄片。然后将切成的薄片进行粘片,方法为:先在 37℃ 温水中展片,使用防脱载玻片 (Probe-On Plus, 购自中杉金桥公司) 捞片,之后进行烘片,即得到植物组织切片;烘片时间与温度组合见表 6,每组各设三次重复。结果表明,组合 1 脱片最严重,组织无法保留完整性。组合 3 和组合 4 可以减轻脱片影响,在此基础上提高烘片温度和缩短烘片时间,即得到组合 2,表明组合 2 的片子在后续的免疫染色过程中最不宜脱片。因此,选择烘片的温度为 70℃,时间为 1h。

[0066] 表 6 免疫切片烘片的温度和时间

[0067]

组合	烘片时间	烘片温度
1	24 时	40℃
2	1 时	70℃
3	6 时	55℃
4	8 时	65℃

[0068] 三、免疫染色

[0069] (1) 脱蜡:将步骤二得到的植物组织切片经二甲苯脱蜡,得到脱蜡后的植物组织切片,方法为:依次分别在 100%二甲苯和 100%二甲苯中浸泡 10 分钟。

[0070] (2) 复水:对上述脱蜡后的植物组织切片进行梯度乙醇复水,得到复水后的植物组织切片,方法为:依次在以下不同浓度的乙醇水溶液中进行浸泡:100%乙醇水溶液 (10 分钟)、100%乙醇水溶液 (10 分钟)、90%乙醇水溶液 (10 分钟)、80%乙醇水溶液 (10 分钟) 和 70%乙醇水溶液 (10 分钟)。复水后用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 分钟。

[0071] (3) 过氧化氢孵育修复抗原:配制 3%过氧化氢溶液,每 100mL 所述 3%的过氧化氢溶液由 90mL 所述 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液和 10mL30%过氧化氢水溶液 (质量百分比浓度) 组成,孵育复水后的植物组织切片 20 分钟。然后用清水将过氧化氢孵育后的植物组织切片洗两次。

[0072] (4) 修复:将上述过氧化氢孵育后的植物组织切片浸入到枸橼酸缓冲液 (组成见表 8) 中放置 10min,得到修复后的植物组织切片。再依次用清水将修复后的植物组织切片洗 2 次,用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 分钟。

[0073] (5) 一抗孵育:对修复后的植物组织切片进行一抗孵育,方法是:将每张修复后的植物组织切片加入用PB(含0.8% BSA的10mmol/LPBS)稀释的生长素(IAA)单克隆抗体(购自Agdia, IAA单克隆抗体先用抗体溶解液进行溶解,得到浓度为1mg/mL的抗体溶液;抗体溶解液组成见表9)100  $\mu$  l(稀释倍数见表10),放入盛有PBS的湿盒,4℃放置10小时。试验结果证明当抗体稀释到80倍以上就很难检测到抗原,故抗体的最佳稀释倍数为80倍。然后对一抗孵育后的植物组织切片进行冲洗和浸洗,方法为:用HSR溶液冲洗并振动浸洗10min,用RSR溶液浸洗过渡10min,再用0.01mol/L的PBS缓冲液冲洗3次,每次3分钟;所述HSR溶液为所述0.01mol/L的PBS缓冲液中含有0.1% Tween-20(质量百分比含量)、0.1%牛血清白蛋白(质量百分比含量)、2.9% NaCl(质量百分比含量);所述RSR溶液为所述0.01mol/L的PBS缓冲液中含有0.1% Tween-20(质量百分比含量)、0.8%牛血清白蛋白(质量百分比含量)和0.88% NaCl(质量百分比含量)。

[0074] (6) 二抗孵育和染色:二抗孵育及染色系统组合见表11,表11中3种组合的结果分别为:组合3中在碱磷酶作为标记二抗时用BCIP/NBT显色时,显色剂会与木本植物组织产生非特异性染色,除在茎尖生长锥部分出现阳性结果,在生长锥以下出现阳性染色,通过阴性对照与免疫学常规判断以碱磷酶作为标记二抗会导致假阳性结果,并不适合木本植物的IAA定位;组合1在辣根酶做标记二抗时用传统DAB显色时,由于木本植物木质素影响,使得DAB染色阳性结果受植物组织本底色干扰,无法真实辨别IAA组织分布。组合2中AEC显色系统可以消除木本植物组织容易出现非特异性染色的影响,并清晰的可以辨识出阳性信号所在(图1,图1中阴性对照为用小鼠IGG代替一抗;AP代表组合3,即在碱磷酶做标记二抗时用BCIP/NBT显色;HRP-AEC代表组合2,即在辣根酶做标记二抗时用AEC显色;HRP-DAB代表组合1,即在辣根酶做标记二抗时用DAB显色)。故本发明选择的二抗孵育和染色方法为:每张一抗孵育后的植物组织加入100  $\mu$  l酶标羊抗小鼠工作液(购自DAKO公司),25℃放置30min,然后依次用所述RSR溶液振动浸洗10min,用所述0.01mol/L的PBS缓冲液冲洗3次,每次3min和用双蒸水冲洗10min,吸去水珠,加入AEC染色剂(购自zemyd公司),放置10min,然后用流水冲洗染色后的植物组织切片。缓冲甘油封片。显微镜(nikon, TI-2000)观察,图像由nikon-CCD连接显微镜获取。结果如图2所示,图2中A、B、C分别代表缺铁诱导1天、3天、6天的免疫染色下植物茎尖中IAA的表达,图2中G、H、I分别为阴性对照(阴性对照用小鼠IGG代替一抗),从图中可见,在缺铁胁迫下,IAA在茎尖组织上的分布具有组织特异性。

[0075] 表70.01mol/L的PBS缓冲液(pH7.4)的组成

[0076]

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HP04	1.44g
KH <sub>2</sub> P04	0.2g
加双蒸水至	1000ml

[0077] 表 8 枸橼酸缓冲液 (pH = 6.0) 的组成

[0078]

0.1M 枸橼酸	9ml
0.1M 枸橼酸钠	41ml
蒸馏水	450ml

[0079] 表 9 生长素 (IAA) 单克隆抗体溶解液

[0080]

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.73g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.79g
NaCl	3.766g
双蒸水	至 100ml

[0081] 表 10 生长素 (IAA) 单克隆抗体 (1mg/ml) 稀释倍数 :

[0082]

稀释倍数	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍
------	------	------	------	------	-------

[0083] 表 11 二抗染色组合

[0084]

	二抗	染色系统
组合 1	辣根酶标二抗 30min	DAB 2min
组合 2	辣根酶标二抗 30min	AEC 10min
组合 3	碱磷酶标二抗 30min	BCIP/NBT 10min

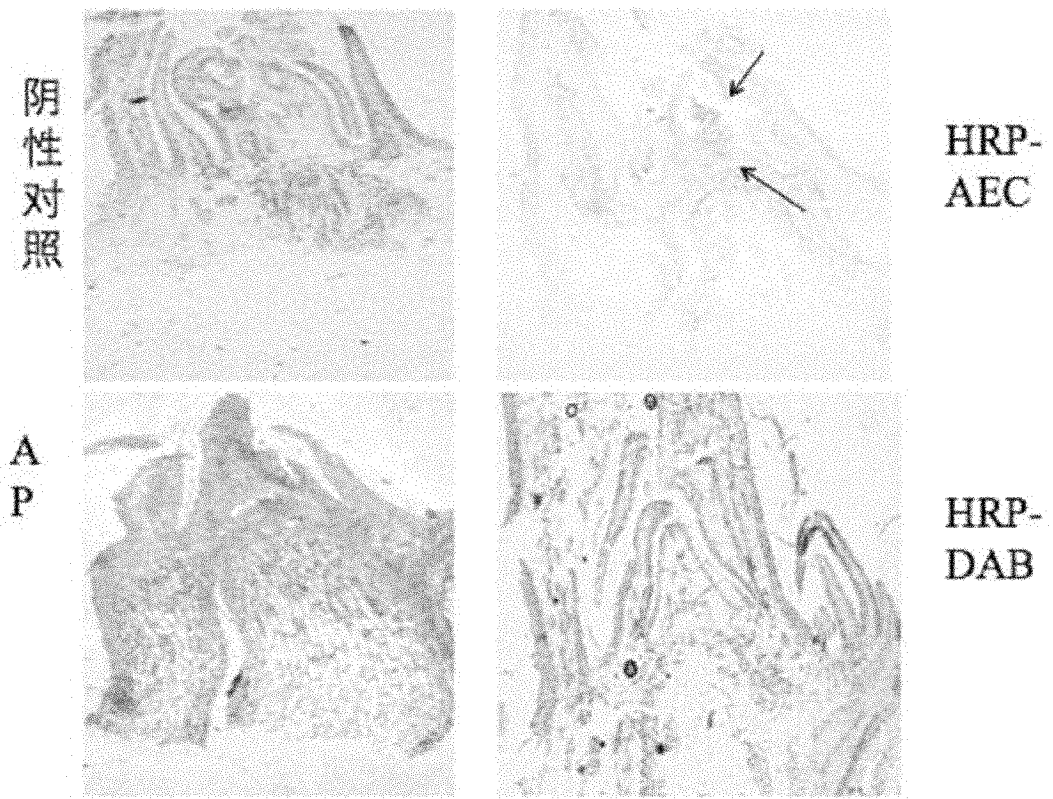


图 1

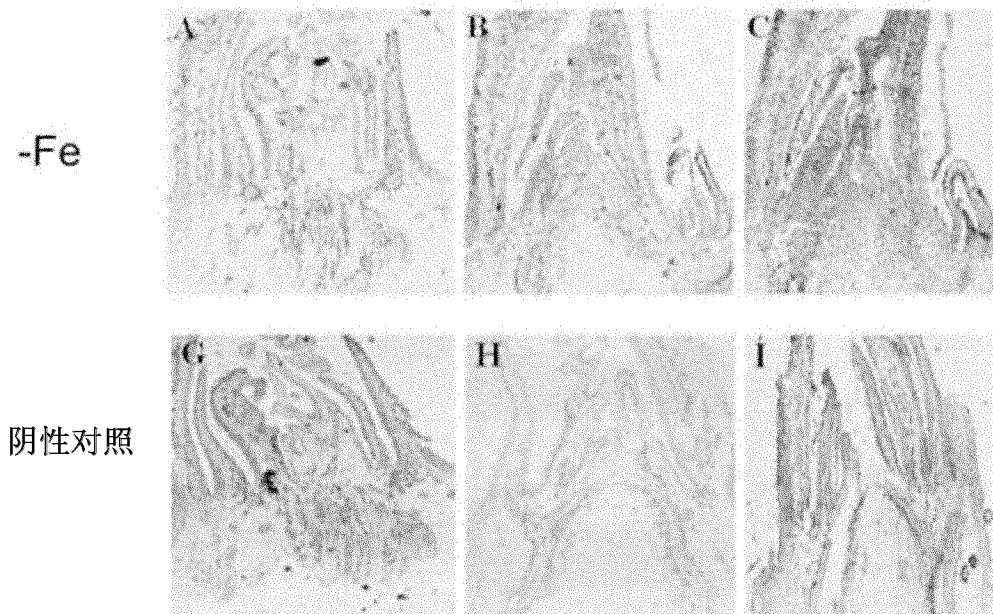


图 2

专利名称(译)	苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102147417A</a>	公开(公告)日	2011-08-10
申请号	CN201110007883.5	申请日	2011-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	韩振海 吴婷 王忆 贾文锁 张新忠		
发明人	韩振海 吴婷 王忆 贾文锁 张新忠		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/577 G01N33/531 G01N1/30		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN102147417B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了苹果属植物生长素免疫组织定位的方法及其应用。本发明所提供的植物生长素免疫组织定位方法，包括以下步骤：(1)对植物组织进行固定，得到固定后的植物组织；(2)在步骤(1)基础上对固定后的植物组织进行制片，得到植物组织切片；(3)在步骤(2)基础上对得到植物组织切片进行免疫染色，并通过观察阳性信号的位置确定所述激素在植物组织中的分布。本发明所提供的苹果属植物生长素免疫组织定位的方法可消除木本植物组织容易出现非特异性染色的影响，并可清晰地辨识出阳性信号所在。本发明通过该免疫组织定位的方法证实了在缺铁胁迫下，生长素在苹果茎尖和根尖组织上其分布具有组织特异性。

大量元素营养液		微量元素营养液	
盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ )	盐类	浓度 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11	$\text{H}_3\text{BO}_3$	18
$\text{KNO}_3$	5	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.5
$\text{CaCl}_2$	5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.9
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.39
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3	Fe-EDTA	400