



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109085337 A

(43)申请公布日 2018.12.25

(21)申请号 201811005717.X

(22)申请日 2018.08.30

(71)申请人 河南省农业科学院经济作物研究所

地址 450000 河南省郑州市花园路116号

(72)发明人 张新友 韩锁义 李艺 董文召

苗利娟 杜培 臧秀旺 汤丰收

黄冰艳 郑峥

(74)专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务

所(普通合伙) 61223

代理人 李振瑞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种花生微管骨架免疫抗体标记方法

(57)摘要

本发明属于细胞生物学技术领域,特别涉及一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,包括切取花生组织样本浸泡在微管固定液中进行固定;冷冻切片后依次用甲醇、 NaBH_4 溶液、甘氨酸溶液浸泡去除非特异性荧光;封闭液浸泡后依次用 α 微管蛋白一抗工作液、FITC标记的二抗工作液孵育;加抗荧光淬灭剂后封片保存。本发明率先建立了花生组织水平上的微管骨架免疫标记方法,简单便捷,适用范围广,能准确清洗的观测到花生微管骨架,结果可靠稳定。



1. 一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,包括如下步骤:

材料固定:切取花生组织样本浸泡在微管固定液中,室温6~8h,得固定组织样本;

其中,微管固定液为PEM混合液,其中含50mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸、5mmol/L的乙二醇二乙醚二胺四乙酸、5mmol/L的MgSO₄以及质量浓度分别为0.3%的戊二醛、4%的多聚甲醛、0.01%的TritonX-100及10%的二甲基亚枫;

冷冻切片:在-35~-25℃下将固定组织样本制成切片;

非特异性荧光的去除:包括如下步骤,

S11,用-22~-18℃的甲醇浸泡切片12~18min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

S12,将S11中冲洗后的切片用1mg/mL的NaBH₄溶液浸泡25~35min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

S13,将S12中冲洗后的切片用50mmol/L的甘氨酸溶液浸泡25~35min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

免疫抗体标记并制片:包括如下步骤,

S21,将S13中冲洗后的切片用封闭液浸泡25~35min,然后取出切片用α微管蛋白一抗工作液在25~35℃下孵育1.5~2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6~10min,得一抗切片;

S22,将S21中一抗切片放入FITC标记的二抗工作液中在35~40℃下孵育1.5~2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6~10min,得二抗切片;

S23,在二抗切片上加1~3滴抗荧光淬灭剂,封片。

2. 如权利要求1所述的花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,花生组织样本为花生植株主茎、叶柄或根系的其中一种,且花生主茎的厚度为2~3cm,切取的样本组织长度为4cm。

3. 如权利要求2所述的花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,所述组织样本的切片厚度尺寸如下:主茎为10~15μm,叶柄为22~26μm,根系为37~41μm。

4. 如权利要求1所述的花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,所述漂洗液为pH 7.3的PBS缓冲液。

5. 如权利要求1所述的花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,所述封闭液为体积浓度10%牛血清白蛋白的PBS缓冲液,且pH为7.3。

6. 如权利要求1所述的花生微管骨架免疫抗体标记方法,其特征在于,所述α微管蛋白一抗工作液是由α微管蛋白一抗母液稀释200倍所得;所述FITC标记的二抗工作液是由FITC标记的二抗母液稀释200倍所得;稀释液为pH 7.3的PBS缓冲液。

一种花生微管骨架免疫抗体标记方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学技术领域,特别涉及一种花生微管骨架免疫抗体标记方法。

背景技术

[0002] 花生(*Arachis hypogaea* L.)是我国重要的油料作物之一,其总产居国内油料作物首位,是国产植物油的第二大来源,因此大力发展花生产业具有重要的经济意义和社会意义。目前,花生研究的重点是高产优质抗病品种的培育和配套栽培技术的研发。其中,花生分子生物学理论基础研究和生物技术研究取得了一定的进展,主要集中在花生品质和抗性的遗传改良、利用分子标记技术进行遗传作图构建以及花生重要基因的筛选上。同时,花生二倍体野生种全基因组测序也已经完成。

[0003] 微管是由 α/β 微管蛋白形成的异源二聚体重复聚合而形成的管状结构,是所有真核生物必不可少的结构。微管还存在一些附属蛋白质或其他物质。微管骨架以及附属的微管结合蛋白不仅维持细胞形状,保持细胞内部结构的有序性,而且也参与细胞运动、细胞伸长与分裂、物质运输、能量转换、信息传递、基因表达和细胞分化等生命活动。

[0004] 目前,农作物微管骨架的研究对象主要集中在个别材料的花粉粒等单个细胞上。组织水平上研究微管骨架的变化报道极少。而在花生组织水平上对微管进行有效标记的方法和技术还尚未见报道,从而阻碍了花生相应的生物学研究。

发明内容

[0005] 本发明率先建立了花生组织水平上的微管骨架免疫标记方法,简单便捷,适用范围广,能准确清洗的观测到花生微管骨架,结果可靠稳定。

[0006] 本发明提供了一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,包括如下步骤:

[0007] 材料固定:切取花生组织样本浸泡在微管固定液中,室温6~8h,得固定组织样本;

[0008] 其中,微管固定液为PEM混合液,其中含50mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸、5mmol/L的乙二醇二乙醚二胺四乙酸、5mmol/L的 $MgSO_4$ 以及质量浓度分别为0.3%的戊二醛、4%的多聚甲醛、0.01%的TritonX-100及10%的二甲基亚砜;

[0009] 冷冻切片:在-35~-25℃下将固定组织样本制成切片;

[0010] 非特异性荧光的去除:包括如下步骤,

[0011] S11,用-22~-18℃的甲醇浸泡切片12~18min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

[0012] S12,将S11中冲洗后的切片用1mg/mL的 $NaBH_4$ 溶液浸泡25~35min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

[0013] S13,将S12中冲洗后的切片用50mmol/L的甘氨酸溶液浸泡25~35min,然后用漂洗液冲洗切片8~12min;

[0014] 免疫抗体标记并制片:包括如下步骤,

[0015] S21,将S13中冲洗后的切片用封闭液浸泡25~35min,然后取出切片用 α 微管蛋白一抗工作液在25~35℃下孵育1.5~2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6~10min,得一抗切片;

[0016] S22,将S21中一抗切片放入FITC标记的二抗工作液中在35~40℃下孵育1.5~2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6~10min,得二抗切片;

[0017] S23,在二抗切片上加1~3滴抗荧光淬灭剂,封片。

[0018] 优选的,花生组织样本为花生植株主茎、叶柄或根系的其中一种,且花生主茎的厚度为2~3cm,切取的样本组织长度为4cm。

[0019] 优选的,所述组织样本的切片厚度尺寸如下:主茎为10~15 μ m,叶柄为22~26 μ m,根系为37~41 μ m。

[0020] 优选的,所述漂洗液为pH 7.3的PBS缓冲液。

[0021] 优选的,所述封闭液为体积浓度10%牛血清白蛋白的PBS缓冲液,且pH为7.3。

[0022] 优选的,所述 α 微管蛋白一抗工作液是由 α 微管蛋白一抗母液稀释200倍所得;所述FITC标记的二抗工作液是由FITC标记的二抗母液稀释200倍所得;稀释液为pH 7.3的PBS缓冲液。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0024] (1)率先建立了花生组织水平上的微管骨架免疫标记方法,简单便捷,适用范围广,能准确清洗的观测到花生微管骨架,结果可靠稳定。

[0025] (2)冷冻切片既在破坏了细胞壁,利于微管抗体进入细胞与微管结合,又维持细胞的原有形态,保持了微管的抗原性;甲醇、NaBH₄、甘氨酸处理和抗荧光淬灭剂处理,去除叶绿素和固定液中的残留的醛类物质的干扰,使得荧光信号更强、背景信号更弱、微管骨架更清晰;甲醇还有效地消除油脂干扰。

[0026] (3)本发明方法免去了繁琐且效果不佳的酶解过程,简化了实验步骤,从组织水平上观察微管骨架,研究更为准确,更有代表性,为花生相应的生物学研究提供崭新的方向和素材,同时对别的农作物也具有一定的借鉴价值。

附图说明

[0027] 图1为本发明实例1花生5叶期主茎皮层细胞微管骨架镜像图;

[0028] 图2为本发明实例2花生5叶期叶柄皮层细胞微管骨架镜像图;

[0029] 图3为本发明实例3花生5叶期根系皮层细胞微管骨架镜像图。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图1-3对本发明的几个具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制,实施例中涉及的试剂均能通过公共渠道获得,其中 α 微管蛋白一抗母液、FITC标记的二抗母液、抗荧光淬灭剂均购买于美国Sigma公司。

[0031] 实施例1

[0032] 一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,包括如下步骤:

[0033] (1)材料固定:切取花生植株主茎组织样本,样本厚度为2~3cm,长度为4cm,浸泡在微管固定液中,室温6h,得固定组织样本;

[0034] 其中,微管固定液为PEM混合液,其中含50mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸、5mmol/L的乙二醇二乙醚二胺四乙酸、5mmol/L的MgSO₄以及质量浓度分别为0.3%的戊二醛、4%的多聚甲醛、0.01%的TritonX-100及10%的二甲基亚枫;

[0035] (2) 冷冻切片:在-30℃下用冷冻切片机将固定组织样本制成切片,切片厚度为10~15μm;

[0036] (3) 非特异性荧光的去除(操作环境温度28~30℃):包括如下步骤,

[0037] S11,用-20℃的甲醇浸泡切片15min,然后用漂洗液冲洗切片10min;

[0038] S12,将S11中冲洗后的切片用1mg/mL的NaBH₄溶液浸泡30min,然后用漂洗液冲洗切片10min;

[0039] S13,将S12中冲洗后的切片用50mmol/L的甘氨酸溶液浸泡30min,然后用漂洗液冲洗切片10min;

[0040] (4) 免疫抗体标记并制片:包括如下步骤,

[0041] S21,将S13中冲洗后的切片用封闭液浸泡30min,然后取出切片用α微管蛋白一抗工作液在30℃下孵育2h,再用漂洗液漂洗3次,每次8min,得一抗切片;

[0042] S22,将S21中一抗切片放入FITC标记的二抗工作液中在37℃下孵育2h,再用漂洗液漂洗3次,每次8min,得二抗切片;

[0043] S23,在二抗切片上加1~3滴抗荧光淬灭剂,封片。

[0044] 其中,漂洗液为pH 7.3的PBS缓冲液;封闭液为体积浓度10%牛血清白蛋白的PBS缓冲液,且pH为7.3;α微管蛋白一抗工作液是由α微管蛋白一抗母液稀释200倍所得;FITC标记的二抗工作液是由FITC标记的二抗母液稀释200倍所得;稀释液为pH 7.3的PBS缓冲液。图1为实施例1制备的切片在激光共聚焦显微镜下的微管骨架图。

[0045] 实施例2

[0046] 一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,包括如下步骤:

[0047] (1) 材料固定:切取花生植株叶柄组织样本浸泡在微管固定液中,室温7h,得固定组织样本;

[0048] 其中,微管固定液为PEM混合液,其中含50mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸、5mmol/L的乙二醇二乙醚二胺四乙酸、5mmol/L的MgSO₄以及质量浓度分别为0.3%的戊二醛、4%的多聚甲醛、0.01%的TritonX-100及10%的二甲基亚枫;

[0049] (2) 冷冻切片:在-35℃下用冷冻切片机将固定组织样本制成切片,切片厚度为22~26μm;

[0050] (3) 非特异性荧光的去除(操作环境温度28~30℃):包括如下步骤,

[0051] S11,用-18℃的甲醇浸泡切片12min,然后用漂洗液冲洗切片8min;

[0052] S12,将S11中冲洗后的切片用1mg/mL的NaBH₄溶液浸泡25min,然后用漂洗液冲洗切片8min;

[0053] S13,将S12中冲洗后的切片用50mmol/L的甘氨酸溶液浸泡25min,然后用漂洗液冲洗切片8min;

[0054] (4) 免疫抗体标记并制片:包括如下步骤,

[0055] S21,将S13中冲洗后的切片用封闭液浸泡25min,然后取出切片用α微管蛋白一抗工作液在25℃下孵育2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6min,得一抗切片;

[0056] S22,将S21中一抗切片放入FITC标记的二抗工作液中在35℃下孵育2.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次6min,得二抗切片;

[0057] S23,在二抗切片上加1~3滴抗荧光淬灭剂,封片。

[0058] 其中,漂洗液为pH 7.3的PBS缓冲液;封闭液为体积浓度10%牛血清白蛋白的PBS缓冲液,且pH为7.3; α 微管蛋白一抗工作液是由 α 微管蛋白一抗母液稀释200倍所得;FITC标记的二抗工作液是由FITC标记的二抗母液稀释200倍所得;稀释液为pH 7.3的PBS缓冲液。图2为实施例2制备的切片在激光共聚焦显微镜下的微管骨架图。

[0059] 实施例3

[0060] 一种花生微管骨架免疫抗体标记方法,包括如下步骤:

[0061] (1)材料固定:切取花生植株根系组织样本浸泡在微管固定液中,室温8h,得固定组织样本;

[0062] 其中,微管固定液为PEM混合液,其中含50mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸、5mmol/L的乙二醇二乙醚二胺四乙酸、5mmol/L的MgSO₄以及质量浓度分别为0.3%的戊二醛、4%的多聚甲醛、0.01%的TritonX-100及10%的二甲基亚枫;

[0063] (2)冷冻切片:在-25℃下用冷冻切片机将固定组织样本制成切片,切片厚度为37~41 μ m;

[0064] (3)非特异性荧光的去除(操作环境温度28~30℃):包括如下步骤,

[0065] S11,用-22℃的甲醇浸泡切片18min,然后用漂洗液冲洗切片12min;

[0066] S12,将S11中冲洗后的切片用1mg/mL的NaBH₄溶液浸泡35min,然后用漂洗液冲洗切片12min;

[0067] S13,将S12中冲洗后的切片用50mmol/L的甘氨酸溶液浸泡35min,然后用漂洗液冲洗切片12min;

[0068] (4)免疫抗体标记并制片:包括如下步骤,

[0069] S21,将S13中冲洗后的切片用封闭液浸泡35min,然后取出切片用 α 微管蛋白一抗工作液在35℃下孵育1.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次10min,得一抗切片;

[0070] S22,将S21中一抗切片放入FITC标记的二抗工作液中在40℃下孵育1.5h,再用漂洗液漂洗3次,每次10min,得二抗切片;

[0071] S23,在二抗切片上加1~3滴抗荧光淬灭剂,封片。

[0072] 其中,漂洗液为pH 7.3的PBS缓冲液;封闭液为体积浓度10%牛血清白蛋白的PBS缓冲液,且pH为7.3; α 微管蛋白一抗工作液是由 α 微管蛋白一抗母液稀释200倍所得;FITC标记的二抗工作液是由FITC标记的二抗母液稀释200倍所得;稀释液为pH 7.3的PBS缓冲液。图3为实施例3制备的切片在激光共聚焦显微镜下的微管骨架图。

[0073] 需要说明的是,本发明权利要求书中采用的步骤方法与上述实施例相同,为了防止赘述,本发明的描述了优选的实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例做出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0074] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

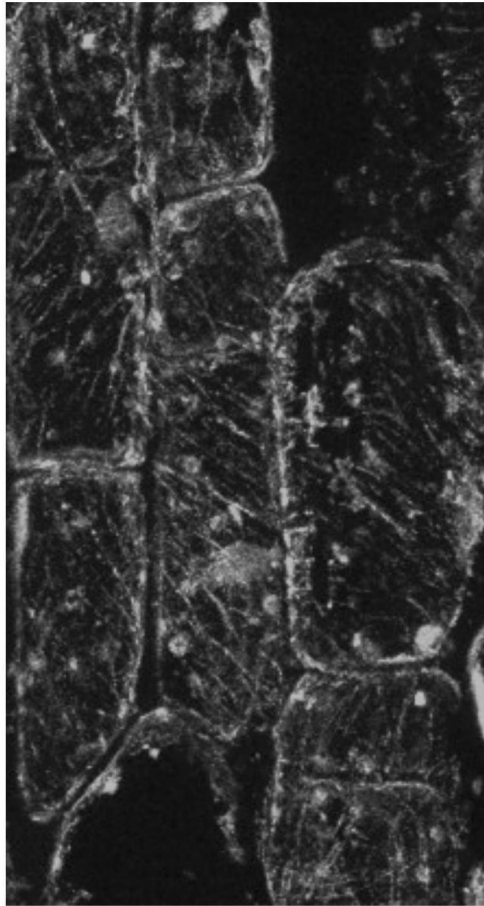


图1

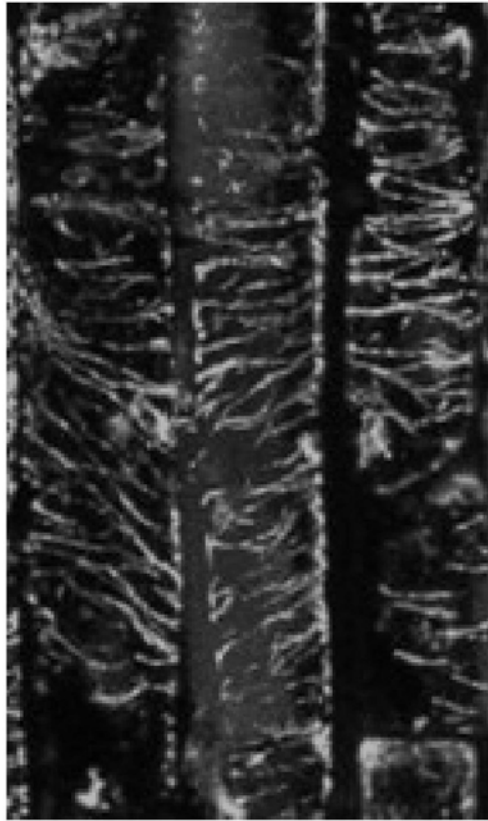


图2

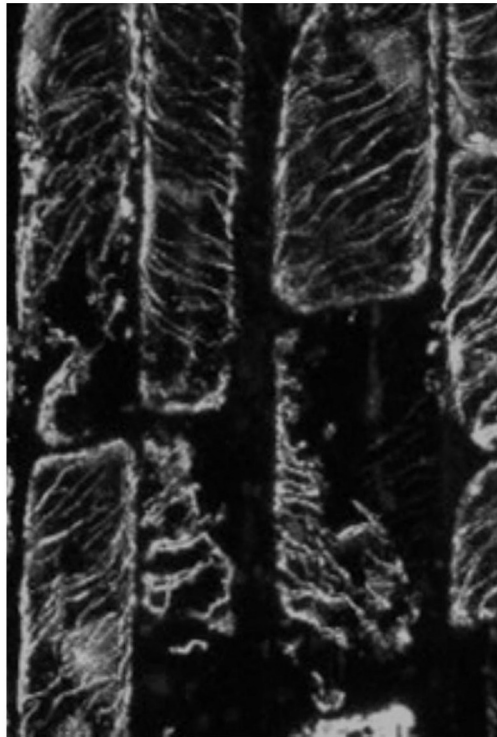


图3

专利名称(译)	一种花生微管骨架免疫抗体标记方法		
公开(公告)号	CN109085337A	公开(公告)日	2018-12-25
申请号	CN201811005717.X	申请日	2018-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
[标]发明人	张新友 韩锁义 李艺 董文召 苗利娟 杜培 臧秀旺 汤丰收 黄冰艳 郑峥		
发明人	张新友 韩锁义 李艺 董文召 苗利娟 杜培 臧秀旺 汤丰收 黄冰艳 郑峥		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	李振瑞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于细胞生物学技术领域，特别涉及一种花生微管骨架免疫抗体标记方法，包括切取花生组织样本浸泡在微管固定液中进行固定；冷冻切片后依次用甲醇、NaBH₄溶液、甘氨酸溶液浸泡浸泡去除非特异性荧光；封闭液浸泡后依次用α微管蛋白一抗工作液、FITC标记的二抗工作液孵育；加抗荧光淬灭剂后封片保存。本发明率先建立了花生组织水平上的微管骨架免疫标记方法，简单便捷，适用范围广，能准确清洗的观测到花生微管骨架，结果可靠稳定。

