



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102692497 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201210191444. 9

(22) 申请日 2012. 06. 11

(71) 申请人 云南农业大学

地址 650201 云南省昆明市北郊黑龙潭云南
农业大学

(72) 发明人 杨静 李成云 朱有勇 刘林
施竹凤

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管
骨架的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用免疫荧光染色处理大豆
根尖观察细胞微管骨架的方法,用免疫荧光染色
方法处理 1-10 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察
根尖皮层细胞微管骨架;方法简便、准确、快速。

1. 一种用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管骨架的方法,其特征在于,用免疫荧光染色方法处理 1-10 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架;所述免疫荧光染色方法处理方法为:将大豆根尖放入固定液抽气 10min,室温固定 1hr;固定完毕后用 PEMT 洗三次,每次 10min;37°C 条件下酶解 1hr;酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min;用 0.1M PBS (pH7.2) 溶液配制 NaBH₄,使其浓度为 1mg/ml,再用配制好的 1mg/ml 的 NaBH₄ 处理大豆根尖 20min;室温用 50mM Gly 封闭 30min;加一抗,4°C 过夜,冲洗一抗:PBS 冲洗三次,每次 10min;加二抗 (1 : 600),37°C、闭光条件下,3hr;冲洗二抗:PBS 冲洗三次,每次 10min;加上抗荧光淬灭剂后,封片。

用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管骨架的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管骨架的方法,具体涉及一种利用免疫荧光染色法处理大豆根尖观察根尖细胞微管骨架的方法,属于植物保护和细胞生物学领域。

背景技术

[0002] 病原菌与其寄主互作被认为是一场军备竞赛,在这场竞赛中,病原菌通过各种策略克服或抑制寄主防御反应,而寄主本身也利用各种策略识别和攻击入侵的病原菌或病原菌效应分子。病原菌与非寄主互作和与寄主互作间的定义差异是病原菌克服一系列障碍成功侵入寄主的能力。植物细胞骨架经常被认为是病原菌侵入寄主的一道障碍之一。细胞骨架在抵御病原菌入侵过程中的重要性可以通过一些例子说明,如大麦、小麦、黄瓜和烟草的肌动蛋白细胞骨架被破坏后能被许多非寄主真菌穿透。病原菌成功侵入寄主通常需要经过 6 道障碍。越来越多的证据表明,细胞骨架参与的是寄主受病原菌侵入时形成的第 3 道障碍,主要是诱导诸如乳突和胼胝质形成、蛋白和碳水化合物积累甚至过敏性细胞死亡等障碍的生成。植物细胞骨架由肌动蛋白纤丝和微管组成、作为胞内物质运输的间接者扮演着至关重要的作用。二十世纪九十年代早期报道了第一例描述植物防御反应中细胞骨架作用的研究,发现当植物受到病原菌侵入时,大量的寄主细胞极理化。在受到病原菌侵入的植物细胞中,观察到细胞质聚集点与细胞核移动方向一致,即都向侵入点移动。Kobayashi 等人利用免疫细胞化学的方法研究非寄主病原豌豆白粉菌 (*Erysiphe pisi*) 侵染大麦时的大麦胚芽鞘细胞微管组织结构时发现,在没有受到病原菌侵染的寄主细胞中,微管沿着细胞的纵轴成横向排列,而在被病原菌侵染的细胞中,微管在侵入点聚集成放射网状。利用同样的免疫荧光技术也在一系列的包括亚麻与亚麻锈菌、大豆与大豆疫病菌、洋葱与葱腐葡萄孢以及大麦与大麦白粉菌在内的寄主与病原菌亲和互作中观察到寄主的微管和肌动纤丝朝着真菌和卵菌侵入点重新分布和排列。大麦胚芽鞘细胞与大麦非致病白粉菌互作相比,大麦胚芽鞘细胞与致病白粉菌的亲互作中微管和肌动蛋白纤丝重新排列的速度明显减缓,同样对其它致病系统的研究也发现了类似结果,明显的证据支持了植物细胞骨架在植物防御反应中的作用,同时也表明亲和病原菌会干扰细胞骨架的重新排列。

发明内容

[0003] 本发明的目的是克服现有技术不足,而提供一种快速、简便、准确地用免疫荧光染色方法观察大豆根尖细胞微管骨架的方法。

[0004] 发明的技术方案是:

[0005] 保持现有免疫荧光染色和观察方法不变,包括荧光抗体种类和用量、所用共聚焦显微镜的激发光和发射光波长范围均与常规相同,用免疫荧光染色方法处理 1-10 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架;所述免疫荧光染色方法处理方法为:将大豆根尖放入固定液抽气 10min,室温固定 1hr;固定完毕后用 PEMT 洗三次,每次

10min ;37℃条件下酶解 1hr ;酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min ;用 0.1M PBS(pH7.2) 溶液配制 NaBH₄,使其浓度为 1mg/ml,再用配制好的 1mg/ml 的 NaBH₄ 处理大豆根尖 20min ;室温用 50mM Gly 封闭 30min ;加一抗,4℃过夜,冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min ;加二抗 (1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr ;冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min ;加上抗荧光淬灭剂后,封片。

[0006] 本发明的有益效果在于 :

[0007] 方法简便、准确、快速。利用免疫荧光染色的方法处理大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架,能直接定性地掌握大豆根尖细胞微管骨架排列方式。免疫荧光染色法直接处理和观察水稻根尖细胞微管骨架排列能有效避免诸如免疫荧光染色处理和观察叶片细胞微管骨架时步骤繁琐且容易受到残留叶绿素的干扰,同时为进一步研究土壤病原菌与植物根组织互作时细胞微管骨架对病原菌响应的观察提供有效简单的方法。

具体实施方式

[0008] 以下结合具体实施例,对本发明进行详细说明。

[0009] 实施例一 :

[0010] 免疫荧光染色法处理 1 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架。

[0011] 具体方法为 :将大豆根尖放入固定液 (4%多聚甲醛,0.1%戊二醛,百分比均为质量百分比,下同) 抽气 10min,室温固定 1hr。固定完毕后用 PEMT(0.05% Triton x-100) 洗三次,每次 10min。37℃条件下酶解 1hr,PEM 配制,1%果胶酶,1.5%纤维素酶,0.4M 甘露醇。酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min。用 0.1M PBS(pH7.2) 溶液配制 NaBH₄,使其浓度为 1mg/ml,(PBS 配制 NaBH₄ 的缓冲液) 再用配制好的 1mg/ml 的 NaBH₄ 处理大豆根尖 20min。室温用 50mM Gly 封闭 30min。加一抗 (β -tubulin 一抗 1 : 800,AtMAP18 一抗 1 : 100),4℃过夜,冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加二抗 (1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr。冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加上抗荧光淬灭剂后,封片。结果在根尖的根冠、分生区和伸长区的皮层细胞都观察到了微管骨架。

[0012] 实施例二 :

[0013] 免疫荧光染色法处理 3 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架。

[0014] 将大豆根尖放入固定液 (4%多聚甲醛 0.1%戊二醛) 抽气 10min,室温固定 1hr。固定完毕后用 PEMT(0.05% Triton x-100) 洗三次,每次 10min。37℃条件下酶解 1hr,PEM 配制 :1%果胶酶,1.5%纤维素酶,0.4M 甘露醇。酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min。用 1mg/ml NaBH₄(PBS 配制) 处理 20min。室温用 50mM Gly 封闭 30min。加一抗 (β -tubulin 一抗 1 : 800,AtMAP18 一抗 1 : 100),4℃过夜冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加二抗 (1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr。冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加上抗荧光淬灭剂后,封片。结果在根尖的根冠、分生区和伸长区的皮层细胞都观察到了微管骨架。

[0015] 实施例三 :

[0016] 免疫荧光染色法处理 5 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架。

[0017] 将大豆根尖放入固定液(4%多聚甲醛 0.1%戊二醛)抽气 10min,室温固定 1hr。固定完毕后用 PEMT(0.05% Triton x-100)洗三次,每次 10min。37℃条件下酶解 1hr,PEM 配制,1%果胶酶,1.5%纤维素酶,0.4M 甘露醇。酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min。用 1mg/ml NaBH₄(PBS 配制)处理 20min。室温用 50mM Gly 封闭 30min。加一抗(β -tubulin 一抗 1 : 800,AtMAP18 一抗 1 : 100),4℃过夜冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加二抗(1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr。冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加上抗荧光淬灭剂后,封片。结果在根尖的根冠、分生区和伸长区的皮层细胞都观察到了微管骨架。

[0018] 实施例四 :

[0019] 免疫荧光染色法处理 7 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架。

[0020] 将大豆根尖放入固定液(4%多聚甲醛 0.1%戊二醛)抽气 10min,室温固定 1hr。固定完毕后用 PEMT(0.05% Triton x-100)洗三次,每次 10min。37℃条件下酶解 1hr PEM 配制,1%果胶酶,1.5%纤维素酶,0.4M 甘露醇。酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min。用 1mg/ml NaBH₄(PBS 配制)处理 20min。室温用 50mM Gly 封闭 30min。加一抗(β -tubulin 一抗 1 : 800,AtMAP18 一抗 1 : 100),4℃过夜冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加二抗(1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr。冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加上抗荧光淬灭剂后,封片。结果在根尖的根冠、分生区和伸长区的皮层细胞都观察到了微管骨架。

[0021] 实施例五 :

[0022] 免疫荧光染色法处理 10 天的大豆根尖,共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架。

[0023] 将大豆根尖放入固定液(4%多聚甲醛 0.1%戊二醛)抽气 10min,室温固定 1hr。固定完毕后用 PEMT(0.05% Triton x-100)洗三次,每次 10min。37℃条件下酶解 1hr PEM 配制,1%果胶酶,1.5%纤维素酶,0.4M 甘露醇。酶解后 PEM 冲洗三次,每次 10min。用 1mg/ml NaBH₄(PBS 配制)处理 20min。室温用 50mM Gly 封闭 30min。加一抗(β -tubulin 一抗 1 : 800,AtMAP18 一抗 1 : 100),4℃过夜冲洗一抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加二抗(1 : 600),37℃、闭光条件下,3hr。冲洗二抗 :PBS 冲洗三次,每次 10min。加上抗荧光淬灭剂后,封片。结果在根尖的根冠、分生区和伸长区的皮层细胞都观察到了微管骨架。

[0024] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

专利名称(译)	用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管骨架的方法		
公开(公告)号	CN102692497A	公开(公告)日	2012-09-26
申请号	CN201210191444.9	申请日	2012-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
[标]发明人	杨静 李成云 朱有勇 刘林 施竹凤		
发明人	杨静 李成云 朱有勇 刘林 施竹凤		
IPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用免疫荧光染色处理大豆根尖观察细胞微管骨架的方法，用免疫荧光染色方法处理1-10天的大豆根尖，共聚焦显微镜观察根尖皮层细胞微管骨架；方法简便、准确、快速。