

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710117755.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

[43] 公开日 2007年11月21日

[11] 公开号 CN 101074952A

[22] 申请日 2007.6.22

[21] 申请号 200710117755.X

[71] 申请人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20号
中科院植物所

[72] 发明人 林金星 王晓华 盛仙永

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用。该方法包括以下步骤：1) 将裸子植物花粉管用浓度为3-5g多聚甲醛/100ml 40-60mM Pipes 缓冲液的固定液固定40-60min；2) 洗涤花粉管；3) 将花粉管置于浓度为0.5-1.2g 果胶酶和纤维素酶/100ml 水的酶溶液中，在20-30℃下酶解30-40min；4) 洗涤花粉管；5) 将花粉管置于体积/体积百分比浓度为0.5-1%的Triton X-100 中渗透1-3h；6) 洗涤花粉管；7) 加入作为一抗的抗 β -tubulin 单克隆抗体孵育1-3h；8) 洗涤花粉管；9) 加入与一抗特异结合的荧光标记的二抗避光孵育1-3h，微管骨架被免疫荧光标记。本发明将在裸子植物花粉管细胞骨架的研究中发挥重要作用，实际应用价值高。

1、一种对裸子植物花粉管微管骨架进行免疫荧光标记的方法，包括以下步骤：

- 1) 将裸子植物花粉管用浓度为 3-5g 多聚甲醛/100ml 40-60mM Pipes 缓冲液的固定液固定 40-60min；
- 2) 洗涤花粉管；
- 3) 将花粉管置于浓度为 0.5-1.2g 果胶酶和纤维素酶/100ml 水的酶溶液中，在 20-30℃ 下酶解 30-40min；
- 4) 洗涤花粉管；
- 5) 将花粉管置于体积/体积百分比浓度为 0.5-1% 的 Triton X-100 中渗透 1-3h；
- 6) 洗涤花粉管；
- 7) 加入作为一抗的抗 β -tubulin 单克隆抗体孵育 1-3h；
- 8) 洗涤花粉管；
- 9) 加入与一抗特异结合的荧光标记的二抗避光孵育 1-3h，微管骨架被免疫荧光标记。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中的固定液的浓度为 4g 多聚甲醛/100ml 40-60mM Pipes 缓冲液，固定时间为 60min。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 3) 中果胶酶和纤维素酶液的浓度为 1g 果胶酶和纤维素酶/100ml 水；所述果胶酶和纤维素酶液中的果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 1: 0.5-2；酶解温度为 25℃，酶解时间为 40min。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 5) 中的渗透剂为 1% 的 Triton X-100，渗透时间为 1.5h。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 7) 中的抗 β -tubulin 单克隆抗体为 Sigma 公司的抗 β -tubulin 的单克隆抗体；所述抗 β -tubulin 单克隆抗体溶液的工作浓度为 1: 50-150 比例的稀释液。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 9) 中二抗的荧光标记为 FITC 标记、TRITC 标记、Alexa 488、Cy2、Cy3、Rhodamine B 或 Texas Red 标记；所述二抗溶液的工作浓度为 1: 50-150 比例的稀释液；所述孵育时间为 1h。

7、根据权利要求 1-6 中任意一项所述的方法，其特征在于：所述步骤 2)、步骤 4)、步骤 6) 和步骤 8) 中的洗涤液均为 40-60mM Pipes 缓冲液。

8、根据权利要求 1-6 中任意一项所述的方法，其特征在于：所述裸子植物为松杉纲、银杏纲或苏铁纲植物；所述松杉纲植物为松科的白杆、青杆、油松、云杉或冷杉。

杉；所述银杏纲植物为银杏；所述苏铁纲植物为苏铁。

9、一种对裸子植物花粉管微管骨架进行显微镜观测的方法，是先用权利要求 1-7 所述的任一项方法对裸子植物花粉管微管骨架荧光标记，然后滴加含质量百分含量 0.15-0.25% 抗荧光淬灭剂的浓度为 40-60% 的甘油，封片，最后用激光共聚焦显微镜对花粉管微管骨架进行观测。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述抗荧光淬灭剂为 Propyl gallate、Vectashield 或 Fenyleen diamine。

裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用

技术领域

本发明涉及植物生物技术领域中花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用，特别是涉及一种对裸子植物花粉管微管骨架进行免疫荧光标记的方法以及用该方法对裸子植物花粉管微管骨架进行显微镜观测中的应用。

背景技术

花粉管作为有花植物受精过程中雄性生殖单位的载体，具有典型的顶端生长特性，因而成为生物技术领域中研究细胞极性生长的理想模式系统。此外，花粉管系统对细胞间的相互作用研究以及信号传导研究也具有重要意义。细胞骨架是花粉管的基本组织结构，参与细胞形态建成、极性维持、细胞器及囊泡运动等重要的生理过程，特别是存在于花粉管顶端区域的微管，对花粉管内细胞器转运以及维持花粉管形态和结构具有极其重要的调节功能。

对于花粉管中微管骨架的分布至今仍然存在争议。目前，花粉管微管骨架的荧光标记方法主要有固定细胞荧光标记法、转基因荧光标记法以及显微注射荧光标记法等。迄今为止，对裸子植物花粉粒与花粉管中微管骨架进行标记的有效方法和技术还未见报道，从而导致与裸子植物相关的生物学研究相对被子植物而言比较滞后。

发明内容

本发明的目的是提供一种较快速、有效的裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法。

为解决上述技术问题，本发明采取以下技术方案：一种对裸子植物花粉管微管骨架进行免疫荧光标记的方法，包括以下步骤：

- 1) 将裸子植物花粉管用浓度为 3-5g 多聚甲醛/100ml 40-60mM Pipes 缓冲液的固定液固定 40-60min；
- 2) 洗涤花粉管；
- 3) 将花粉管置于浓度为 0.5-1g 果胶酶和纤维素酶/100ml 水的酶溶液中，在 20-30℃ 下酶解 30-40min；
- 4) 洗涤花粉管；
- 5) 将花粉管置于体积/体积百分比浓度为 0.5-1% 的 Triton X-100 中渗透 1-3h；
- 6) 洗涤花粉管；

- 7) 加入作为一抗的抗 β -tubulin 单克隆抗体孵育 1-3h;
- 8) 洗涤花粉管;
- 9) 加入与一抗特异结合的荧光标记的二抗避光孵育 1-3h, 微管骨架被免疫荧光标记。

在上述荧光标记方法中, 步骤 1) 中的 40-60mM Pipes 缓冲液的配方为: 每升水含 40-60mM PIPES, 2mM $MgCl_2$, 5mM EGTA, pH 6.8-7.0 (优选为 6.9)。

步骤 1) 中的固定液优选浓度为 4g 多聚甲醛/100ml 40-60mM Pipes 缓冲液, 固定时间优选为 60min。

步骤 3) 中果胶酶和纤维素酶液的浓度优选为 1g 果胶酶和纤维素酶/100ml 水; 所述果胶酶和纤维素酶液中的果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 1: 0.5-2; 酶解温度及酶解时间可根据所用酶的性质进行选择, 酶解温度优选为 25 $^{\circ}C$, 酶解时间优选为 40min。所用果胶酶和纤维素酶均可选择市售产品。

步骤 5) 中的渗透剂优选为 1% 的 Triton X-100, 渗透时间优选为 1.5h。

步骤 7) 中的抗 β -tubulin 单克隆抗体可为市售的各种抗 β -tubulin 的单克隆抗体, 尤以 Sigma 公司 (USA) 的效果最佳; 所述抗 β -tubulin 单克隆抗体溶液的工作浓度一般为 1: 50-150 比例的稀释液, 优选为 1: 100 的稀释液; 所述孵育时间优选为 3h。

步骤 9) 中的二抗可为市售的各种与步骤 7) 中所述一抗特异结合的经荧光标记的二抗, 如 Sigma 公司 (USA) 出售的产品, 所述荧光标记可为 FITC 标记、TRITC 标记、Alexa 488、Cy2、Cy3、Rhodamine B 或 Texas Red 等; 所述二抗溶液的工作浓度一般为 1: 50-150 比例的稀释液, 优选为 1: 100 比例的稀释液; 所述孵育时间优选为 1h。

步骤 2)、步骤 4)、步骤 6) 和步骤 8) 中的洗涤液均为 40-60mM Pipes 缓冲液, 优选为 50mM Pipes 缓冲液。

上述荧光标记方法特别适用于松杉纲、银杏纲以及苏铁纲的裸子植物; 所述松杉纲中包括白杆、青杆、油松、云杉或冷杉等松科裸子植物; 所述银杏纲的代表植物为银杏; 苏铁纲的代表植物为苏铁。

所述的任一项方法对裸子植物花粉管微管骨架荧光标记, 然后滴加含质量百分含量 0.15-0.25% 抗荧光淬灭剂的浓度为 40-60% 的甘油, 封片, 最后用激光共聚焦显微镜对花粉管微管骨架进行观测。

本发明的第二个目的是提供一种对裸子植物花粉管微管骨架进行显微镜观测的方法。

本发明所提供的对裸子植物花粉管微管骨架进行显微镜观测的方法，是先用上述方法对裸子植物花粉管微管骨架荧光标记，然后滴加含 0.15-0.25% (W/W) 抗荧光淬灭剂的 40-60% (V/V) 甘油，封片，用激光共聚焦显微镜进行观测，可清晰地观测到花粉管的微管骨架。

所述抗荧光淬灭剂的选择是多种多样的，如 Propyl gallate、Vectashield 或 Fenyleen diamine 等。

本发明提供了一种对裸子植物花粉管微管骨架进行免疫荧光标记的方法。本发明的标记方法具有以下优点：1) 操作简单，快速：省略了常规标记方法中 BSA 的封闭步骤；2) 标记效果好：可在激光共聚焦显微镜下清晰地观测到花粉管呈网络状排布的微管骨架；3) 标记后材料可稳定保存：免疫荧光标记的材料封片后在 4℃ 避光条件下可保存 2 周以上。本发明将在裸子植物花粉管细胞骨架的研究中发挥重要作用，实际应用价值高。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

图 1 为在激光共聚焦显微镜下观察到的白杆花粉管微管骨架的分布状态

图 2 为在激光共聚焦显微镜下观察到的青杆花粉管微管骨架的分布状态

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法，所述百分比浓度如无特别说明均为质量/体积 (W/W) 百分比浓度或体积/体积 (V/V) 百分比浓度。

实施例 1、白杆花粉管微管骨架的免疫荧光标记及其显微镜观测

用本发明的方法对白杆花粉管微管骨架进行免疫荧光标记，包括以下步骤：

1) 收集待标记的白杆花粉管样品，在新鲜配制的含 4% (g/ml) 多聚甲醛的 50mM Pipes 缓冲液（每升水含 50mM PIPES, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, pH 6.9）中快速抽气固定 60min，缓冲液的用量以浸泡过花粉管样品为准；

2) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min，以去除残余的多聚甲醛；

3) 将花粉管置于 1g/100ml 的果胶酶（购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g）和纤维素酶（购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g）液中以 25℃ 下酶解 35min，其中，果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 1: 1；酶液的用量以浸泡过花粉管样品为准；

4) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min；

5) 将花粉管置于 1% (V/V) Triton X-100 中渗透 1.5h，Triton X-100 的用量以浸泡过花粉管样品为准；

6) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min；

7) 加入单克隆一抗, 抗 β -tubulin 抗体(购自 Sigma, 按 1: 100 的比例稀释), 添加量为 2-4 μ g/mL (以浸泡过花粉管样品为准), 在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 3h;

8) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10min;

9) 加入连接 FITC 的二抗一羊抗小鼠 IgG (购自 Sigma, 按 1: 100 的比例稀释), 添加量以浸泡过花粉管样品为准, 在 25 $^{\circ}$ C 下避光孵育 1h, 微管骨架被免疫荧光标记。

然后, 将经免疫荧光标记的微管骨架用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次, 再向经过荧光标记的花粉管样品中滴入含 0.2% (V/V) Propyl gallate (Sigma 公司, USA) 的 50% (V/V) 甘油, 用指甲油封片, 最后在激光共聚焦显微镜 (ZEISS, LSM 510, Ar/Kr 激光, 激光波长 514nm) 下进行观测, 沿 Z 轴进行连续光学切片, 并将所有光学切片进行三维重构, 观测结果如图 1 所示, 用本发明的方法对白杆花粉管微管骨架进行免疫荧光标记后可在激光共聚焦显微镜下清晰地观测到微管骨架在花粉管中的分布状况。

实施例 2、青杆花粉管微管骨架的荧光标记及其显微镜观测

用本发明的方法对青杆花粉管微管骨架进行免疫荧光标记, 包括以下步骤:

1) 收集待标记的青杆花粉管样品, 在新鲜配制的含 3% (g/ml) 多聚甲醛的 60mM Pipes 缓冲液 (每升水含 60mM PIPES, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, pH 6.9) 中快速抽气固定 60min, 缓冲液的用量以浸泡过花粉管样品为准;

2) 用 40mM Pipes 缓冲液洗涤 4 次, 每次 5min, 以去除残余的多聚甲醛;

3) 将花粉管置于 1g/100ml 的果胶酶 (购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g) 和纤维素酶 (购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g) 液中在 30 $^{\circ}$ C 下酶解 30min, 其中, 果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 2: 1; 酶液的用量以浸泡过花粉管样品为准;

4) 用 60mM Pipes 缓冲液洗涤 4 次, 每次 5min;

5) 将花粉管置于 1% (V/V) Triton X-100 中渗透 1h, Triton X-100 的用量以浸泡过花粉管样品为准;

6) 用 40mM Pipes 缓冲液洗涤 4 次, 每次 5min;

7) 加入单克隆一抗, 抗 β -tubulin 抗体(购自 Sigma, 按 1: 150 的比例稀释), 添加量为 2-4 μ g/mL (用量以浸泡过花粉管样品为准), 在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 3h;

8) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10min;

9) 加入连接 FITC 的二抗一羊抗小鼠 IgG (购自 Sigma, 按 1: 50 的比例稀释, 用量以浸泡过花粉管样品为准), 在 25 $^{\circ}$ C 下避光孵育 1h, 微管骨架被免疫荧光标记。

然后, 将经免疫荧光标记的微管骨架用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 4 次, 每次 5min,

再向经过荧光标记的花粉管样品中滴入含 0.25% (V/V) Vectashield (购自 Sigma 公司) 的 40% (V/V) 甘油, 用指甲油封片, 最后在激光共聚焦显微镜 (ZEISS, LSM 510, Ar/Kr 激光, 激光波长 514nm) 下进行观测, 沿 Z 轴进行连续光学切片, 并将所有光学切片进行三维重构, 观测结果如图 2 所示, 用本发明的方法对青杆花粉管微管骨架进行免疫荧光标记后可在激光共聚焦显微镜下清晰地观测到微管骨架在花粉管中的分布状况。

实施例 3、油松花粉管微管骨架的荧光标记及其显微镜观测

用本发明的方法对油松花粉管微管骨架进行免疫荧光标记, 包括以下步骤:

- 1) 收集待标记的油松花粉管样品, 在新鲜配制的含 5% (g/ml) 多聚甲醛的 40mM Pipes 缓冲液 (每升水含 40mM PIPES, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, pH 6.9) 中快速抽气固定 50min, 缓冲液的用量以浸泡过花粉管样品为准;
- 2) 用 60mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次, 每次 15min, 以去除残余的多聚甲醛;
- 3) 将花粉管置于 0.5% (W/W) 的果胶酶 (购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g) 和纤维素酶 (购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g) 液在 25°C 下酶解 40min, 其中, 果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 1: 2, 用量以浸泡过花粉管样品为准;
- 4) 用 40mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次, 每次 15min;
- 5) 将花粉管置于 0.5% (V/V) Triton X-100 中渗透 3h, Triton X-100 的用量以浸泡过花粉管样品为准;
- 6) 用 60mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次, 每次 15min;
- 7) 加入单克隆一抗, 抗 β -tubulin 抗体 (购自 Sigma, 按 1: 50 的比例稀释), 添加量为 2-4 μ g/mL (用量以浸泡过花粉管样品为准), 在 25°C 下孵育 1h;
- 8) 用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次, 每次 15min;
- 9) 加入 Alexa 488 标记的二抗一羊抗小鼠 IgG (购自 Sigma, 按 1: 150 的比例稀释, 用量以浸泡过花粉管样品为准), 在 25°C 下避光孵育 3h, 微管骨架被免疫荧光标记。

然后, 将经免疫荧光标记的微管骨架用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次, 每次 15min, 再向经过荧光标记的花粉管样品中滴入含 0.15% (V/V) Fenyleen diamine (购自 Sigma 公司) 的 60% (V/V) 甘油, 用指甲油封片, 最后在激光共聚焦显微镜 (ZEISS, LSM 510, Ar/Kr 激光, 激光波长 488nm) 下进行观测, 沿 Z 轴进行连续光学切片, 并将所有光学切片进行三维重构。结果在激光共聚焦显微镜下可清晰地观测到油松微管骨架在花粉管中的分布状况, 证明本发明的免疫荧光标记方法可用于花粉管微管骨架的显微镜

测。

实施例 4、银杏花粉管微管骨架的荧光标记及其显微镜观测

用本发明的方法对银杏花粉管微管骨架进行免疫荧光标记，包括以下步骤：

1) 收集待标记的银杏花粉管样品，在新鲜配制的含 4% (g/ml) 多聚甲醛的 50mM Pipes 缓冲液（每升水含 50mM PIPES, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, pH 6.9）中快速抽气固定 40min，缓冲液的用量以浸泡过花粉管样品为准；

2) 用 35mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min，以去除残余的多聚甲醛；

3) 将花粉管置于 1.2% (W/W) 的果胶酶（购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g）和纤维素酶（购自 Yakult Honsha Co. Ltd, 3000U/g）液中在 25℃ 下酶解 35min，其中，果胶酶和纤维素酶的重量份数比为 1: 0.5，酶液用量以浸泡过花粉管样品为准；

4) 用 35mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 15min；

5) 将花粉管置于 0.8% (V/V) Triton X-100 中渗透 2h，用量以浸泡过花粉管样品为准；

6) 用 45mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次，每次 15min；

7) 加入单克隆一抗，抗 β -tubulin 抗体（购自 Sigma，按 1: 100 的比例稀释），添加量为 2-4 μ g/mL（用量以浸泡过花粉管样品为准），在 25℃ 下孵育 2h；

8) 用 45mM Pipes 缓冲液洗涤 2 次，每次 15min；

9) 加入 TRITC 标记的二抗一羊抗小鼠 IgG（购自 Sigma，按 1: 100 的比例稀释，用量以浸泡过花粉管样品为准），在 25℃ 下避光孵育 2h，微管骨架被免疫荧光标记。

然后，将经免疫荧光标记的微管骨架用 50mM Pipes 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min，再向经过荧光标记的花粉管样品中滴入含 0.2% (V/V) Propyl gallate（购自 Sigma 公司）的 50% (V/V) 甘油，用指甲油封片，最后在激光共聚焦显微镜（ZEISS, LSM 510, Ar/Kr 激光，激光波长 543nm）下进行观测，沿 Z 轴进行连续光学切片，并将所有光学切片进行三维重构。结果在激光共聚焦显微镜下可清晰地观测到银杏微管骨架在花粉管中的分布状况，证明本发明的免疫荧光标记方法可用于花粉管微管骨架的显微镜观测。



图 1



图 2

专利名称(译)	裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用		
公开(公告)号	CN101074952A	公开(公告)日	2007-11-21
申请号	CN200710117755.X	申请日	2007-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院植物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院植物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院植物研究所		
[标]发明人	林金星 王晓华 盛仙永		
发明人	林金星 王晓华 盛仙永		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N21/84		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种裸子植物花粉管微管骨架的免疫荧光标记方法及其应用。该方法包括以下步骤：1)将裸子植物花粉管用浓度为3 - 5g多聚甲醛/100ml 40 - 60mM Pipes缓冲液的固定液固定40 - 60min；2)洗涤花粉管；3)将花粉管置于浓度为0.5 - 1.2g果胶酶和纤维素酶/100ml水的酶溶液中，在20 - 30°C下酶解30 - 40min；4)洗涤花粉管；5)将花粉管置于体积/体积百分比浓度为0.5 - 1%的Triton X - 100中渗透1 - 3h；6)洗涤花粉管；7)加入作为一抗的抗 β - tubulin单克隆抗体孵育1 - 3h；8)洗涤花粉管；9)加入与一抗特异结合的荧光标记的二抗避光孵育1 - 3h，微管骨架被免疫荧光标记。本发明将在裸子植物花粉管细胞骨架的研究中发挥重要作用，实际应用价值高。



图 1