



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101782573 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 201010031327.7

*G01N 33/577*(2006.01)

(22) 申请日 2010.01.11

(71) 申请人 天津师范大学

地址 300387 天津市西青区宾水西道 393 号

(72) 发明人 刘东华 张慧敏 张闪闪 秦蓉

(74) 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司 12207

代理人 朱红星

(51) Int. Cl.

*G01N 33/53*(2006.01)

*G01N 21/64*(2006.01)

*G01N 1/28*(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

检测重金属胁迫下核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法。它是切取重金属处理后的植物根尖分生组织细胞,于 4% 多聚甲醛中固定 1h;采用酶液酶解后;用滴管吸取约 0.1ml 样品液,均匀涂于载玻片上分散成单个细胞,标记后自然风干,放在 1% TritonX-100 浸泡 15 分钟;然后滴入 15  $\mu$ l 配好的一抗,盖上盖玻片,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h;再滴入 15  $\mu$ l 配好的二抗,处理后滴加 15  $\mu$ l DAPI,最后滴加 5  $\mu$ l 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1h 后在荧光显微镜下观察。本发明的检测方法具有特异性高、实验结果准确,大大提高了观察细胞数目等特点。该方法为探讨重金属毒害细胞机理提供了精确的检测方法,其检测方法具有广阔的应用前景。

1. 一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其特征在于,按如下的步骤进行:

(1) 切取重金属处理后的植物根尖分生组织细胞,于 4%多聚甲醛中固定 1-2h;经 PBS 缓冲液洗;

(2) 采用 2.5%纤维素酶 +2.5%果胶酶酶液于 37°C温箱酶解;经 PBS 缓冲液洗涤后压片;

(3) 将植物根尖转至离心管中,滴加 PBS 缓冲液,手摇震荡至多数细胞游离状态,用滴管吸取约 0.1-0.2ml 样品液,均匀涂于载玻片上分散成单个细胞,标记后自然风干后备用;

(4) 将 (3) 得到的载玻片放在 1% TritonX-100 浸泡 15-20 分钟;经 PBS 缓冲液洗涤;

(5) 在 (4) 得到的载片上滴入 15-20  $\mu$ l 配好的一抗,盖上盖玻片,37°C 温箱孵育 1h-1.5h;再经 PBS 缓冲液洗涤;

(6) 再将 (5) 得到的载片上滴入 15-20  $\mu$ l 配好的二抗,盖上盖玻片,37°C 温箱孵育 45min-1h;经 PBS 缓冲液洗涤;

(7) 再将 (6) 的载玻片上滴加 15-20  $\mu$ l DAPI,盖上盖玻片;经 PBS 缓冲液洗涤;

(8) 用滤纸吸干多余 PBS,滴加 5-10  $\mu$ l 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1-2h 后在荧光显微镜下观察。

2. 权利要求 1 所述的检测方法,其中步骤 (2) 中酶解所用时间是指:在镜检时如果观察到大部分细胞均分散开,成一层球形原生质体,其中少量细胞的细胞质已经解体,只剩下细胞核时,即结束酶解。

3. 权利要求 1 所述的检测方法,其中步骤 (2) 中所述的压片是指:酶解后直接将样品制成悬浮液状态,然后,均匀地滴在载玻片上,不盖盖玻片,自然风干后备用。

4. 权利要求 1 所述的检测方法,其中所述的 PBS 缓冲液洗是指采用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 10-15 分钟。

5. 权利要求 1 所述的检测方法,其中的一抗为:鼠抗 C23 单克隆抗体,其浓度为 0.2mg/ml。

6. 权利要求 1 所述的检测方法,其中的二抗为:TRITC-山羊抗鼠 IgG 其浓度为 1.5mg/ml。

7. 权利要求 1 所述的检测方法,其中 DAPI 的浓度为 1  $\mu$ g/ml。

8. 权利要求 1 所述的检测方法,其中的防淬灭剂为 10 $\times$ 1ml。

9. 权利要求 1 所述的检测方法,其中的重金属为 Al、As、Cd、Co、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni、Pb 或 Zn。

10. 权利要求 1 所述的检测方法,其中所述的植物细胞包括蚕豆、洋葱、大蒜、或玉米。

## 检测重金属胁迫下核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学技术领域,涉及一种快速检测重金属胁迫下核仁蛋白质变化的定位方法。更具体的说是一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法。该方法为研究重金属毒害植物细胞机理提供新的技术支持。

### 技术背景

[0002] 随着近代工业的发展,由此引发的环境污染问题日益突出。加之化肥和农药的不合理施用,“三废”和城市生活垃圾的排放,加快重金属(As、Cd、Co、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni、Pb、Zn 等)的污染物通过各种途径进入环境,并且通过食物链危害动物和人体健康,导致大气和水环境质量的进一步恶化。目前,全球性的重金属污染状况日益严重,如何控制和减轻重金属对环境的污染和危害,已成为环境、土壤及相关学科科学家们关注的热点课题。一些研究表明了低浓度重金属对植物的生长有积极的刺激作用,但当环境中重金属浓度过高,则对植物的生长产生毒害作用,引发植物生理、生化的变化;抑制植物对营养元素的吸收;损伤细胞结构;影响植物正常生长代谢。

[0003] 核仁(nucleolus)是真核细胞间期核内高度紧密的结构,它是 rDNA 转录和核糖体亚基组装的场所。核仁不仅是细胞内通讯和核糖体 RNA 加工的中心,随着细胞周期对细胞增殖和衰老起重要的调控作用;一般来说,核仁的化学成分主要由 DNA、RNA、蛋白质和酶类等组成。其中以蛋白质占干重的 80%。RNA 约占干重的 10%,多与蛋白质结合,以核蛋白的形式存在。利用蛋白质组学方法已鉴定了 350 中核仁蛋白,这些蛋白质与核仁的功能密切相关。从生理生化、分子和细胞生物学手段,研究重金属对核仁蛋白质合成、分布及功能的影响,已引起相关领域科学家的关注。

[0004] 本发明人利用此技术研究了不同重金属(Al、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni、Pb、Zn)胁迫对蚕豆、大蒜、洋葱及玉米等植物幼苗根尖细胞核仁的影响,这些研究结果表明:重金属胁迫能够损伤核仁结构,导致核仁中银染蛋白物质外溢到细胞质中。其他学者如李晓玲、张义贤,用不同浓度氯化镍处理绿豆和大麦,通过银染的方法也观察到 Ni<sup>2+</sup> 能够诱导绿豆和大麦根尖细胞核仁银染蛋白颗粒数量明显增加。因此,利用银染技术研究对重金属对植物细胞核仁结构的影响,具有一定的科学价值。但是,银染技术只能鉴定重金属胁迫后,从细胞核外溢到细胞质中的银染颗粒是核仁蛋白,不能鉴定是哪些种核仁蛋白受到重金属胁迫的影响,对深入研究重金属毒害机理有一定的局限性。

[0005] 近些年来,荧光免疫分析技术的发展尤为迅速,已在生命科学领域中广泛地用于测定生长因子、蛋白质定位、核酸分析、神经递质等方面研究。核仁蛋白 C23 是真核细胞核仁的重要的蛋白组份之一,在调控核糖体的生物合成与成熟,细胞增殖、生长、胚胎发生、胞质分裂、染色质复制与核仁的发生等过程发挥重要作用。但是,利用免疫荧光技术研究重金属胁迫对核仁周期过程中 C23 蛋白质的功能和动态变化的影响尚未见相关文献的报道。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,为研究逆境胁迫下细胞中蛋白质定位及变化特征提供了简易、准确、快速的方法。

[0007] 本发明人结合实验室前期工作,发明了一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法。该技术的主要原理是将免疫学方法(抗原抗体特异结合)与荧光标记技术结合起来,研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。由于荧光素所发的荧光可在荧光显微镜下检出,从而确定抗原或抗体的性质、定位,以及利用定量技术测定含量。特别是本发明涉及的压片方法的改革,能够提高观察细胞数目,可适用于其它细胞生物学研究。为达到上述目的,本发明提供如下的技术方案:

[0008] 一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其特征在于,按如下的步骤进行:

[0009] (1) 切取重金属处理后的植物根尖分生组织细胞,于 4% 多聚甲醛中固定 1-2h;经 PBS 缓冲液洗;

[0010] (2) 采用 2.5% 纤维素酶 + 2.5% 果胶酶酶液于 37°C 温箱酶解;经 PBS 缓冲液洗涤后压片;

[0011] (3) 将植物根尖转至离心管中,滴加 PBS 缓冲液,手摇震荡至多数细胞游离状态,用滴管吸取约 0.1-0.2ml 样品液,均匀涂于载玻片上分散成单个细胞,标记后自然风干后备用;

[0012] (4) 将 (3) 得到的载玻片放在 1% TritonX-100 浸泡 15-20 分钟;经 PBS 缓冲液洗涤;

[0013] (5) 在 (4) 得到的载片上滴入 15-20  $\mu$ l 配好的一抗,盖上盖玻片,37°C 温箱孵育 1h-1.5h;再经 PBS 缓冲液洗涤;

[0014] (6) 再将 (5) 得到的载片上滴入 15-20  $\mu$ l 配好的二抗,盖上盖玻片,37°C 温箱孵育 45min-1h;经 PBS 缓冲液洗涤;

[0015] (7) 再将 (6) 的载玻片上滴加 15-20  $\mu$ l DAPI,盖上盖玻片;经 PBS 缓冲液洗涤;

[0016] (8) 用滤纸吸干多余 PBS,滴加 5-10  $\mu$ l 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1-2h 后在荧光显微镜下观察。

[0017] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其中步骤 (2) 中酶解所用时间是指:在镜检时如果观察到大部分细胞均分散开,成一层球形原生质体,其中少量细胞的细胞质已经解体,只剩下细胞核时,即结束酶解。

[0018] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其中步骤 (2) 中所述的压片是指:酶解后直接将样品制成悬浮液状态,然后,均匀地滴在载玻片上,不盖盖玻片,自然风干后备用。

[0019] 本发明所述的 PBS 缓冲液洗是指采用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 10-15 分钟。

[0020] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其中的一抗为:鼠抗 C23 单克隆抗体,其浓度为 0.2mg/ml。二抗为:TRITC-山羊抗鼠 IgG 其浓度为 1.5mg/ml。

[0021] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,其中 DAPI (4,6-二胺-2-苯基吡啶-二盐酸) 的浓度为 1  $\mu$ g/ml。

[0022] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法, 其中的 1% Triton X-100 为聚乙二醇辛基苯基醚 (曲拉通)。

[0023] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法, 其中的防淬灭剂为  $10 \times 1\text{ml}$ 。

[0024] 本发明所述的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法, 其中的重金属为 Al、As、Cd、Co、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni、Pb 或 Zn。优选 As、Cd、Co、Al、Cr、Cu、Hg, 特别优选 Al、Cd 和 Pb。

[0025] 本发明的检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法, 其中所述的植物细胞包括: 蚕豆、洋葱、玉米和洋葱根尖细胞中核仁 C23 蛋白质的变化。

[0026] 本发明酶解所需的时间, 要根据样品酶解的具体情况而定。根据本发明人的经验, 在镜检时观察到大部分细胞均分散开, 成一层球形原生质体, 其中少量细胞的细胞质已经解体, 只剩下细胞核时结束酶解, 获得的效果最佳。酶解后直接将样品制成悬浮液状态, 然后, 均匀地滴在载玻片上, 不用盖盖玻片, 自然风干后备用。这种方法减去了常规压片中盖片和揭片两个步骤, 避免了在这两个步骤的操作中对细胞的损伤。

[0027] 本发明更加详细的实验步骤如下:

[0028] 以植物根尖为实验材料, 待根生长长度约 1.5cm 左右时, 进行不同重金属胁迫实验。

[0029] (1) 切取重金属处理后的根尖分生组织细胞, 于 4% 多聚甲醛中固定 1-2h。

[0030] (2) PBS 缓冲液 (pH7.0) 中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0031] (3) 2.5% 纤维素酶 + 2.5% 果胶酶, 37°C 温箱酶解, 根据细胞酶解情况确定时间。

[0032] (4) PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0033] (5) 将根尖转至 0.5ml 的离心管中, 滴加 PBS 缓冲液少量 (适样品多少而定), 盖离心管盖, 手摇震荡至多数细胞游离状态。用滴管吸取约 0.1-0.2ml 样品液, 均匀涂于载片上分散成单个细胞, 不盖盖玻片, 用记号笔在载片的无样品面标记, 自然风干后备用。

[0034] (6) 将要标记的切片放在 1% TritonX-100 聚乙二醇辛基苯基醚 (曲拉通) 浸泡 20 分钟。

[0035] (7) PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0036] (8) 用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液, 滴一滴 ( $20 \mu\text{l}$ ) 配好的一抗 (与 C23 核仁蛋白结合) 至载玻片的样品处, 盖上盖玻片, 37°C 温箱孵育 1h-1.5h。需要强调的是: 购买的抗体要尽快分装, 分装可以最大程度地降低反复冻融对抗体活性的损害, 同时也降低了由于多次从同一管中吸取抗体造成的污染可能性。

[0037] (9) PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0038] (10) 用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液, 滴一滴 ( $20 \mu\text{l}$ ) 配好的二抗 (与一抗结构的荧光素) 至载玻片的样品上, 盖上盖玻片。37°C 温箱孵育 45min-1h。

[0039] (11) PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0040] (12) DAPI (DNA 染料) 染色: 用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液, 滴一滴 ( $20 \mu\text{l}$ ) DAPI 盖上载玻片。

[0041] (13) PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0042] (14) 用滤纸吸干多余 PBS, 滴一滴 ( $10 \mu\text{l}$ ) 防淬灭剂于载玻片材料上, 盖上盖玻

片,用指甲油将盖玻片四周封好,1h后可在荧光显微镜下观察。

[0043] (15) 荧光显微镜观察:核仁 C23 蛋白用蓝光 450 ~ 490nm(TRITC) 激发呈橙红色荧光。DNA(细胞核和染色体)用紫外光 355 ~ 425nm(DAPI) 激发呈蓝色荧光。

[0044] 本发明所用到主要试剂的配置及保存:

[0045] (1) 一抗:鼠抗 C23 单克隆抗体(mouse monoclonal anti-C23 antibody),购自 SantaCruz(美国)公司。一抗浓度为 0.2mg/ml,每个包装为 1ml。购买后按每管 10  $\mu$  L 分装于 1.5ml 离心管中,-20 $^{\circ}$ C 保存。待用时解冻。使用前用 PBS 缓冲液(pH7.4) 稀释至 1.5ml 即可(相当于稀释了 150 倍),4 $^{\circ}$ C 保存。

[0046] (2) 二抗:TRITC-山羊抗鼠 IgG(Tritc-conjugated rabbit anti-Mouse IgG(H+L)),购自 Jackson(美国)公司。原装进口为冻干粉,2.0ml;进口分装为液体,0.1ml(另加 0.1ml 甘油)。按每管 10  $\mu$  L 分装于 0.5ml 离心管中,-20 $^{\circ}$ C 避光保存。待用时解冻,用 PBS buffer(pH7.6) 稀释至 0.5ml 即可(相当于稀释了 50 倍),4 $^{\circ}$ C 避光保存待用

[0047] (3)DAPI(4,6-二胺-2-苯基吲哚-二盐酸)DAPI 主要染核酸中 DNA,储存液用无离子水配成 1mg/ml 浓度,4 $^{\circ}$ C 避光保存备用,使用终浓度为 1  $\mu$  g/ml,4 $^{\circ}$ C 避光保存。紫外光激发,细胞核和染色体呈蓝色荧光。

[0048] (4) 磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液)

[0049] NaCl 0.14mM 0.0082g/L

[0050] KCl 2.7mM 0.2013g/L

[0051] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0mM 2.8651g/L

[0052] NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM 0.2041g/L

[0053] 加无离子水至 1L,用 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 调 pH 至 7.0

[0054] (5) 固定剂 4%多聚甲醛(paraformaldehyde in PBS buffer):购自 Sigma(美国)公司。称多聚甲醛白色粉末 1g,量取 25ml PBS buffer 于烧杯中,盖盖儿,放置在通风橱中,90 $^{\circ}$ C 搅拌加热至溶解(呈透明色),冷却至室温后,倒入棕色瓶中,4 $^{\circ}$ C 保存待用。固定剂 4%多聚甲醛,主要是杀死细胞,维持细胞在活体时的结构状态。

[0055] (6) 酶液(2.5% Cellulase 纤维素酶 +2.5% Pectolase 果胶酶):购自 Yakult Honsha(日本)公司。一般配制 5ml 酶液,分别称 0.125g Cellulase 和 0.125g Pectolase,于 5ml 无离子水中,充分溶解后,分装于 4 支 1.5ml 的离心管中,-24 $^{\circ}$ C 保存备用。主要作用去除细胞壁(纤维素和果胶)。

[0056] (7)1% Triton X-100 聚乙二醇辛基苯基醚(曲拉通):购自上海化学试剂公司。一般配 25ml,取 0.25ml Triton X-100 加到 25ml PBS buffer 中,现用现配。这是一种优异的表面活性剂、润湿及洗涤剂,破细胞膜,即在细胞膜上打孔,使抗体进入。

[0057] (8) 抗荧光淬灭封片液(Antifade mounting medium):购自上海杰美基因公司。

[0058] (9) 指甲油市场购置。

[0059] 本发明的实验中应注意的问题:

[0060] (1) 抗体的活性决定了使用效果,如果抗体保存得当,大部分抗体活性都可以维持数月甚至数年。因此,买来的抗体要尽快分装,分装可以最大程度的降低反复冻融对抗体活性的损害,同时也降低了由于多次从同一管中吸取抗体造成的污染可能性。

[0061] (2) 本发明用到的用于固定样品的多聚甲醛试剂属危险化学品,请注意适当防

护。多聚甲醛在冷水中不易溶解,配制时要放置在通风橱中,90℃搅拌加热至溶解(呈透明色),冷却至室温后,倒入棕色瓶中,4℃保存待用。

[0062] 本发明与现有技术相比所具有的积极效果在于:

[0063] (1) 本发明检测重金属胁迫下植物细胞核仁 C23 蛋白质定位的免疫荧光方法,能够对重金属胁迫后,细胞内核仁 C23 蛋白质的变化进行精确定位。其中的酶解是本实验关键的步骤之一,酶解时间依细胞具体情况而定。例如在镜检时如果观察到大部分细胞均分散开,成一层球形原生质体,其中少量细胞的细胞质已经解体,只剩下核时结束酶解。

[0064] (2) 本发明对传统的制片方法进行了改革。酶解后直接将样品制成悬浮液状态,然后,均匀地滴在载玻片上,不用盖盖玻片,自然风干后备用。这种方法减去了常规压片中盖盖片和揭片两个步骤,避免了在这两个步骤的操作中对细胞的损伤。

[0065] (3) 本发明的检测技术具有特异性高、实验结果准确等特点,特别是对常规压片方法的改革,使操作步骤更加简便易行、大大提高了观察细胞数目等优点。该方法为研究重金属等逆境胁迫下对细胞中蛋白质的影响提供科学依据。为探讨重金属毒害细胞机理提供了精确的检测方法,其方法具有广阔的应用前景。

[0066] 本发明通过免疫荧光定位技术,对重金属胁迫后的核仁 C23 蛋白质的变化进行精确定位。我们利用上述方法已经观察了在 Al、Cd、和 Pb 胁迫下,洋葱和蚕豆根尖细胞中核仁 C23 蛋白质的变化,取得了很好的结果。

#### 附图说明:

[0067] 图 1 包括:

[0068] 图示 A1-A3 为未经重金属胁迫的细胞中核仁 C23 蛋白质的分布。其中 A1:橙红色荧光显示 C23 蛋白;A2:蓝色荧光显示细胞核(DNA);A3:合成图。

[0069] 图示 B-C 为重金属胁迫后细胞中核仁 C23 蛋白质在细胞中的定位。B、C 显示细胞核中的 C23 蛋白在重金属的胁迫下外溢到细胞质中,并随着重金属处理浓度的升高和处理时间的延长,C23 蛋白量逐渐增多。其中:

[0070] B1:橙红色荧光显示 C23 蛋白;B2:蓝色荧光显示细胞核(DNA);B3:合成图;

[0071] C1:橙红色荧光显示 C23 蛋白;C2:蓝色荧光显示细胞核(DNA);C3:合成图;

[0072] 图 2 为银染( $\text{AgNO}_3$  染色)实验结果图。未经重金属胁迫的细胞核仁呈深棕色(图 2a)。Cd<sup>2+</sup> 处理后,发现一些与核仁银染反应相同的细小颗粒分布在细胞质内(图 2b)。这些银染颗粒的数量随着 Cd<sup>2+</sup> 浓度升高和处理时间的延长而增多(图 2c)。

#### 具体实施方式

[0073] 以下结合实施例用来帮助理解本发明,并且不用于也不应被解释为以任何方式对所列出的权利要求中发明的限制。特别加以说明的是,本发明所用到的各种试剂均有市售。

[0074] 实施例 1

[0075] 材料培养以蚕豆为例:蚕豆主(侧)根根长约 1.5cm 时,用 10 μM、50 μM、100 μM 的 Al<sup>3+</sup> 处理 24h、48h、72h。

[0076] (1) 切取重金属处理后的蚕豆植物根尖分生组织细胞,于 4%多聚甲醛中固定 2h;经 PBS 缓冲液洗;

[0077] (2) 采用 2.5% 纤维素酶 +2.5% 果胶酶酶液于 37℃ 温箱酶解 ;经 PBS 缓冲液洗涤后压片 ;

[0078] (3) 将蚕豆植物根尖转至离心管中,滴加 PBS 缓冲液,手摇震荡至多数细胞游离状态,用滴管吸取约 0.1ml 样品液,均匀涂于载玻片上分散成单个细胞,标记后自然风干后备用 ;

[0079] (4) 将 (3) 得到的载玻片放在 1% TritonX-100 浸泡 15 分钟 ;经 PBS 缓冲液洗涤 ;

[0080] (5) 在 (4) 得到的载片上滴入 15  $\mu$  l 配好的一抗,盖上盖玻片,37℃ 温箱孵育 1h ;再经 PBS 缓冲液洗涤 ;

[0081] (6) 再将 (5) 得到的载片上滴入 15  $\mu$  l 配好的二抗,盖上盖玻片,37℃ 温箱孵育 45min-1h ;经 PBS 缓冲液洗涤 ;

[0082] (7) 再将 (6) 的载玻片上滴加 15  $\mu$  l DAPI,盖上盖玻片 ;经 PBS 缓冲液洗涤 ;

[0083] (8) 用滤纸吸干多余 PBS,滴加 5  $\mu$  l 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1h 后在荧光显微镜下观察。

[0084] (9) 荧光显微镜观察及图像分析处理 :制片用 NIKON 公司 (日本) HB-10101AF 型荧光显微镜观察, Pixera Pro 600CL CCD 数码照相。图像采集为 1392 $\times$ 1040 像素,图像的后处理利用 Photoshop 7.0 软件排版。C23 蛋白由 TRITC 标记,蓝光 450 ~ 490nm 激发,呈红色荧光 (见图 1 中 A1, B1, C1), 细胞核由 DAPI 染色,紫外光 355 ~ 425nm 激发,呈蓝色荧光 (见图 1 中 A2, B2, C2)。图 1 中 A3, B3, C3 为合成图。

[0085] 实施例 2

[0086] 材料培养以大蒜为例,大蒜不定根根长约 1.5cm 时,用 10  $\mu$  M、50  $\mu$  M、100  $\mu$  M 的 Pb<sup>2+</sup> 处理 24h、48h、72h。

[0087] 实验步骤 :

[0088] (1) 切取重金属处理后的根尖约 2mm,于 4% 多聚甲醛中固定 2h。

[0089] (2) PBS 缓冲液 (pH7.0) 中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0090] (3) 2.5% 纤维素酶 +2.5% 果胶酶,37℃ 温箱酶解,在酶解过程中随时镜检,直到有大量的球形原生质体产生结束酶解。

[0091] (4) PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0092] (5) 将根尖转至 0.5ml 的离心管中,滴加 PBS 缓冲液少量 (适样品多少而定),盖离心管盖,手摇震荡至多数细胞游离状态。用滴管吸取约 0.2ml 样品液,均匀涂于载片上分散成单个细胞,不盖盖玻片,用记号笔在载片的无样品面标记,自然风干后备用。

[0093] (6) 将要标记的切片放在 1% Triton X-100 中抽提 20min。

[0094] (7) PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0095] (8) 用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液,用经 PBS 稀释的一抗 (鼠抗 C23 单克隆抗体,工作浓度 1 : 150) 37℃ 孵育 1h 或 4℃ 孵育过夜。

[0096] (9) PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0097] (10) 用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液,滴一滴 (20  $\mu$  l) 配好的二抗 (山羊抗鼠 IgG,工作浓度 1 : 50) 至载玻片上的样品处,盖上盖玻片,37℃ 温箱孵育 45min-1h。

[0098] (11) PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0099] (12) DAPI 染色 :用滤纸吸干多余 PBS 缓冲液,滴一滴 (20  $\mu$  l) DAPI,盖上盖玻片。

- [0100] (13)PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。
- [0101] (14)用滤纸吸干多余 PBS,滴一滴 (10  $\mu$  l) 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1h 后可在荧光显微镜下观察。
- [0102] (15)荧光显微镜观察及图像分析处理:制片用 NIKON 公司 (日本)HB-10101AF 型荧光显微镜观察, Pixera Pro 600CL CCD 数码照相。图像采集为 1392 $\times$ 1040 像素,图像的后期处理利用 Photoshop 7.0 软件排版。C23 蛋白由 TRITC 标记,蓝光 450 ~ 490nm 激发,呈红色荧光 (见图 1 中 A1, B1, C1),细胞核由 DAPI 染色,紫外光 355 ~ 425nm 激发,呈蓝色荧光 (见图 1 中 A2, B2, C2)。图 1 中 A3, B3, C3 为合成图。
- [0103] 实施例 3
- [0104] 洋葱根尖细胞中核仁 C23 蛋白质的变化
- [0105] 材料培养以洋葱为例:洋葱不定根根长约 1.5cm 时,用 10  $\mu$  M、50  $\mu$  M、100  $\mu$  M 的 Cd<sup>2+</sup> 处理 24h、48h、72h。
- [0106] 实验步骤:
- [0107] (1)切取重金属处理后的根尖约 2mm,于 4%多聚甲醛中固定 2h。
- [0108] (2)PBS 缓冲液 (pH7.0) 中洗 3 次 (每次 15 分钟)。
- [0109] (3)2.5%纤维素酶 +2.5%果胶酶,37 $^{\circ}$ C 温箱酶解,在酶解过程中随时镜检,直到有大量的球形原生质体产生结束酶解。
- [0110] (4)PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 15 分钟)。
- [0111] (5)将根尖转至 0.5ml 的离心管中,滴加 PBS 缓冲液少量 (适样品多少而定),盖离心管盖,手摇震荡至多数细胞游离状态。用滴管吸取约 0.1ml 样品液,均匀涂于载片上分散成单个细胞,不盖盖玻片,用记号笔在载片的无样品面标记,自然风干后备用。
- [0112] (6)将要标记的切片放在 1% Triton X-100 中抽提 20min。
- [0113] (7)PBS 缓冲液洗 3 次 (每次 15 分钟)。
- [0114] (8)用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液,用经 PBS 稀释的一抗 (鼠抗 C23 单克隆抗体,工作浓度 1 : 150) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- [0115] (9)PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。
- [0116] (10)用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液,滴一滴 (20  $\mu$  l) 配好的二抗 (山羊抗鼠 IgG,工作浓度 1 : 50) 至载玻片上的样品处,盖上盖玻片,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 45min。
- [0117] (11)PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。
- [0118] (12)DAPI 染色:用滤纸吸干多余的 PBS 缓冲液,滴一滴 (20  $\mu$  l) DAPI 盖上盖玻片。
- [0119] (13)PBS 缓冲液中洗 3 次 (每次 10 分钟)。
- [0120] (14)用滤纸吸干多余 PBS,滴一滴 (10  $\mu$  l) 防淬灭剂于载玻片材料上,盖上盖玻片,用指甲油将盖玻片四周封好,1h 后可在荧光显微镜下观察。
- [0121] (15)荧光显微镜观察及图像分析处理:制片用 NIKON 公司 (日本)HB-10101AF 型荧光显微镜观察, Pixera Pro 600CL CCD 数码照相。图像采集为 1392 $\times$ 1040 像素,图像的后期处理利用 Photoshop 7.0 软件排版。C23 蛋白由 TRITC 标记,蓝光 450 ~ 490nm 激发,呈红色荧光 (见图 1 中 A1, B1, C1),细胞核由 DAPI 染色,紫外光 355 ~ 425nm 激发,呈蓝色荧光 (见图 1 中 A2, B2, C2)。图 1 中 A3, B3, C3 为合成图。
- [0122] 实施例 4

[0123] 银染技术 (Ag-NOR 染色技术) 与本发明技术的比较试验 :

[0124] 银染原理 :Ag-NOR 染色技术能够特异地与细胞中核仁形成区 (NOR) 染色。当位于此处的 18S、28S 核糖体 RNA 的基因 (rDNA) 具有转录活性时,应用银染技术可使 NOR 特异性着色 (棕黄色)。现已进一步证明银染物质不是 rDNA,亦不是 rRNA,可能是核仁形成区特异的蛋白质,即和 rRNA 转录相联系的酸性蛋白。

[0125] 材料培养以蚕豆为例,蚕豆根长约 1.5cm 时,用 10  $\mu$  M、50  $\mu$  M、100  $\mu$  M 的  $Cd^{2+}$  处理 24h、48h、72h。

[0126] 实验步骤 :

[0127] (1) 切取重金属处理后的根尖约 2mm,于固定液 (酒精 : 醋酸 = 3 : 2) 中固定 1h。

[0128] (2) 无离子水中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0129] (3) 置于 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中,用水解液 (1NHCl : 酒精 : 醋酸 = 5 : 3 : 2) 水解 9min。

[0130] (4) 无离子水中洗 3 次 (每次 10 分钟)。

[0131] (5) 根尖用 45% 乙酸压片,室温下干燥过夜,揭片。

[0132] (6) 在干燥切片上加入 1 滴 2% 明胶溶液和 2 滴 50%  $AgNO_3$  水溶液,混匀,加盖片,室温下浸染。

[0133] (7) 待核仁呈棕黄色、细胞质呈浅黄色时,用蒸馏水将染色液淋洗干净。

[0134] (8) 在 0.001% 亚甲基兰水溶液复染,至染色质呈绿色。

[0135] (9) 用蒸馏水将染色液淋洗干净,室温下干燥。

[0136] (10) 光学树脂封片,显微镜下观察。

[0137] (11) 显微镜观察及图像分析处理 :制片用 VANOX-AHB 型 Olympus 显微镜 (日本) 观察, Pixera Pro 600CL CCD 数码照相。图像采集为 1392 $\times$ 1040 像素,图像的后期处理利用 Photoshop 7.0 软件排版。经  $AgNO_3$  染色,核仁呈棕黄色、细胞质呈浅黄色,染色体由亚甲基兰染色,呈绿色 (见图 2)。

[0138] 银染实验结果 :未经重金属胁迫的细胞核仁呈深棕色 (图 2a)。 $Cd^{2+}$  处理后,发现一些与核仁银染反应相同的细小颗粒分布在细胞质内 (图 2b)。这些银染颗粒的数量随着  $Cd^{2+}$  浓度升高和处理时间的延长而增多 (图 2c)。

[0139] 采用本发明的方法测定及结果 :未经重金属胁迫的细胞中核仁 C23 蛋白质位于核仁内 (图 1A)。重金属胁迫后细胞中核仁 C23 蛋白分布在核质 (图 1B),并进一步外溢到细胞质中 (图 1C)。

[0140] 两种实验方法的比较 :

[0141] 利用银染技术研究对重金属对植物细胞核仁结构的影响,具有一定的科学价值。但是,银染技术只能鉴定重金属胁迫后,从细胞核外溢到细胞质中的银染颗粒是核仁中嗜银的酸性蛋白,不能鉴定是哪些种核仁蛋白受到重金属胁迫的影响,对深入研究重金属毒害机理有一定的局限性。

[0142] 本发明通过免疫荧光定位技术,对重金属胁迫后的核仁 C23 蛋白质的变化进行精确定位,具有特异性高、实验结果准确等特点。本发明的检测技术可以进一步深入检测重金属对具体的核仁结构成分造成的影响。该方法为研究重金属等逆境胁迫下对细胞中蛋白质的影响提供科学依据,为探讨重金属毒害细胞机理提供了精确的检测方法,其方法具有广

阔的应用前景。

[0143] 在详细描述的较佳实施例之后,熟悉该项技术人士可清楚地了解,在不脱离上述申请专利范围与精神下可进行各种变化与修改,凡依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均属于本发明技术方案的范围。且本发明亦不受说明书中所举实例实施方式的限制。

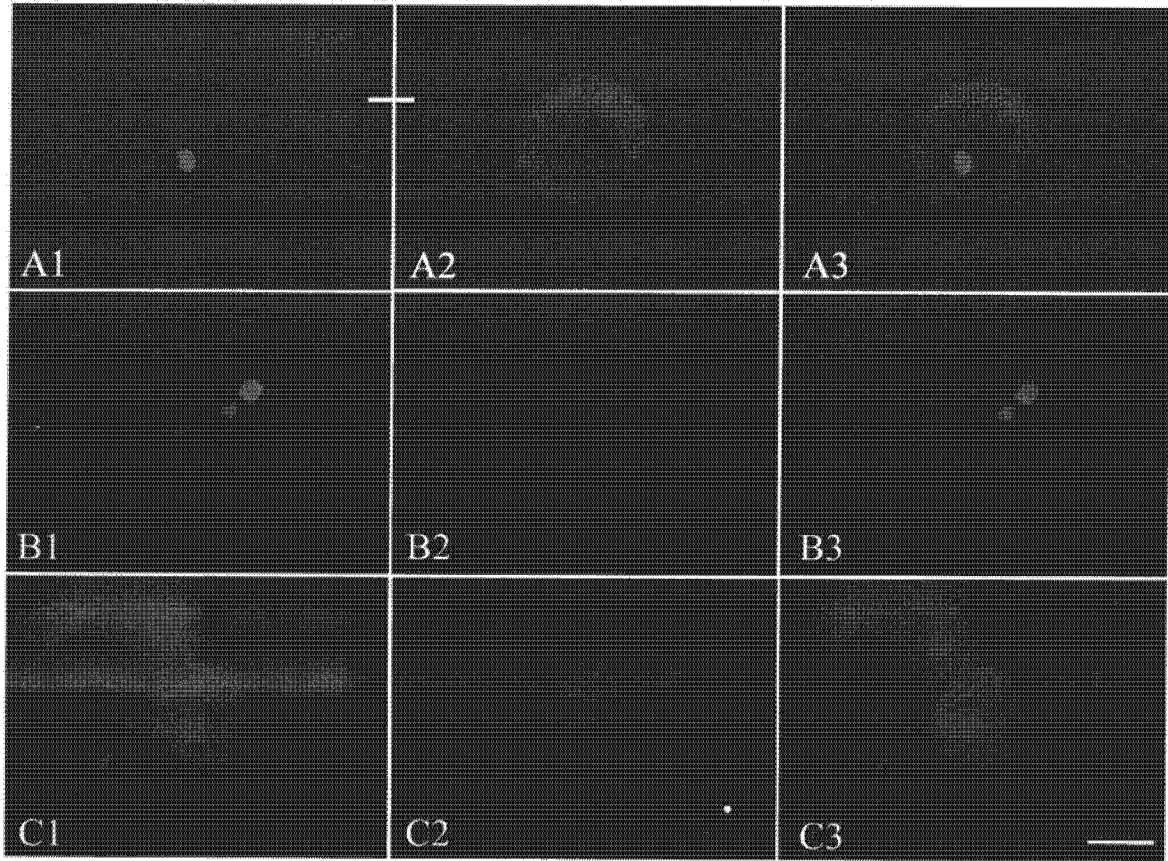


图 1

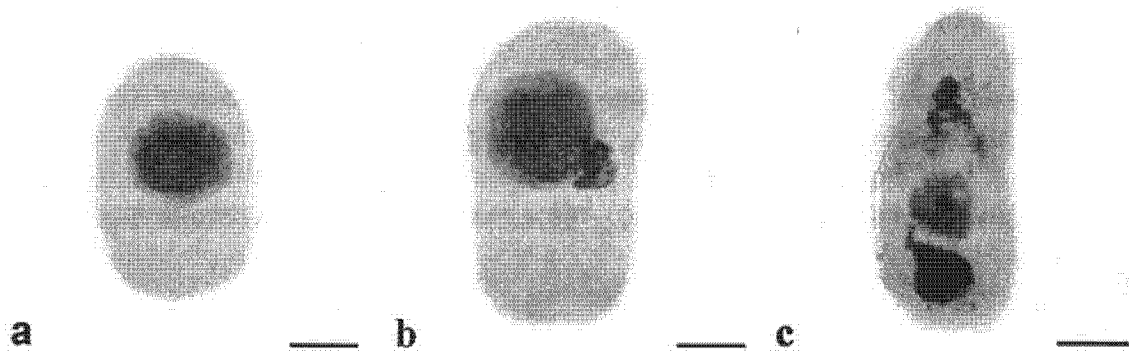


图 2

专利名称(译)	检测重金属胁迫下核仁C23蛋白质定位的免疫荧光方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101782573A</a>	公开(公告)日	2010-07-21
申请号	CN201010031327.7	申请日	2010-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	天津师范大学		
申请(专利权)人(译)	天津师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津师范大学		
[标]发明人	刘东华 张慧敏 张闪闪 秦蓉		
发明人	刘东华 张慧敏 张闪闪 秦蓉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N1/28 G01N33/577		
代理人(译)	朱红星		
其他公开文献	CN101782573B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测重金属胁迫下植物细胞核仁C23蛋白质定位的免疫荧光方法。它是切取重金属处理后的植物根尖分生组织细胞，于4%多聚甲醛中固定1h；采用酶液酶解后；用滴管吸取约0.1ml样品液，均匀涂于载玻片上分散成单个细胞，标记后自然风干，放在1% TritonX-100浸泡15分钟；然后滴入15μl配好的一抗，盖上盖玻片，37°C温箱孵育1h；再滴入15μl配好的二抗，处理后滴加15μl DAPI，最后滴加5μl防淬灭剂于载玻片材料上，盖上盖玻片，用指甲油将盖玻片四周封好，1h后在荧光显微镜下观察。本发明的检测方法具有特异性高、实验结果准确，大大提高了观察细胞数目等特点。该方法为探讨重金属毒害细胞机理提供了精确的检测方法，其检测方法具有广阔的应用前景。

