



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109061133 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201810748383.9

审查员 刘迎鸣

(22)申请日 2018.07.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109061133 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(73)专利权人 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 李天忠 杨清 顾钊宇 李威

李洋 于杰 刘春生

(74)专利代理机构 北京卫平智业专利代理事务

所(普通合伙) 11392

代理人 谢建玲 郝亮

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

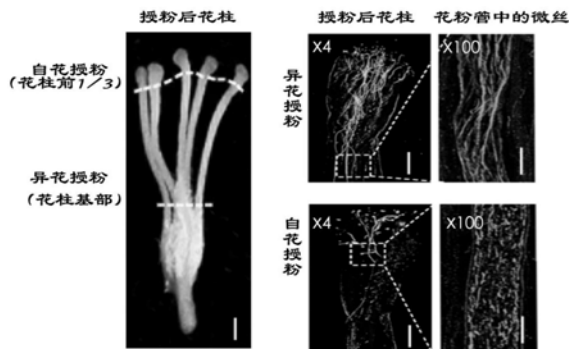
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明属于植物生物技术领域,涉及一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法。先提供一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒,包括:花柱固定液试剂A,花柱洗涤液试剂B,微丝染料试剂C和胍胍质免疫荧光试剂D。再应用所述试剂盒标记微丝细胞骨架,步骤为:1)取授粉的花柱;2)用花柱固定液试剂A对花柱固定;3)用花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤;4)用微丝染料试剂C和胍胍质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色;5)对花柱滴加抗荧光猝灭剂,在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架。本发明所述试剂盒和方法实现了快速、灵敏、准确、简便地观察苹果花粉管内微丝骨架的结构与排列方式。



1. 一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒,其特征在于,包括:花柱固定液试剂A,花柱洗涤液试剂B,微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D;

所述花柱固定液试剂A包括:多聚甲醛、EGTA、PIPES、MgCl<sub>2</sub>和蔗糖;

所述多聚甲醛的质量百分比为10%,EGTA的浓度配比为6mmol/L,PIPES的浓度配比为80mmol/L,MgCl<sub>2</sub>的浓度配比为6mmol/L,蔗糖的质量百分比为18%;

所述花柱固定液试剂A的溶剂为双蒸水;

所述花柱洗涤液试剂B包括:Tris-HCl、NaCl和Tween;

每1L花柱洗涤液试剂B中包括:100mL的Tris-HCl、7g的NaCl和20mL的Tween,所述Tris-HCl的pH为7;

所述花柱洗涤液试剂B的溶剂为双蒸水;

所述微丝染料试剂C包括:NP-40、Alex-561-鬼笔环肽、Tris-HCl、NaCl和蔗糖;

所述NP-40的体积百分比为1%,所述Alex-561-鬼笔环肽浓度配比为200nmol/L,所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为5.0,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述蔗糖的质量百分比为18%;

所述微丝染料试剂C的溶剂为双蒸水;

所述胼胝质免疫荧光试剂D包括:NP-40、纤维素酶、果胶酶Y-23、Tris-HCl、NaCl、甘氨酸、一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase和二抗FITC-anti-mouse-IgG;

所述NP-40的体积百分比为1%,所述纤维素酶的质量百分比为3.0%,所述果胶酶Y-23的质量百分比为0.3%,所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为5.0,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L,所述一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase的体积比为1:300,所述二抗FITC-anti-mouse-IgG的体积比为1:300;

所述胼胝质免疫荧光试剂D的溶剂为双蒸水。

2. 一种应用权利要求1所述标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 从田间取人工自花或异花授粉48小时后的花柱;

2) 在室温下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用所述花柱固定液试剂A对花柱固定2.5h;

3) 在室温下,用所述花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤6次,每次20min;

4) 在室温下,用所述微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色5h,所述微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的体积比为1:1;

5) 先对花柱滴加抗荧光猝灭剂,然后在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架。

3. 如权利要求2所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:步骤1)中,所述花柱为先去雄,然后授粉,最后套袋的花柱。

4. 如权利要求2所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:步骤3)的具体过程如下:

31) 将固定后的花柱,先在12000rpm的条件下离心15min,再弃上清;

32) 用所述花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤6次,每次20min;

33) 在室温下,用0.18%的NP-40,对花柱浸泡20min;

34) 在室温下,用0.18%的NP-40,对花柱浸泡6次,每次15min。

5. 如权利要求2所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:在进行步骤4)之前,先进行以下步骤:

41) 将浸泡后的花柱,先在12000rpm的条件下离心10min,再弃上清;

42) 用洗涤液对花柱洗6次,每次20min,所述洗涤液为水;

43) 在室温下,加入200nmol/L的Alex-561-鬼笔环肽,对花柱进行染色4h。

6. 如权利要求5所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:在进行步骤4)之后,进行以下步骤:

45) 将染色后的花柱,先在12000rpm的条件下离心15min,再弃上清;

46) 对花柱用洗涤液洗涤6次,每次20min,所述洗涤液为水;

47) 在室温下,用纤维素酶和果胶酶Y-23的混合液对花柱酶解30min,所述纤维素酶的质量百分比为5%,所述果胶酶Y-23的质量百分比为10%;

48) 在室温下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.18%的NP-40对花柱浸泡20min;

49) 在室温条件下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.15%的NP-40对花柱浸泡,浸泡重复3次,每次20min;

410) 在室温条件下,用120mmol/L的甘氨酸对花柱封闭1h;

411) 在4℃的条件下,加入以一抗anti-β-1,3-glucanase为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述一抗anti-β-1,3-glucanase与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育过夜;

412) 在室温条件下,加入以二抗FITC-anti-mouse-IgG为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述二抗FITC-anti-mouse-IgG与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育4h;

413) 用Tris-HCl、NaCl和甘氨酸的混合溶液对花柱漂洗4次,每次20min;所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L。

7. 如权利要求6所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:

所述0.15%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;

所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.15%;

所述0.18%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;

所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.18%;

所述NP-40溶液包括:Tris-HCl、NaCl和蔗糖;

所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为7.0;所述NaCl的浓度配比为300mmol/L;所述蔗糖的质量百分比为18%;

所述TBST溶液包括:Tris-HCl、NaCl和Tween;

每1L的TBST溶液中包括:100mL的Tris-HCl、7.6g的NaCl和20.5mL的Tween,所述Tris-HCl的pH为7.4。

8. 如权利要求2所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:步骤5)中,在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架时,使用双通道激光进行激发,所述双通道激光的激发光波长为561nm和488nm。

9. 如权利要求6所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:所述密闭容器为10毫升西林瓶。

10. 如权利要求2所述的标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,其特征在于:所述人工自花授粉是指对苹果花柱的前1/3进行自花授粉;所述人工异花授粉是指对苹果花柱基部进行异花授粉。

## 一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,涉及一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法,特别涉及一种标记苹果自花、异花授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架形态的试剂盒及方法。

### 背景技术

[0002] 植物的细胞骨架包括微丝和微管,它们组成不同的列阵,参与细胞分裂、生长和分化等众多的生理过程。不同真核生物细胞骨架的排列差异很大,花粉管细胞中的微丝骨架在生殖过程中承担着重要的角色。以往的研究主要集中在体外培养花粉管,并观察其细胞微丝骨架的形态;然而,能够清晰直观地观察田间自花和异花授粉后花柱中花粉管的微丝骨架排列,对了解花粉管通过细胞骨架参与信号转导、胞吞胞吐、极性生长过程及有性生殖有着重要的意义。由于授粉后的花柱中花粉管存在材料收集困难及木本植物细胞壁组成成分较为复杂的问题,因此对于苹果花柱中花粉管微丝骨架的研究更为困难。

[0003] 本专利的研究以苹果授粉后,花柱中花粉管为试材,通过田间授粉、花柱固定、花柱中微丝骨架染色、花粉管内花粉管与花柱间胼胝质免疫荧光染色、激光共聚焦观察苹果自花和异花授粉后微丝骨架的排列方式。本专利为直观观察木本植物花粉管内微丝、微管的骨架结构与排列方式提供技术支持。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架的试剂盒,另一个目的是提供一种高效地标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架的方法。

[0005] 一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒,包括:花柱固定液试剂A,花柱洗涤液试剂B,微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D;

[0006] 所述花柱固定液试剂A包括:多聚甲醛、EGTA、PIPES、 $MgCl_2$ 和蔗糖;

[0007] 所述多聚甲醛的质量百分比为10%,EGTA的浓度配比为6mmol/L,PIPES的浓度配比为80mmol/L, $MgCl_2$ 的浓度配比为6mmol/L,蔗糖的质量百分比为18%;

[0008] 所述花柱固定液试剂A的溶剂为双蒸水;

[0009] 所述花柱洗涤液试剂B包括:Tris-HCl、NaCl和Tween;

[0010] 每1L花柱洗涤液试剂B中包括:100mL的Tris-HCl、7g的NaCl和20mL的Tween,所述Tris-HCl的pH为7;

[0011] 所述花柱洗涤液试剂B的溶剂为双蒸水;

[0012] 所述微丝染料试剂C包括:NP-40、Alex-561-鬼笔环肽、Tris-HCl、NaCl和蔗糖;

[0013] 所述NP-40的体积百分比为1%,所述Alex-561-鬼笔环肽浓度配比为200nmol/L,所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为5.0,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述蔗糖的质量百分比为18%;

[0014] 所述微丝染料试剂C的溶剂为双蒸水;

[0015] 所述胼胝质免疫荧光试剂D包括:NP-40、纤维素酶、果胶酶Y-23、Tris-HCl、NaCl、甘氨酸、一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase和二抗FITC-anti-mouse-IgG;

[0016] 所述NP-40的体积百分比为1%,所述纤维素酶的质量百分比为3.0%,所述果胶酶Y-23的质量百分比为0.3%,所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为5.0,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L,所述一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase的体积比为1:300,所述二抗FITC-anti-mouse-IgG的体积比为1:300;

[0017] 所述胼胝质免疫荧光试剂D的溶剂为双蒸水。

[0018] 一种应用标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 从田间取人工自花或异花授粉48小时后的花柱;

[0020] 2) 在室温下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用所述花柱固定液试剂A对花柱固定2.5h;

[0021] 3) 在室温下,用所述花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤6次,每次20min;

[0022] 4) 在室温下,用所述微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色5h,所述微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的体积比为1:1;

[0023] 5) 先对花柱滴加抗荧光猝灭剂,然后在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架。

[0024] 在上述技术方案的基础上,步骤1)中,所述花柱为先去雄,然后授粉,最后套袋的花柱。

[0025] 在上述技术方案的基础上,步骤3)的具体过程如下:

[0026] 31) 将固定后的花柱,先在12000rpm的条件下离心15min,再弃上清;

[0027] 32) 用所述花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤6次,每次20min;

[0028] 33) 在室温下,用0.18%的NP-40,对花柱浸泡20min;

[0029] 34) 在室温下,用0.18%的NP-40,对花柱浸泡6次,每次15min。

[0030] 在上述技术方案的基础上,在进行步骤4)之前,先进行以下步骤:

[0031] 41) 将浸泡后的花柱,先在12000rpm的条件下离心10min,再弃上清;

[0032] 42) 用洗涤液对花柱洗6次,每次20min,所述洗涤液为水;

[0033] 43) 在室温下,加入200nmol/L的Alex-561-鬼笔环肽,对花柱进行染色4h。

[0034] 在上述技术方案的基础上,在进行步骤4)之后,进行以下步骤:

[0035] 45) 将染色后的花柱,先在12000rpm的条件下离心15min,再弃上清;

[0036] 46) 对花柱用洗涤液洗涤6次,每次20min,所述洗涤液为水;

[0037] 47) 在室温下,用纤维素酶和果胶酶Y-23的混合液对花柱酶解30min,所述纤维素酶的质量百分比为5%,所述果胶酶Y-23的质量百分比为10%;

[0038] 48) 在室温下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.18%的NP-40对花柱浸泡20min;

[0039] 49) 在室温条件下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.15%的NP-40对花柱浸泡,浸泡重复3次,每次20min;

[0040] 410) 在室温条件下,用120mmol/L的甘氨酸对花柱封闭1h;

[0041] 411) 在4℃的条件下,加入以一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育过夜;

[0042] 412) 在室温条件下,加入以二抗FITC-anti-mouse-IgG为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述二抗FITC-anti-mouse-IgG与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育4h;

[0043] 413) 用Tris-HCl、NaCl和甘氨酸的混合溶液对花柱漂洗4次,每次20min;所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L。

[0044] 在上述技术方案的基础上,所述0.15%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;

[0045] 所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.15%;

[0046] 所述0.18%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;

[0047] 所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.18%;

[0048] 所述NP-40溶液包括:Tris-HCl、NaCl和蔗糖;

[0049] 所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为7.0;所述NaCl的浓度配比为300mmol/L;所述蔗糖的质量百分比为18%;

[0050] 所述TBST溶液包括:Tris-HCl、NaCl和Tween;

[0051] 每1L的TBST溶液中包括:100mL的Tris-HCl、7.6g的NaCl和20.5mL的Tween,所述Tris-HCl的pH为7.4。

[0052] 在上述技术方案的基础上,步骤5)中,在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架时,使用双通道激光进行激发,所述双通道激光的激发光波长为561nm和488nm。

[0053] 在上述技术方案的基础上,所述密闭容器为10毫升西林瓶。

[0054] 在上述技术方案的基础上,所述人工自花授粉是指对苹果花柱的前1/3进行自花授粉;所述人工异花授粉是指对苹果花柱基部进行异花授粉。

[0055] 本发明的有益技术效果如下:

[0056] 本发明提供了一种用于标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架的方法及其试剂盒;可实现快速、灵敏、准确、简便地观察苹果花粉管内微丝骨架的结构与排列方式。

## 附图说明

[0057] 本发明有如下附图:

[0058] 图1为苹果花粉管微丝细胞骨架的观察结果示意图。

## 具体实施方式

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 下述组分浓度如无特殊说明,均为组合物中的终浓度。

[0062] 在所述标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架的试剂盒中:

[0063] 对于花柱固定液试剂A,所述多聚甲醛的质量百分比为10%,EGTA的浓度配比为

6mmol/L, PIPES的浓度配比为80mmol/L, MgCl<sub>2</sub>的浓度配比为6mmol/L, 蔗糖的质量百分比为18%。

[0064] 对于花柱洗涤液试剂B, 每1L花柱洗涤液试剂B中包括: 100mL的Tris-HCl、7g的NaCl和20mL的Tween, 所述Tris-HCl的pH为7。

[0065] 对于微丝染料试剂C, 所述NP-40的体积百分比为1%, 所述Alex-561-鬼笔环肽的浓度配比为200nmol/L, 所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L, 所述Tris-HCl的pH为5.0, 所述NaCl的浓度配比为300mmol/L, 所述蔗糖的质量百分比为18%,

[0066] 对于胍胍质免疫荧光试剂D, 所述NP-40的体积百分比为1%, 所述纤维素酶的质量百分比为3.0%, 所述果胶酶Y-23的质量百分比为0.3%, 所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L, 所述Tris-HCl的pH为5.0, 所述NaCl的浓度配比为300mmol/L, 所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L, 所述一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase的体积比为1:300, 所述二抗FITC-anti-mouse-IgG的体积比为1:300,

[0067] Alex-561-鬼笔环肽(目录号为A12380) 购于Molecular Probes公司、纤维素酶(目录号为M0512) 购于Sigma公司, 果胶酶Y-23(目录号为9032-75-1) 和二抗FITC-anti-mouse-IgG(目录号为CW0166) 均购于北京康为试剂生物科技有限公司, 其他常规生化试剂购自北京经科宏达生物技术公司。一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase购于澳大利亚Biosupplies公司, 离心管等一般耗材购于Axygen公司。

[0068] 实施例: 标记苹果自花或异花授粉后花粉管微丝细胞骨架

[0069] 由于在本实验室前期, 获得并保存有大量的苹果‘金冠’授粉后的花柱, 选择状态良好的花柱为研究对象, 进行标记授粉后花柱中花粉管的微丝骨架。

[0070] 简述流程如下: 人工授粉—固定花柱—洗涤花柱—使用微丝染料试剂C和胍胍质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱进行染色—使用激光共聚焦显微镜观察。

[0071] 因此, 分别从以上各个步骤设计实验, 以确定标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架的方法。

[0072] 一、标记苹果授粉后花柱中花粉管微丝细胞骨架

[0073] 1、收集授粉的花柱

[0074] 于北京时间4月15日苹果花处于盛花期时, 对套袋的金冠苹果花品种先去除套袋, 再进行去雄, 然后进行人工自花或异花授粉, 最后对授粉后的苹果花套袋, 密闭48h。待花粉管在花柱中的生长完成时, 用镊子将授粉后的花柱取下。

[0075] 2、固定花柱

[0076] 将上述授粉48h后的花柱用镊子取下, 在室温下, 用所述花柱固定液试剂A对花柱固定2.5h。

[0077] 所述固定液试剂A包括: 多聚甲醛、EGTA、PIPES、MgCl<sub>2</sub>和蔗糖。

[0078] 所述多聚甲醛的质量百分比为10%, EGTA的浓度配比为6mmol/L, PIPES的浓度配比为80mmol/L, MgCl<sub>2</sub>的浓度配比为6mmol/L, 蔗糖的质量百分比为18%。

[0079] 3、洗涤花柱

[0080] 具体过程如下:

[0081] 31) 将固定后的花柱, 先在12000rpm的条件下离心15min, 再弃上清。

[0082] 32) 用所述花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤6次, 每次20min;

- [0083] 33) 在室温下,用0.18%的NP-40,对花柱浸泡20min;
- [0084] 34) 用0.18%的NP-40,对花柱浸泡6次,每次15min。
- [0085] 4、在室温下,使用微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色
- [0086] 具体过程如下:
- [0087] 41) 将浸泡后的花柱,先在12000rpm的条件下离心10min,再弃上清。
- [0088] 42) 用洗涤液对花柱洗6次,每次20min,所述洗涤液为水。
- [0089] 43) 在室温下,加入200nmol/L的Alex-561-鬼笔环肽,对花柱进行染色4h。
- [0090] 44) 使用微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色5h,所述微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的体积比为1:1;
- [0091] 45) 将染色后的花柱,先在12000rpm的条件下离心15min,再弃上清。
- [0092] 46) 对花柱用洗涤液洗涤6次,每次20min,所述洗涤液为水。
- [0093] 47) 在室温下,用纤维素酶和果胶酶Y-23混合液对花柱酶解30min,所述纤维素酶的质量百分比为5%,所述果胶酶Y-23的质量百分比为10%。
- [0094] 48) 在室温下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.18%的NP-40对花柱浸泡20min。
- [0095] 49) 在室温条件下,将花柱置于密闭容器中,并对密闭容器抽真空,在密闭容器中用0.15%的NP-40对花柱浸泡20min,重复3次,每次20min。
- [0096] 410) 在室温条件下,用120mmol/L的甘氨酸对花柱封闭1h。
- [0097] 411) 在4℃的条件下,加入以一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述一抗anti- $\beta$ -1,3-glucanase与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育过夜。
- [0098] 412) 在室温条件下,加入以二抗FITC-anti-mouse-IgG为溶质,以TBST溶液为溶剂的混合溶液,所述二抗FITC-anti-mouse-IgG与TBST溶液的体积比为1:300,对花柱孵育4h。
- [0099] 413) 用Tris-HCl、NaCl和甘氨酸的混合溶液对花柱漂洗4次,每次20min;所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述NaCl的浓度配比为300mmol/L,所述甘氨酸的浓度配比为120mmol/L。
- [0100] 在上述技术方案的基础上,所述0.15%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;
- [0101] 所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.15%;
- [0102] 所述0.18%的NP-40为:NP-40溶液和TBST溶液的混合溶液;
- [0103] 所述NP-40溶液与TBST溶液的体积比为0.18%;
- [0104] 所述NP-40溶液包括:Tris-HCl、NaCl和蔗糖;
- [0105] 所述Tris-HCl的浓度配比为100mmol/L,所述Tris-HCl的pH为7.0;所述NaCl的浓度配比为300mmol/L;所述蔗糖的质量百分比为18%;
- [0106] 所述TBST溶液包括:Tris-HCl、NaCl和Tween;
- [0107] 每1L的TBST溶液中包括:100mL的Tris-HCl、7.6g的NaCl和20.5mL的Tween,所述Tris-HCl的pH为7.4。
- [0108] 5、使用激光共聚焦显微镜观察花粉管微丝细胞骨架
- [0109] 在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架时,使用双通道激光进行

激发,所述双通道激光的激发光波长为561nm和488nm。

[0110] 观察结果示意如图1所示,图1中表示了在花柱前1/3进行自花授粉和在花柱基部进行异花授粉两种情况,表明本专利所述方法可以标记苹果体内自花或异花授粉后,花柱中花粉管微丝细胞骨架,实现快速、灵敏、准确、简便地观察苹果体内授粉后花粉管内微丝骨架的结构与排列方式。

[0111] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明做了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0112] 本说明书中未做详细描述的内容属于本领域专业技术人员公知的现有技术。

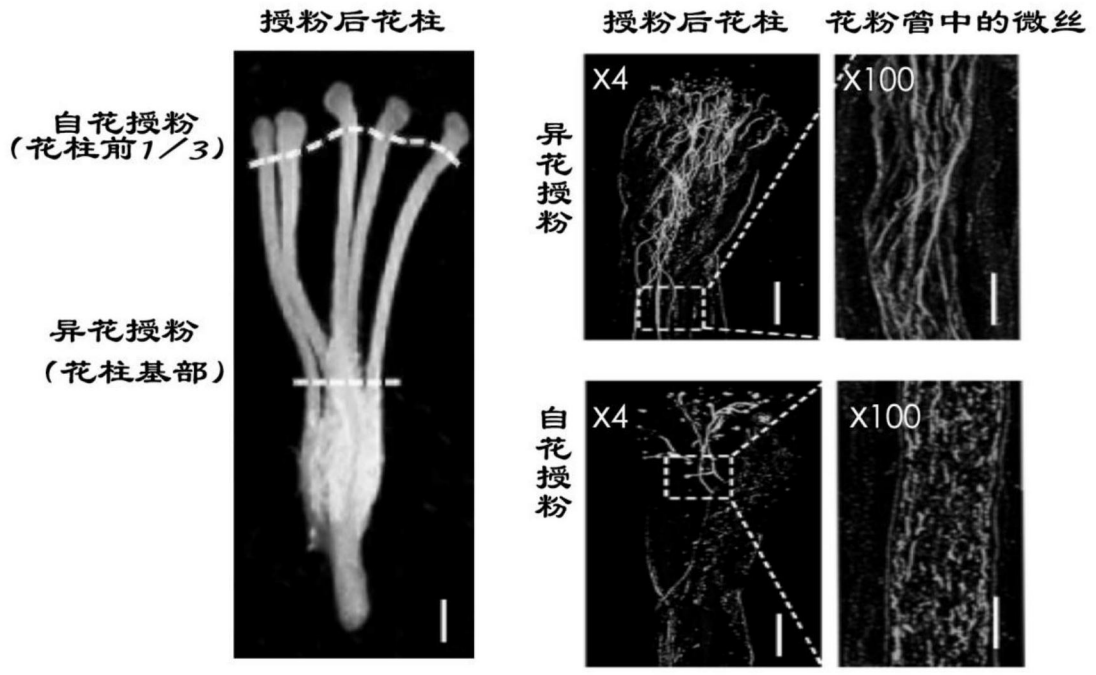


图1

专利名称(译)	一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109061133B</a>	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201810748383.9	申请日	2018-07-10
[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	李天忠 杨清 顾钊宇 李威 李洋 于杰 刘春生		
发明人	李天忠 杨清 顾钊宇 李威 李洋 于杰 刘春生		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533		
代理人(译)	谢建玲 郝亮		
其他公开文献	CN109061133A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于植物生物技术领域，涉及一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒及方法。先提供一种标记苹果授粉后花粉管微丝细胞骨架的试剂盒，包括：花柱固定液试剂A，花柱洗涤液试剂B，微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D。再应用所述试剂盒标记微丝细胞骨架，步骤为：1)取授粉的花柱；2)用花柱固定液试剂A对花柱固定；3)用花柱洗涤液试剂B对花柱洗涤；4)用微丝染料试剂C和胼胝质免疫荧光试剂D的混合溶液对花柱染色；5)对花柱滴加抗荧光猝灭剂，在激光共聚焦显微镜下观察花柱中花粉管微丝细胞骨架。本发明所述试剂盒和方法实现了快速、灵敏、准确、简便地观察苹果花粉管内微丝骨架的结构与排列方式。

