

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610003166.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 2 日

[11] 公开号 CN 1811433A

[22] 申请日 2006.2.20

[21] 申请号 200610003166.4

[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 张凌云

[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 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法。该方法，包括以下步骤：1) 用含多聚甲醛的磷酸缓冲液将花粉管固定后，用含纤维素酶和离析酶的酶解液酶解裸子植物花粉管，再用质量百分比浓度为 0.2 - 1% 的 TritonX - 100 或 NP - 40 水溶液洗涤；2) 将经步骤 1) 处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应，如检测到荧光，则裸子植物花粉管内含有该待测抗原并得到该待测抗原的定位情况。本发明的利用免疫荧光技术检测植物花粉管内抗原的方法抗原抗体结合充分，标记效果好，灵敏度高，扫描得到的图象信噪比高，能真实而充分地反映抗原在花粉管内的分布情况，具有较大的实际应用价值。

1、一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法，包括以下步骤：

1) 用含多聚甲醛的磷酸缓冲液将花粉管固定后，用含纤维素酶和离析酶的酶解液酶解裸子植物花粉管，再用质量百分比浓度为 0.2%-1% 的 TritonX-100 或 NP-40 水溶液洗涤；

2) 将经步骤 1) 处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应，如检测到荧光，则裸子植物花粉管内含有该待测抗原并得到该待测抗原的定位情况。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述含多聚甲醛的磷酸缓冲液中，多聚甲醛的质量百分含量是 2-4%。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述固定花粉管用的多聚甲醛的质量百分比浓度为 2%，固定时间为 2 小时。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述含纤维素酶和离析酶的酶解液含有质量百分比浓度为 1.5-3% 的纤维素酶，质量百分比浓度为 1.2%-2% 的离析酶，pH 5-6、15 mM 2-吗啡啉乙磺酸，400 mM 甘露醇，5 mM 氯化钙和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述纤维素酶的质量百分比浓度为 1.5%，所述离析酶的质量百分比浓度为 1.2%。

6、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述酶解裸子植物花粉管的时间为 8-15 分钟，优选为 10 分钟。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，TritonX-100 的质量百分比浓度为 0.2%。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，所述经步骤 1) 处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应是将经步骤 1) 处理的花粉管转移到多聚赖氨酸包被的载玻片上，用牛血清白蛋白溶液在室温下封闭 1-2 小时，经含 0.2-1% Triton X-100 或 NP-40 的磷酸缓冲液充分洗涤后，在抗待测抗原的一抗中 0-4℃ 或室温下孵育 2-12 小时，转移到荧光标记的抗 IgG 的二抗溶液中在室温或 37℃ 下孵育 1-2 小时，用含 50% 甘油的磷酸缓冲液封片。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：所述一抗中孵育温度为 4℃；所述在二抗中孵育温度为 37℃，孵育时间为 1 小时。

10、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述裸子植物为松杉纲松科裸子植物；优选为白皮松或青扦。

一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法

技术领域

本发明涉及一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法,特别涉及一种利用荧光免疫技术检测裸子植物花粉管内抗原的方法。

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,携带和传递着精细胞到达胚珠,实现精卵结合,完成受精作用。花粉管是一种典型的具顶端生长特性且独立存在的单倍体细胞,在体外生长时呈现均一的柱状极性生长模式,因而被认为是生物技术领域研究极性生长的理想的细胞体系。另外,花粉管作为一个模式体系,对于深入研究细胞极性生长,细胞间相互作用以及信号传导也有重要意义。由于花粉管细胞壁主要由纤维素、胼胝质、果胶质等多糖类和一些蛋白质类物质组成,胞内抗原的检测定位受到胞壁物质的限制,外源物质很难进入胞内与抗原发生发应。另外,对于一些蛋白质抗原,由于在固定过程中很容易导致抗原失活,以及抗原抗体反应过程中所需的时间温度条件的限制,使得花粉管内抗原检测定位较难,且迄今还没有有关裸子植物花粉管内抗原检测定位的行之有效的方法,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检测裸子植物花粉管内抗原的方法。

本发明提供的检测裸子植物花粉管内抗原的方法,包括以下步骤:

1) 用含多聚甲醛的磷酸缓冲液将花粉管固定后,用含纤维素酶和离析酶的酶解液酶解裸子植物花粉管,再用质量百分比浓度为0.2%-1%的TritonX-100或NP-40水溶液洗涤;

2) 将经步骤1)处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应,如检测到荧光,则裸子植物花粉管内含有该待测抗原并得到该待测抗原的定位情况。

步骤1)中,为了获得更高的灵敏度和更高的信噪比,所述含多聚甲醛的磷酸缓冲液中,多聚甲醛的质量百分含量是2-4%。

所述固定的时间可为1-2小时。

所述固定花粉管用的多聚甲醛的质量百分比浓度优选为2%,固定时间优选为2小时。

所述含纤维素酶和离析酶的酶解液含有质量百分比浓度为1.5-3%的纤维素酶,

质量百分比浓度为 1.2%-2%的离析酶, pH 5-6、15 mM 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸 (MES), 400 mM 甘露醇, 5 mM 氯化钙和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂。

所述蛋白酶抑制剂可为 aprotinin, pepstatin A, chymostatin 或 leupeptin。

所述纤维素酶的质量百分比浓度优选为 1.5%; 所述离析酶的质量百分比浓度优选为 1.2%。

所述酶解裸子植物花粉管的时间可为 8-15 分钟, 优选为 10 分钟。

所述 TritonX-100 的质量百分比浓度优选为 0.2%。

所述纤维素酶可为市售的各种纤维素酶, 优选 cellulase R-10; 所述离析酶可为市售的各种离析酶, 优选 macerozyme R-10。

步骤 2) 中, 所述经步骤 1) 处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应是将经步骤 1) 处理的花粉管转移到多聚赖氨酸包被的载玻片上, 用 1-3% 牛血清白蛋白溶液在室温下封闭 1-2 小时, 经含 0.2%-1% 的 TritonX-100 或 NP-40 的磷酸缓冲液充分洗涤后, 在抗待测抗原的一抗中 0-4℃ 或室温下孵育 2-12 小时, 转移到荧光标记的抗 IgG 的二抗溶液中在室温或 37℃ 下孵育 1-2 小时, 用含 50% 甘油的磷酸缓冲液封片, 在荧光显微镜下观察结果。

所述在一抗中孵育温度优选为 4℃; 所述在二抗中孵育温度优选为 37℃, 孵育时间优选为 1 小时。

所述裸子植物可为白皮松、雪松, 青扦, 白扦等松杉纲裸子植物; 优选为松科裸子植物, 特别优选为白皮松和青扦。

所述磷酸缓冲液是以 10mM 磷酸盐, 138 mM 氯化钠, 2.7 mM 氯化钾配制的。

本发明的方法可以用现有的已知抗原制备抗该抗原的一抗, 或直接从商业途径获得该抗已知抗原的一抗, 通过免疫荧光反应检测裸子植物花粉管内有无该已知抗原。

本发明的方法中, 多聚甲醛能快速固定花粉管内蛋白质、DNA、质膜等成分, 而不破坏抗原。氯化钙可以保护原生质体膜的稳定性。纤维素酶可以酶解花粉内壁的纤维素成分, 而离析酶降解花粉内壁中的果胶质等组分, 从而可部分降解内壁, 同时 Triton X-100 可进一步透化细胞壁, 使得抗原抗体充分结合。由于花粉管较小, 将其黏附在多聚赖氨酸包被的载玻片上, 可达到固定抗原, 方便操作的目的。使用含 50% 甘油的磷酸缓冲液进行封片, 既可防止荧光快速淬灭, 同时价格低廉节省材料。本发明利用免疫荧光技术检测植物花粉管内抗原的方法克服了由于花粉管壁而无法标记胞内抗原的障碍, 同时优化各种反应条件, 抗原抗体结合充分, 标记效果好, 灵敏度高, 扫描得到的图象信噪比高, 能真实而充分地反映抗原在花粉管内的分布情况, 具有较大的实际应用价值。

附图说明

图1为在激光共聚焦扫描显微镜下观察到的G-protein在青扞花粉管质膜上的定位情况

图2为在激光共聚焦扫描显微镜下观察到的G-protein在白皮松花粉管质膜上的定位情况

具体实施方式

下述实施例中的方法如无特别说明，均为常规方法。

以下实施例中的百分比浓度，如无特别说明，均为质量百分比浓度。

实施例1、青扞花粉管内抗原的检测

取培养18h的青扞花粉管，用无菌水悬浮，制成花粉管悬浮液，进行如下步骤的处理：

1) 收集花粉管，用pH7.2 PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）重悬，然后重复此步骤一次；

2) 加入多聚甲醛，使其终浓度为2%（新鲜配制），室温孵育2h，吸去多聚甲醛，用pH7.2的PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）充分洗涤2次，每次5min；

3) 用含1.5%纤维素酶cellulase R-10（购自Yakult Honsha Co. Ltd）和1.2%离析酶macerozyme R-10（购自Yakult Honsha Co. Ltd）的酶解液（pH 5.5、15 mM Mes，400 mM 甘露醇，5 mM 氯化钙和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂（aprotinin，Calbiochem）酶解青扞花粉管10分钟，酶解后的花粉管立即用pH7.2，10mM 磷酸缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）洗涤；加入含0.2%Triton X-100的pH7.2的PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾），室温作用5 min后用pH7.2 PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）洗涤4次，每次5min；调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml，将花粉管悬液滴加到多聚赖氨酸包被的载玻片上，室温下静置10 min，然后用含有3%（3g/100ml）牛血清白蛋白的pH7.2、10mM PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）在室温下封闭1 h；

4) 用抗G蛋白抗体（Calbiochem）（用含1%牛血清白蛋白的10mM PBS将G蛋白抗体稀释到20-50 ug/ml）在4℃孵育12小时；用PBST（含有PBS缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）和0.05% TritonX-100）清洗10min，共3次。吸净液体，但不可干燥；加入异硫氰酸荧光黄（FITC）标记的二抗（Sigma，St. Louis，USA），37℃下孵育1h，同上用PBST清洗10min，清洗3次后吸干液体；

滴加 50 μ l 封固液（含有 50% (V/V) 甘油的 PBS 溶液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾））于载玻片上的花粉管上，加盖玻片，空气干燥 30min，荧光显微镜下观察、拍照。

相对于青扞花粉管设阴性对照：将青扞花粉管用免疫前动物血清代替一抗进行孵育，或省略一抗直接进行二抗孵育。结果如图 1 所示，表明 G-protein 主要定位于青扞花粉管质膜上，在顶端浓度最高（荧光最亮）。而设置的阴性对照并没有观察到荧光，说明本发明的方法是可靠的。

实施例 2、白皮松花粉管内抗原的检测

取培养 72h 的白皮松花粉管，用无菌水悬浮，制成花粉管悬浮液，进行如下步骤的处理：

1) 收集花粉管，用 pH7.2 PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）重悬，然后重复此步骤一次；

2) 加入多聚甲醛，使其终浓度为 4%（新鲜配制），室温孵育 1h，吸去多聚甲醛，用 pH7.2 的 PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）充分洗涤 2 次，每次 5min；

3) 用含 3% 纤维素酶 cellulase R-10（购自 Yakult Honsha Co. Ltd）和 2% 离析酶 macerozyme R-10（购自 Yakult Honsha Co. Ltd）的酶解液（pH 5.5、15 mM Mes，400 mM 甘露醇，5 mM 氯化钙和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂（pepstatin, Calbiochem）酶解白皮松花粉管 8 分钟，酶解后的花粉管立即用 pH7.2，10mM 磷酸缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）洗涤；加入含 0.2% Triton X-100 的 pH7.2 的 PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾），室温作用 5 min 后用 pH7.2 PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）洗涤 4 次，每次 5min；调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml，将花粉管悬液滴加到多聚赖氨酸包被的载玻片上，室温下静置 10 min，然后用含有 3%（3g/100ml）牛血清白蛋白的 pH7.2、10mM PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）在室温下封闭 1 h；

4) 用抗 G 蛋白抗体（Calbiochem）（用含 1% 牛血清白蛋白的 10mM PBS 将 G 蛋白抗体稀释到 20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）在 4℃ 孵育 12 小时；用 PBST（含有 PBS 缓冲液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯化钠，2.7 mM 氯化钾）和 0.05% TritonX-100）清洗 10min，共 3 次。吸净液体，但不可干燥；加入异硫氰酸荧光黄（FITC）标记的二抗（Sigma, St. Louis, USA），37℃ 下孵育 1h，同上用 PBST 清洗 10min，清洗 3 次后吸干液体；

滴加 50 μ l 封固液（含有 50% (V/V) 甘油的 PBS 溶液（10mM 磷酸盐，138 mM 氯

化钠, 2.7 mM 氯化钾)) 于载玻片上的原生质体上, 加盖玻片, 空气干燥 30min, 荧光显微镜下观察、拍照。

相对于白皮松花粉管设阴性对照: 将白皮松花粉管用免疫前动物血清代替一抗进行孵育, 或省略一抗直接进行二抗孵育。结果如图 2 所示, 表明 G-protein 主要定位于白皮松花粉管质膜上, 在顶端浓度最高(荧光最亮)。而设置的阴性对照并没有观察到荧光, 说明本发明的方法是可靠的。



图 1

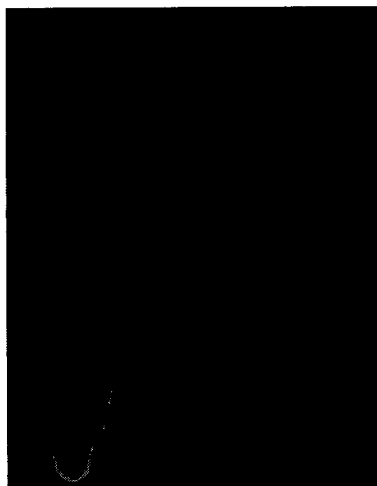


图 2

专利名称(译)	一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法		
公开(公告)号	CN1811433A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610003166.4	申请日	2006-02-20
[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 张凌云		
发明人	林金星 张凌云		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/76		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1811433B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测裸子植物花粉管内抗原的方法。该方法，包括以下步骤：1)用含多聚甲醛的磷酸缓冲液将花粉管固定后，用含纤维素酶和离析酶的酶解液酶解裸子植物花粉管，再用质量百分比浓度为0.2 - 1%的TritonX - 100或NP - 40水溶液洗涤；2)将经步骤1)处理的花粉管与抗待测抗原对应的抗体进行免疫荧光反应，如检测到荧光，则裸子植物花粉管内含有该待测抗原并得到该待测抗原的定位情况。本发明的利用免疫荧光技术检测植物花粉管内抗原的方法抗原抗体结合充分，标记效果好，灵敏度高，扫描得到的图象信噪比高，能真实而充分地反映抗原在花粉管内的分布情况，具有较大的实际应用价值。

