

冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用

张新成¹, 李志刚^{1*}, 李素丽¹, 林丽^{1,2}, 杨丽涛¹, 李杨瑞²

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西农业科学院, 南宁 530007)

摘要: 介绍了冰冻切片法研究植物微管骨架的一般程序和技术上的一些改进, 结果证明, 改进的冰冻切片技术, 可以对植物不同类型的细胞进行很好的标记。实验结果表明, 甘蔗正在迅速伸长的幼叶分布的微管类型主要是与细胞伸长轴方向垂直的周质微管, 幼叶基部尤其是第三幼叶基部分布的主要是与细胞伸长轴方向平行的周质微管。表明冰冻切片法在植物微管骨架的研究中具有广阔的应用前景。

关键词: 冰冻切片法; 植物微管骨架; 荧光显微镜; 免疫荧光标记; 甘蔗

中图分类号: Q944.66 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)02-0164-03

Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells

ZHANG Xin-Cheng¹, LI Zhi-Gang^{1*}, LI Su-Li¹,
LIN Li^{1,2}, YANG Li-Tao¹, LI Yang-Rui²

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: Plant Microtubule cytoskeletons have long been known to play a key role in plant morphogenesis. The general procedures and some improvements of cryosectioning method for the plant microtubule were detailed here. After fixation, microtubule arrays in various cells could be stained by using improved cryosection method. Transverse cortical microtubules to the axis of cells were the main microtubule arrays in the elongating young leaves, and longitudinal arrays to the long axis of the cells in the primordium, especially at the base of the third young leaf. The results indicate that the cryosectioning method is useful for investigating plant microtubule cytoskeleton.

Key words: cryosectioning method; plant microtubule cytoskeleton; fluorescence microscopy; Immunofluorescence staining; sugarcane (*Saccharum officinarum*)

微管(microtubule, MT)是真核生物细胞中的主要骨架成分之一, 在植物的生长、发育等生命过程中起非常重要的作用(Cyr, 1994)。微管除具有支持、胞内物质运输、参与有丝分裂活动外, 还在植物与环境、激素、病原菌等信号转导途径中发挥重要作用(Liu & Lu, 2000; Blancaflor 等, 2001; Genre & Bonfante, 2002; 陈志玲等, 2003)。因此, 对植物细胞微管骨架的研究已成为植物细胞生物学的一个重要内容, 而且研究内容也越来越深入。

Lloyd 等(1979)和 Wick 等(1981)最早建立了整体细胞的免疫荧光标记方法, 至今仍被许多研究者采用, 但是该方法主要适用于单细胞及幼嫩的组织细胞微管的定位。后来, 为了在组织水平上研究微管骨架在不同类型细胞中的分布, 出现了异丁烯酸树脂包埋切片法、BMM 半薄切片法、PEG 切片法和 Steedman's wax 切片法等(Gubler, 1989; Baskin 等, 1992; He 等, 2003; Liu 等, 2004)。这些方法由于使用了包埋介质, 往往对微管的抗原性有一定的

收稿日期: 2006-11-29 修回日期: 2007-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(30060038)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30060038)]

作者简介: 张新成(1979-), 男, 河南通许人, 硕士研究生, 植物学专业, 主要从事植物生理生化及结构植物学研究, (E-mail)zhangxinchengny@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lizhigangnn@163.com)

影响且费用高,或需要复杂的制片过程,从而使应用受到一定的限制。

冰冻切片是利用低温使组织迅速冻结达到一定的硬度进行切片的一种方法。具有快速、方便的特点,因其不经过脱水和透明等步骤,易保持生物体细胞的原有形态,尤其在免疫组织化学染色中,能较好的保存细胞抗原的免疫性,因此在免疫组织化学、原位杂交及酶定位中被广泛应用。冰冻切片法在植物微管研究中具有周期短、微管抗原性保护好、费用低等特点,因此,在植物微管研究中具有广阔的前景。本研究以甘蔗茎尖为例介绍冰冻切片法研究植物微管骨架的一般过程及技术上的改进。

1 材料和方法

1.1 材料

品种:粤糖 86/368 (*Saccharum officinarum* cv. Yuetang 86/368)。

1.2 方法

1.2.1 固定剂及固定液的选择 目前国内外报道的研究植物微管的固定液一般是 4% 的多聚甲醛溶液。由于甘蔗茎尖材料比较大并且细胞分化比较特殊,经过试验发现 9% 的甲醛溶液的渗透速度要明显好于 4% 多聚甲醛,对蛋白质抗原性的损伤也较小。配置固定液的缓冲液是 50 mmol/L Pipes (pH7.0),试验表明单一的 Pipes 缓冲液效果比 Pipes, EGTA, MgSO₄ (PEM) 三者的混合液对细胞形态的维持更好。

1.2.2 材料的固定及切片 取甘蔗伸长初期的甘蔗茎尖,剥去幼叶,在实体解剖镜下将包裹生长锥的几片大的幼叶剥去,仅保留生长锥附近的第 3 至第 6 片幼叶或叶原基。将甘蔗茎尖修成 4 mm × 1 mm × 4 mm 的组织块,即包括幼叶原基、生长锥、伸长区的初生增粗分生组织和部分成熟区,立即投入 9% 甲醛(50 mmol/L Pipes 配制, pH7.0)固定液中,并抽气 15~20 min,将材料从抽气机中取出,振荡摇动直至材料下沉为止。室温下继续固定 4~24 h, 然后进行如下处理:

将材料在 10% DMSO (二甲基亚砷) (50 mmol/L PBS, pH7.0 配制) 冲洗 3~5 次,每次 30 min,中间真空抽气 15~20 min。材料在最后一级冲洗液中停留 2~3 h,经上述处理过的材料在低温下切片可以得到很大的保护。冰冻切片机切片温度

为-25~-35 °C,切片厚度根据材料细胞的大小和样品的自发荧光来确定。甘蔗茎尖切片厚度为 15~20 μm。选取茎尖正中且典型的纵切片用 L-多聚赖氨酸(Sigma P8920)粘片,保存在 50 mmol/L PBS (pH7.0)中,4 °C 条件下保存一周不会失去微管的抗原性。

1.2.3 微管的免疫荧光标记 将切片从 PBS 中取出来进行如下处理:用含 2% Nonidet P-40 的去污剂处理 0.5 h 以增加细胞膜通透性,含 1% 纤维素酶和 0.5% 的果胶酶溶液处理 5 min,立即用 PBS 冲洗 3 次,每次 20 min。然后用 2% Nonidet P-40 的去污剂处理 30 min(以上溶液均用 50 mmol/L PBS 配制, pH7.0)。PBS 冲洗 3 次,每次 20 min。将切片在 anti-α tubulin 抗体(Sigma, 1:200, PBS 稀释,内含有 2% 小牛血清蛋白)中室温下孵育 1h。用相应的缓冲液冲洗 3 次,每次 30min。之后在 FITC 标记的兔抗鼠抗体(Sigma, 1:40, PBS 稀释)中室温下孵育 1 h。反应结束后用 PBS 冲洗 1~2 h,冲洗液更换 4~5 次。用含有 50% 甘油及 0.1% 的对苯二胺(PBS, pH8.5 配制)的封片剂封片。封好的片子在 4 °C 冰箱黑暗条件下可以保存 1~2 周,保存半个月以上抗体荧光大为减弱。

为了检验结果的真实性及观察样品的自发荧光,设置以下对照:a 不加一抗,b 不加二抗,c 一抗和二抗都不加。实验程序和上述完全一致。

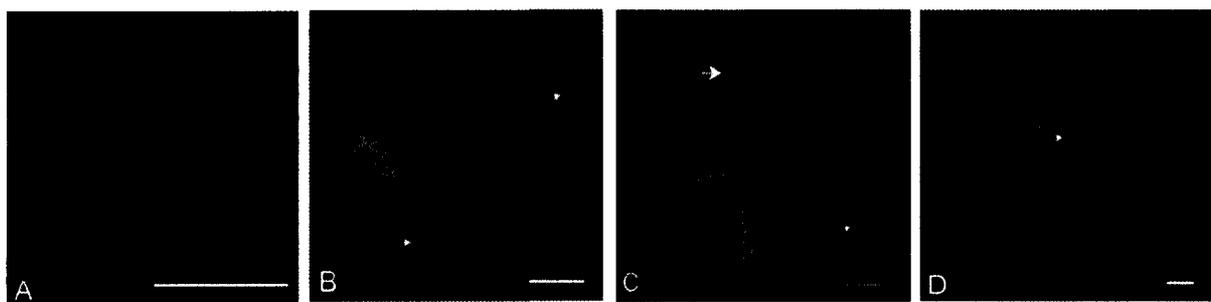
1.2.4 荧光显微镜的观察及图像的处理 制备好的片子在荧光显微镜下观察,所用显微镜型号为 Olympos BX51 型号(Japan),激发光为蓝光,物镜镜头为 100 倍油浸镜头。标记理想的图片利用 O-LYMPUS DIGITAL CAMERA DP70 采集,图片保存格式为 tif。图片的后期处理采用 Photoshop 7.0 编辑排版,高分辨率打印机彩色打印。实验结果见图版及其文字说明。

2 总结和展望及讨论

由于植物细胞的特殊性,如叶绿体及细胞壁中木质素的自发荧光,细胞壁的障碍限制抗体进入等因素的存在,植物微管的研究远远落后于动物微管的研究,而且研究成果常因植物种类而异(徐是雄等,1996)。植物微管在植物的生长发育等形态建成过程中起到非常重要的作用,要了解微管在植物形态建成中的作用,特别是深埋在植物组织或器官内

部的作用,必须有适合于微管研究方法的技术上的改进。植物茎尖由大量幼叶包裹,而且细胞分化也很特殊,分生细胞、各种成熟的细胞等都有分布,茎尖的微管骨架也很少被研究,其主要原因是缺少稳定、可靠和简便的方法。因此,长期以来,植物微管骨架的研究多集中在小孢子、根尖及表皮等材料上。植物茎尖材料的固定是最为重要的环节,试验结果表明9%的甲醛溶液的渗透速度及对微管抗原性的保护等方面要明显优于4%多聚甲醛溶液,尤其是在固定大的组织块时这种固定液的渗透效果非常好。冰冻切片的低温往往对细胞造成损伤,而材料

固定后利用10% DMSO处理可以在很大程度上减少对细胞的损伤。利用冰冻切片方法结合间接免疫荧光标记技术可以对甘蔗茎尖不同区域(包括分生区、伸长区和成熟区等)发育过程中的微管骨架进行结构和功能的研究,为单子叶植物甘蔗茎增粗机理提供微管动力学方面的实验依据,同时也为其它植物微管骨架的研究提供借鉴意义。本研究表明,改进的冰冻切片方法非常适合植物微管骨架的研究,特别是研究深埋在大的器官或组织块中的细胞,实验周期短,微管抗原性保护好。这一技术方法的建立对研究微管骨架在植物发育中的作用具有重要意义。



图版 I 利用冰冻切片技术结合间接免疫荧光技术标记的甘蔗茎尖不同区域细胞在荧光显微镜下的荧光图像

Plate I Photographs of shoot apex cells microtubule arrays in different regions of *Saccharum officinarum*, the shoot apices were fixed, cryosectioned and then stained by immunofluorescence technique, shoot axes point upwards

A. 甘蔗茎尖生长锥原套细胞的成膜体微管; B. 甘蔗茎尖第三幼叶基部的周质微管阵列,左下方箭头示和细胞伸长轴方向平行的纵向阵列微管,右上方箭头示和细胞伸长轴近垂直的周质微管阵列,其中央黑色区域为细胞核所在位置; C. 甘蔗茎尖处于正在伸长状态第一幼叶的微管阵列,左上方的箭头表示和细胞伸长轴垂直的周质微管,右下方箭头示刚刚形成的早前期微管带; D. 甘蔗茎尖伸长区原形成层束细胞的周质微管,微管和细胞伸长轴近斜向排列。Bar=4 μm

A. Phragmoplast microtubule array in the tunica of shoot tip in sugarcane; B. Cortical microtubules in the primordium of the third young leaf, the lower left arrow indicates the microtubules array longitudinal to the long axis of the cell, and the upper right arrow shows the more or less transverse cortical microtubule to the axis of cell, the hole in the middle to the cell shows the nucleus; C. Microtubule arrays in the first elongating young leaf of shoot apex in Sugarcane, the arrow in the upper left indicates the cortical microtubule were predominantly transverse to the long axis of the cell, and the arrow lower right shows the emerging preprophase band; D. Oblique cortical microtubules array to long axis of the procambial strand cell in the elongation zone in shoot apex of sugarcane. 1Bar=4 μm

致谢 真诚感谢日本奈良女子大学 Dr Sakaguchi、华南农业大学刘向东教授惠赠抗体及在实验技术方面的帮助;美国 Dr Tobias I. Baskin (University of Massachusetts) 为本实验提供十分有益的技术上建议及对图片细致的分析;中国农业大学袁明教授、李岩教授和中国林业科学院殷亚方博士、中国科学院微生物重点开放实验室陈志玲博士后、北京大学尤瑞麟教授等对本实验提供的帮助。

参考文献:

徐是雄,朱激. 1996. 植物细胞骨架[M]. 北京:科学出版社:84—93
Baskin T I, Busby C H, Fowke L C, et al. 1992. Improvement in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubule and other antigens throughout the developing or-

gans in plants of diverse taxa[J]. *Planta*, 187:405—413
Blancaflor E B, Liming Z, Harrison M J. 2001. Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme* [J]. *Protoplasma*, 217:154—165
Chen ZL (陈志玲), Ouyang HM (欧阳浩森), Liu XL (刘祥林), et al. 2003. The role of cortical microtubules in moss protonemal cells during dehydration/rehydration cycle (微管骨架在苔藓植物适应干旱胁迫应答中的功能研究[J]). *Chin J Biotech* (生物工程学报), 19(3):317—322
Cyr R J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array[J]. *Ann Rev Cell Biol*, 10:153—180
Genre A, Bonfante P. 2002. Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organization in the presence of a mycorrhizal fungus[J]. *Protoplasma*, 219:43—50
Gubler F. 1989. Immunofluorescence localization of microtubules (下转第 178 页 Continue on page 178)

而直径只有 0.5~0.7 cm。因此需要形成一种能很好适应其生理功能的内部结构。牛膝茎中存在有两种不同类型的异常结构,即正常维管系统外围的三生维管组织和髓中的髓维管束。其茎中的三生结构主要由导管、木纤维和径向厚壁结合组织组成,髓维管束的木质部和韧皮部都较发达,这些结构特征增强了机械支持和物质输导的功能,是适应其生理功能的结果。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社
- 胡正海,张泓. 1993. 植物异常结构解剖学[M]. 北京:高等教育出版社
- K 伊稍著,李正理译. 1982. 种子植物解剖学[M]. 上海:上海科学技术出版社
- Balfour E. 1958. Development of the vascular system *Macropiper excelsum* Forst. II. The mature stem[J]. *Phytomorphology*, **8**: 224-233
- Balfour E. 1965. Anomalous secondary thickening in chenopodiaceae, Nyctaginaceae and Amaranthaceae[J]. *Phytomorphology*, **15**(2):111-122
- Chen XM(陈晓明), Xu YJ(徐愿坚), Tian GY(田庚元). 2005. Physical-chemical properties and structure elucidation of AbPS isolated from the root of *Achyranthes bidentata* (牛膝多糖的理化性质研究及结构确证)[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), **40**(1):32-35
- Joshi A C. 1936. The anatomy of *Rumex* with species reference to the morphology of the internal bundles and the origin of the internal phloem in the Polygonaceae[J]. *Amer J Bot*, **23**(5):362-369
- Li JT(李金亭), Tan LL(谭玲玲), Hu ZH(胡正海). 2006. Anatomical study of *Achyranthes bidentata* roots(牛膝根的发育解剖学研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **26**(10):1973-1978
- Meng DL(孟大利), Li X(李铣), Xiong YH(熊印华), et al. 2002. Study on the chemical constituents of constituents of *Achyranthes bidentata* (中药牛膝化学成分研究)[J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), **19**(1):27
- Metcalf CR, Chalk L. 1950. Anatomy of the dicotyledons[M]. Oxford:Clarendon Press
- Studlome WP, Philipson WR. 1966. A comparison of the cambium in two woods with included phloem; *Heimeriodendron brunoneanum* and *Aricennia resinifera* N. Z[J]. *J Bot*, **4**(4):355-365
- Wei Y(卫云), Guo QM(郭庆梅), Ma ST(马书太), et al. 1997. An anatomical study of the root of *Achyranthus bidentata* (怀牛膝根内部结构的研究)[J]. *J Shandong Univ TCM* (山东中医药大学学报), **21**(6):452-455
- Zhang H(张泓), He ZH(胡正海). 1984. Anomalous secondary structures in the roots of medicinal plants(药用植物根中的异常次生结构)[J]. *J Northwest Univ* (西北大学学报), (4):59-66
- Zhang H(张泓), Hu ZH(胡正海). 1987. Developmental studied on the anomalous secondary thickening in the root of medicinal species of *Phytolacca acinosa* (药用植物商陆根中异常次生结构的发育解剖学研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), **7**(4):121-132
- Zhang H(张泓), He ZH(胡正海). 1988. A developmental anatomical study on in root of medicinal plants of *Achyranthes bidentata* (药用植物牛膝根中异常次生结构的发育解剖学研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **8**(2):85-91
- Zhang H(张泓), Zheng p(郑平), Hu ZH(胡正海). 1993. Histological differentiation of anomalous structure in the stem of *Cyathula officinalis* (川牛膝茎中异常结构的解剖学研究)[J]. *J Northwest Univ* (西北大学学报), **23**(4):360-365
- in plant root tips embedded in butyl-methyl methacrylate[J]. *Cell Bio Int Rep*, **13**(1):137-145
- He Q, You R L, Mwange K N K. 2003. Changes of the microtubule arrays during mitosis in prothallus cells of *Dryopteris crassirhizoma*[J]. *Acta Bot Sin*, **45**(2):193-199
- Liu XD, Lu YG. 2000. Effect of 2,4-D on microtubule reorientation in rice root tips[J]. *Acta Bot Sin*, **42**(4):367-372
- Liu XD, Lu YG, Zhu HL, et al. 2004. Abornal behavior of nuclei and microtubule(MT) organizational changes during embryo Sac development in the Poly-Egg Mutant, AHIV of Rice[J]. *Acta Bot Sin*, **46**(7):829-838
- Lloyd C W, Slabas A R, Powell A J, et al. 1979. Cytoplasmic microtubules of higher plant cells visualized with anti-tubulin antibodies[J]. *Nature*, **279**:239-241
- Wick S M, Seagull R W, Oshorn M, et al. 1981. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells[J]. *J Cell Biol*, **89**:685-69

(上接第 166 页 Continue from page 166)