

# 一种可用于分析水稻花药中钙调素蛋白 分布的胶体金免疫电镜标记技术

夏快飞<sup>1,2</sup>, 徐信兰<sup>1</sup>, 叶秀麟<sup>1\*</sup>, 梁承邨<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

**摘要:** 以水稻花药作为实验材料, 在前人应用胶体金技术标记钙调素蛋白(CaM)的基础上, 采用 Epon812 常规包埋方法, 并在标记过程及染色体系上做了一些改进, 建立了一套标记特异性较强且超微结构保存较好的花药中 CaM 的标记方法。

**关键词:** 钙调素; 胶体金免疫标记技术; 水稻; 花药

**中图分类号:** Q336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0085-03

## A modified immunogold-labeling technique for the localization of calmodulin protein in rice anthers

XIA Kuai-fei<sup>1,2</sup>, XU Xin-lan<sup>1</sup>, YE Xiu-lin<sup>1\*</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>1</sup>

(1. *South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;*

*2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*)

**Abstract:** A modified immunogold-labeling technique based on Epon812 embedding specimen is used to localize calmodulin to particular locations within rice anther. Both the labeling specific and the resolution of electron micrograph improved a little.

**Key words:** calmodulin; immunogold labeling electron microscopy; rice(*Oryza sativa* L.); anther

钙调素(Calmodulin, 简称 CaM)是一种广泛存在于真核生物中的钙依赖型多功能调节蛋白。植物的细胞生长、分化及植物体对多种体外环境刺激所产生的应激反应等都被证明与 CaM、与钙离子结合引起的反应有关(Raymond, 1998; Wayne 等, 1998)。对 CaM 在细胞内的分布及其功能的研究一直是钙信号转导研究的热点。由于 CaM 的分布具有时空及组织表达的差异性(Wayne 等, 1998), 因此确定 CaM 在植物细胞内的分布对于阐明 CaM 的功能具有重要意义。傅樱等(1998)及赵洁等(1998)采用免疫荧光方法已在烟草胚囊、小麦幼胚等细胞中做了 CaM 的定位研究。杨军等(2002)及李家旭

等(1989, 1992)用胶体金免疫电镜标记技术对水稻胚囊、玉米幼根中的 CaM 进行了定位研究, 但是尚未见到用此技术在植物花药中定位的研究报导。我们在前人研究的基础上建立了一种较为理想的 CaM 在花药中的胶体金免疫标记方法。

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 实验材料及试剂

珍汕 97 水稻保持系(珍汕 97B)花药作为实验材料; 抗 CaM 血清购自河北师范大学生物系; 10 nm 的金标羊抗兔 IgG 购自鼎国生物技术公司。

收稿日期: 2004-10-24 修回日期: 2005-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(30170061); 中科院院长基金(20003269)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170061); President Foundation of Chinese Academy of Sciences(20003269)].

作者简介: 夏快飞(1975-), 女, 湖南常德人, 博士研究生, 主要从事植物遗传方向的研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence)

## 1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 参照杨军等(2002)的方法略有修改。取珍珠油 97B 的水稻花药,先用甲苯胺蓝染色确定花药的发育时期,早期的花药用解剖刀切去两端,后期的花药从中间一切为二,迅速投入用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)配制的 3% 多聚甲醛(现配现用),2% 的戊二醛的固定液中 4℃ 固定

过夜。0.1 mol/L 磷酸缓冲液充分洗涤后,于 0.5% 锇酸室温固定 0.5 h,充分洗涤后系列酒精脱水,环氧丙烷过渡,Epon812 常规方法包埋。修块,Leica-S 切片机钻石刀切片,覆在 150 目的镍网上。

1.2.2 胶体金免疫标记及染色 参照杨军等(2002)、李家旭等(1989)的方法略有修改。(1)将覆有切片的镍网浸于蒸馏水中 5 min。(2)吸干水分,

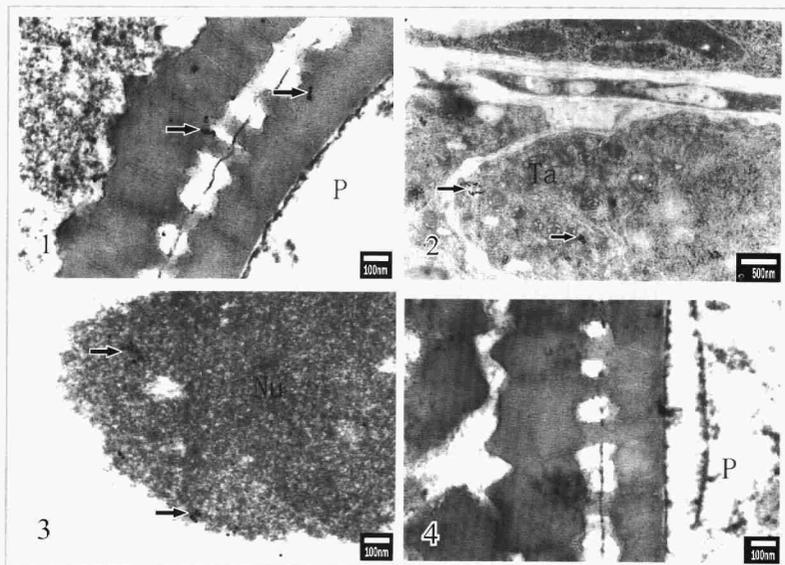


图 1-4 P: 花粉; Ta: 绒毡层; Nu: 细胞核。每一版图中的箭头所指为胶体金颗粒。1: 花粉壁上 CaM 的定位, bar=100 nm,  $\times 30\ 000$ ; 2: 药壁中 CaM 的定位, bar=500 nm,  $\times 30\ 000$ ; 3: 花粉细胞核中 CaM 的定位, bar=100 nm,  $\times 30\ 000$ ; 4: 孵育液中没有加抗 CaM 血清的对照图, bar=100 nm,  $\times 30\ 000$ 。

Figs. 1-4 P: pollen; Ta: tapetum; Nu: nucleolus. In each plate, arrows indicate the labeling gold particles. 1: Localization of CaM in pollen wall, bar=100 nm,  $\times 30\ 000$ ; 2: Localization of CaM in the anther wall, bar=500 nm,  $\times 30\ 000$ ; 3: Localization of CaM in nucleolus of pollen, bar=100 nm,  $\times 30\ 000$ ; 4: Control stained without anti-CaM serum in the incubation, bar=100 nm. Arrows indicate the gold particles,  $\times 30\ 000$ .

切片朝下于 10% 的  $H_2O_2$  中刻蚀 5 min。(3)吸干  $H_2O_2$ , 在 PBST(0.01 mol/L PBS, pH7.2; 0.1 mol/L NaCl; 0.02% Tween-20; 0.02%  $NaN_3$ ) 洗涤 3 次, 用封闭液(PBST 内含 0.2 mmol/L 甘氨酸, 1% 牛血清白蛋白)室温封闭 30 min。(4)PBST 洗涤 3 次, 用 PBST(内含 1% BSA) 稀释的抗 CaM 血清(1:100)30℃ 温育 1~2 h。(5)PBST 洗涤 3 次, 用封闭液(PBST 内含 0.2 mmol/L 甘氨酸, 1% 牛血

清白蛋白)室温封闭 30 min。(6)PBST 洗涤后用(PBST 内含 1% 牛血清白蛋白)稀释的 10 nm 金标羊抗兔 IgG(1:20)30℃ 温育 1 h。(7)双蒸水充分洗涤, 自然干燥。对照(1)用正常免血清代替抗 CaM 血清;(2)没有加抗 CaM 血清, 其余程序同上。切片经 2% 的醋酸双氧钨室温染色 60 min, 6% 柠檬酸铅室温染色 10 min, 用日立 JEM-1010 型透射电子显微镜观察并拍照。

## 2 实验结果及讨论

### 2.1 CaM 在水稻花药中的定位

在花药的花粉壁(图 1)、花药壁(图 2)、花粉细胞核(图 3)等处均能见到有胶体金颗粒的分布,其中绒毡层细胞有较多的胶体金分布(图 2),绒毡层在花药的整个发育过程中处于非常活跃的状态,通过绒毡层的解体提供给花粉发育所需的大量物质(Pacini 等, 1985),估计绒毡层细胞中 CaM 分布较多与此有着密切的关系。在花粉发育的单核期花粉内壁没有形成,在花粉外壁及花粉的细胞质中也含有较多的胶体金(图 1)。图 4 为对照,不见胶体金的分布。

### 2.2 标记过程对 CaM 标记的影响

钙调素是一种热稳定性蛋白,因此用 Epon812 包埋样品可以获得较好的特异性标记物,这曾被李家旭等人(1989)证实。我们主要对标记过程中的温度及时间的选择上做了一些比较研究,结果表明:(1)10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的处理时间:比较不同的样品处理时间和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度,发现用 10% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 5~10 min 即能得到较好的效果,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理时间过长或浓度过高会影响细胞的超微结构。(2)抗体标记过程中标记的温度、时间直接影响抗体标记的特异性与标记效果:我们比较了 30、37 °C 下分别标记 1、2、2.5、4 h 抗体标记特异性,30 °C 下标记 1~2 h 即可达到较好的特异性标记,标记温度不宜太高,标记时间超过 2 h 后标记密度基本没有增加,故标记时间达到 2 h 即可。(3)在胶体金免疫标记之前于 30 °C 用阻断液阻断 30~60 min 可有效的防止非特异性的标记。(4)染色时间:我们通过多次的实验发现 2% 的醋酸双氧铀染色 60 min,及 6% 的柠檬酸铅染

色 10 min 能够达到较好的细胞染色效果,细胞结构反差适度且不影响胶体金颗粒的观察。

### 参考文献:

- Fu Y(傅 纛),Chen YF(陈以峰),Liang SP(梁世平),*et al.* 1998. Immuno-localization of calmodulin in unfertilized and fertilized embryo sacs in *Nicotiana tabacum* var. *macrophylla*(烟草受精前后胚囊中钙调素的免疫细胞化学定位)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),**40**(8):683-687.
- Li JX(李家旭),Liu JW(刘杰文),Sun DY(孙大业). 1989. Localization of calmodulin in corn root tip cells by protein A-Gold immunoelectron microscopy(玉米根尖细胞内钙调素的胶体金免疫电镜研究)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通报),**6**:44-45.
- Li JX(李家旭),Liu JW(刘杰文),Sun DY(孙大业). 1992. The protein A-Gold labelling technique of calmodulin in plant cells(植物钙调素的免疫金标记电镜技术)[J]. *J Chinese Electron Microscopy Societ*(电子显微学报),**11**(2):100-103.
- Pacini E, Franchi GG. 1985. The tapetum; its form, foundation, and possible phylogeny in Embryophyta[J]. *Plant Syst Evol*,**149**:155-185.
- Raymond EZ. 1998. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*,**49**:697-725.
- Wayne AS, Hillel F. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment[J]. *Trends in Plant Science*,**3**(8):298-303.
- Yang J(杨 军),Zhao J(赵 洁),Liang SP(梁世平),*et al.* 2002. Changes of calmodulin distribution in the embryo sac *Oryza sativa* before and after fertilization; an immunogold electron microscope study(水稻受精前后胚囊内钙调素分布的变化:免疫金电镜观察)[J]. *Act Bot Sin*(植物学报),**44**:246-272.
- Zhao J(赵 洁),Zhou C(周 嫦),Yang HY(杨弘远). 1998. Distribution of membrane-bound calcium and actived calmodulin in isolated zygotes and young embryos of *Triticum aestivum*(小麦分离合子与幼胚中膜钙和钙调素的分布)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),**40**(1):28-32.

(上接第 106 页 Continue from page 106)

### 参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1997. 《中国植物志》第四十三卷第二分册[M]. 北京:科学出版社,第 1 版,16.
- 国家医药管理局中草药情报中心站. 1986. 植物有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,182-183.
- 温尚开. 1991. 两面针及其伪品的比较鉴别[J]. *时珍国药研究*,**2**(1):20-22.
- Cheng YX(程永现),Lei ML(雷茂林),Zhou J(周 俊). 2002. Sesquiterpenoids from *Michelia lacei* and their chemotaxonomic significanxe(壮丽含笑中的倍半萜成分及其化学分类学意义)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),**24**

(1):129-132.

- Chen X(陈 晓),Wei FX(魏福祥),Qu YH(瞿延辉). 2003. Development in the study of elemenc-the active of principle of *Rhizoma curcumae*(莪术中有效成分——榄香烯的研究进展)[J]. *Hebei Chemical Engineering and Industry*(河北化工),**(6)**:9-13.
- Yan JH(阎建辉),Tang KW(唐课文),Xu Y(许 友),*et al.* 2003. Analysis of chemical component of volatile oil from *Zanthoxylum bugeanum* Maxin by GC/MS(GC/MS 法分析花椒挥发油的化学成分)[J]. *J Chin Mass Spectrometry Society*(质谱学报),**24**(2):326-331.