

文章编号: 1001-411X(2001)04-0052-03

研究植物胚囊中微管的 PEG 切片法的改进

朱洪亮¹, 刘向东¹, 卢永根¹, 徐是雄²

(1 华南农业大学植物分子育种研究中心, 广东 广州 510642; 2 香港大学植物学系, 香港 薄扶林道)

摘要: 经改良的 PEG 切片法, 操作简单易行, 观察结果清晰. 水稻子房经固定、脱水、包埋、切片、真空粘片法粘片、荧光抗体标记等处理后, 在激光共聚焦扫描显微镜下观察胚囊中的微管并拍照. 传统粘片法(如多聚赖氨酸粘片法)中的粘片剂阻碍了抗体与微管的结合(致使微管不易被标记出), 本文提出的真空粘片法从根本上解决了这一问题, 这一新的粘片方法的采用, 是使 PEG 切片法的观察效果获得了较大改进的主要原因. 真空粘片法的一个最主要特点是不需要粘片剂, 该法解决了由粘片剂所引起的一系列问题, 适用于即需粘片、而粘片剂又影响以后操作的情况, 有较大的推广价值.

关键词: 真空粘片; PEG; 微管; 胚囊

中图分类号: Q944

文献标识码: A

植物胚囊被胚珠组织和子房壁包裹着, 对其进行研究比较困难. 要观察胚囊中的微管, 在保证胚囊结构完整的基础上, 还必需保证其中的微管不被破坏并被标记显示. 到目前为止, 研究植物胚囊中微管的方法主要有两种, 即胚囊分离法和切片法. 胚囊分离法已有许多成功的报道^[1~9], 但胚囊分离的难度很大, 特别是对于一些胚囊较小的植物. 另外, 胚囊分离法还存在分离出的胚囊的结构易发生改变, 以及由于胚囊壁的障碍使胚囊内部的一些微管不易标上等, 所以也有一定的缺陷. 切片法^[10, 11] 最早成功的例子是 Bednara 等^[10] 提出的 PEG 切片法, 但他们应用该切片法观察大孢子发生期间的微管骨架变化效果并不理想. 从 1998 年开始, 我们开展水稻蓼型及变异型胚囊的微管骨架研究, 在 Bednara 等^[10] 的 PEG 切片法基础上进行改进, 建立了适合水稻胚囊微管研究的 PEG 包埋方法, 并获得良好的效果, 为该法的推广应用奠定了基础.

1 材料与方法

参照 Bednara 等^[10] 提出的 PEG 包埋切片法进行改进. 具体步骤如下:

1.1 材料固定

以多胚水稻(*Oryza sativa* L.) 品系 AP IV 为材料, 取不同发育时期的子房, 在普通解剖镜下解剖出胚珠, 在 φ 为 4% 聚甲醛(含 φ 为 10% 二甲基亚砷、 φ 为 1% 微管稳定剂、 φ 为 0.01% TritonX-100, PEMS 缓冲液配制, pH7.2) 固定液室温固定 1~2 h.

1.2 脱水与包埋

室温 25℃ 下系列乙醇脱水(φ 分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%, 每级 30 min), 再换 1 次 φ 为 100% 乙醇, 逐渐升温至 55℃ 左右, 转入 55℃ 恒温烘箱, 30 min 后转入渗透剂 I [PEG 混合液($V_{\text{PEG4000}}:V_{\text{PEG1500}}=1:3$, 下同):无水乙醇=1:2($V:V$, 下同)], 30 min, 55℃; 转入渗透剂 II (PEG 混合液:无水乙醇=1:1), 30 min, 55℃; 转入渗透剂 III (PEG 混合液:无水乙醇=2:1), 30 min, 55℃; 转入包埋剂(PEG 混合液), 30 min, 55℃; 再换 1 次 PEG 混合液, 30 min, 55℃, 2 h 后转入含有新鲜 PEG 混合液, 用 0.5 mL 离心管室温冷却聚合.

1.3 切片与粘片

普通旋转切片机切片, 厚度 30~50 μm . 真空粘片, 具体方法是将切片按顺序放置到滴有蒸馏水的载玻片上, 换 2~3 次水洗掉 PEG, 将载玻片转移到真空泵中抽真空, 25 min 后取出载玻片, 此时的切片就牢牢地粘附着在载玻片上, 由于此法首次被提出并使用, 所以笔者暂称之为“真空粘片法”(下同).

1.4 标记与观察

将粘有材料的载玻片用 0.1 mol/L NH_4Cl 处理 3 min; PBS 洗 3 次(每次 5 min); φ 为 0.1% Tween 20 处理 20 min; ω 为 1% BSA (牛血清白蛋白) 处理 10 min; 微管抗体 1 (anti- α tubulin, P9026, sigma, PBS 稀释 100 倍) 标记 1 h, 37℃; PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 微管抗体 2 (anti-mouse IgG, F0257, Sigma, PBS 稀释 200 倍) 标记

收稿日期: 2000-11-21

作者简介: 朱洪亮(1974-), 男, 硕士, 现为华中科技大学生命科学与技术学院博士研究生.

通讯作者: 刘向东(1965-), 男, 教授, 博士.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600008); 霍英东教育基金项目(71021).

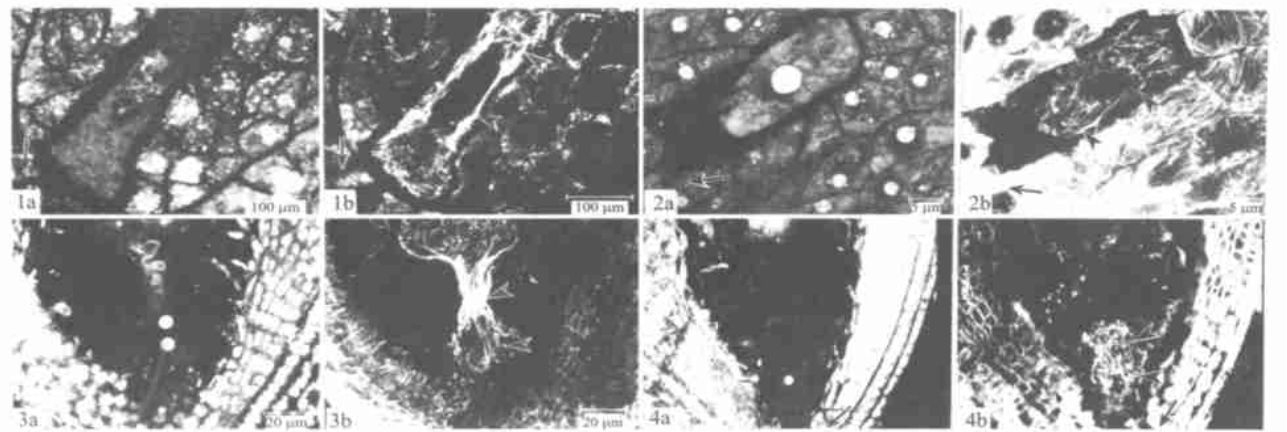
1 h, 37 ℃; PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; PI(碘化丙啶)染色 1 min; PBS 冲洗 3 次; ATF (anti-fading fluorescence solution)封片; Leica 共焦激光扫描显微镜进行双频道扫描观察并拍照.

2 结果与分析

运用上述改良的 PEG 方法, 观察到水稻蓼型胚囊形成与发育的一系列过程, 不但胚囊结构完整, 核

清楚, 而且微管分布排列状况也很清晰(图 1). 图 1 表明改良 PEG 法不但可用来观察大孢子发生之前各时期的微管骨架, 还可用来观察大孢子发育直至成熟胚囊中的微管骨架. 其中大孢子发育之后各时期的微管是首次应用 PEG 法被观察到的.

切片法观察微管必须选用不破坏微管的包埋剂. 常规的包埋剂(如石蜡), 虽然切出的胚囊结构非常完整, 但它们破坏微管, 所以不能使用. 酮溶



照片珠孔端朝左下方(箭)或右下方(箭). a 为 PI 染色, 示细胞组织结构; b 为免疫荧光染色, 示微管(箭头)The figures are arranged so that the micropylar ends (arrow) are pointed to the left-downwards or right-downwards. Photographs labelled "a" are stained by PI, showing structure of cell; photographs labelled "b" are stained by immunofluorescence showing microtubules (arrow head).
1a. 大孢母细胞 macrospore mother cell, 1b. 大孢子细胞中微管 microtubules of macrospore mother cell, 2a. 单核胚囊, one-nucleated embryo sac, 2b. 单核胚囊中微管 microtubules of one-nucleated embryo sac, 3a. 中期八核胚囊 middle stage eight-nucleated embryo sac, 3b. 中期八核胚囊中微管 microtubules of middle stage eight-nucleated embryo sac 4a. 卵细胞 egg cell (× 730), 4b. 卵细胞中微管 microtubules of egg cell (× 730)

图 1 改良 PEG 切片标记的微管骨架图照
Fig. 1 Photographes of microtubule labelled by modified PEG section

性塑料包埋剂, 如 butyl-methyl methacrylate, Gubler 等^[12]曾用该包埋剂观察植物根尖中的微管, 笔者也试用于水稻胚囊微管的研究, 但胚囊结构破坏严重, 特别是卵细胞, 几乎观察不到. 最后改用 PEG 包埋法, 结果表明改良 PEG 法基本上克服以上问题, 另外, 与胚囊分离法相比, 改良 PEG 法操作较为简便易行, 容易推广; 胚囊内部微管标记较为清晰. 由于 PEG 是水溶性的, 包埋剂成分极易洗脱, 抗原保存较好, 所以改良 PEG 法不但可用于细胞骨架研究, 还可望用于特定物质时空定位和特异基因时空表达等研究, 具有广阔的应用前景.

至于 Bednara 等^[10]提出的 PEG 包埋法为何一直未得推广, 从本文研究来看, 可能有两方面原因: 一是标记效果不佳, 二是粘片技术不过关. 经过笔者的反复试验, 发现以上问题主要是由于采用多聚赖氨酸粘片引起的, 多聚赖氨酸粘片经常会出现 2 种情况: 一是切片大量脱落, 这主要由于 PEG 干扰了粘片, 使洗脱后的切片无法与载玻片粘合而脱落. 这种

情形主要是发生在已用多聚赖氨酸包裹好的玻片 (slide coated with polylysine solution) 上. 二是抗原标记受影响, 使标记信号不清或根本没有信号, 这主要发生在直接用多聚赖氨酸溶液粘片的情形中, 原因是过多的多聚赖氨酸覆盖了微管抗原. 针对 Bednara 等^[10]的 PEG 包埋切片法存在的主要问题, 笔者在以下 3 个方面作了改进:

①使用新的粘片法, 即真空粘片法. 由于该法中无粘片剂, 且粘片成功率极高, 所以从根本上解决了粘片剂影响抗体标记的问题. 该法简单、易掌握, 标记效果好, 不但适用于微管研究, 还适用其他同类需粘片研究, 所以具有一定的推广价值.

运用真空粘片法必须注意的是, 粘好的切片不应在空气中放置太久, 以防抗原被氧化而变性. 一般来讲, 放置的时间不超过 3 d.

②在标记前预处理中增加了 Tween 20 和 BSA 处理, 一方面以增加抗体的渗透, 使之与抗原能更充分地结合, 另一方面以减少抗体的非特异性附着, 使得

荧光标记特异信号相对加强。

③调整不同分子量 PEG 的比例, Bednara 等所用 PEG 混合液中, PEG4000 与 PEG1500 的比例为 1:2, 本文改用 1:3 的比例, 克服了原有比例混合液凝固后太硬和易碎的缺点。另外改用普通刀片切片。

④进行了厚切片, 厚度最大达 50 μm , 基本上包括了整个胚囊, 所以不但可获得分离胚囊法整体微管分布的形象, 还可清楚显示胚囊内部的微管结构(用分离胚囊法难以获得的结果)。

致谢: 华南农业大学徐雪宾教授和吴鸿教授为本文提出许多宝贵的意见。俞淑红同志参加部分材料固定工作。在此一并致谢!

参考文献:

- [1] XU S X, HUANG B Q, YE X L, et al. Changes of microtubular organization during the embryo sac development in rice[J]. Acta Botanica Sinica, 1997, 39(10): 889—893.
- [2] XU X, YE X L. Changes in the microtubular cytoskeleton during megagametogenesis in the embryo sac of *Cymbidium sinense*[J]. Chinese J Bot, 1995, 7(2): 126—132.
- [3] ZEE S Y, YE X L. Changes in the pattern of organization of the microtubular cytoskeleton during megasporogenesis in *Cymbidium sinense*[J]. Protoplasma, 1995, 185: 170—177.
- [4] WEDD M C, GUNNING B. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*: II. The cytoskeleton during megagametogenesis[J]. Sex Plant Reprod, 1994, 7: 153—163.

- [5] HUANG B Q, SHERIDAN W F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte* mutant: Abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization[J]. The Plant Cell, 1996, 8: 1391—1407.
- [6] HUANG B Q, SHERIDAN W F. Female Gametophyte in maize: Microtubular organization and embryo sac polarity[J]. The Plant Cell, 1994, 6: 845—861.
- [7] HUANG B Q, RUSSELL S D. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: Cytoskeletal modifications in embryo sac during synergid degeneration[J]. Planta, 1994, 194: 200—214.
- [8] 叶秀麟, 扬子德, 徐是雄, 等. 鹤顶兰胚囊发育过程中微管变化的共焦显微镜观察[J]. 植物学报, 1996, 38(9): 677—685.
- [9] BEDNARA J, WILLEMSE M T M, VANLAMMEREN A A M. Organization of the actin cytoskeleton during megasporogenesis in *Gasteria verrucosa* visualized with fluorescent-labelled phalloidin[J]. Acta Bot Neerl, 1990, 39(1): 43—48.
- [10] BEDNARA J, VANLAMMEREN A A M, WILLEMSE M T M. Microtubular configurations during meiosis and megasporogenesis in *Gasteria verrucosa* and *Chamaenerion angustifolium*[J]. Sex Plant Reprod, 1988, 1: 164—172.
- [11] WEDD M C, GUNNING B E S. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. I. Megasporogenesis including the microtubular cytoskeleton[J]. Sex Plant reprod, 1990, 3: 244—256.
- [12] GUBLER F. Immunofluorescence localisation of microtubules in plant root tips embedded in butyl-methyl methacrylate[J]. Cell Biol Int Rep 1989, 13: 137—145.

Improved Method of PEG Embedding Section Being Used in Investigating Microtubules in Plant Embryo Sac

ZHU Hong-liang¹, LIU Xiang-dong¹, LU Yong-gen¹, XU Shi-xiong²

(1 Plant Molecular Breeding Research Center, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Department of Botany, the University of Hong Kong, Pokfulam Road Hong Kong)

Abstract: Improved PEG embedded section method was described. The method made it easy to operate and the results were obviously clearer. Ovaries of rice were conducted by fixing, dehydrating, embedding by PEG in small centrifuge tube, cutting section by razor, vacuum gluing section, labeling by fluorescence antibody, and then microtubules in embryo sac were observed and photographed by confocal laser scanning microscopy. The former gluing section methods (such as poly-lysine gluing section method) blocked severely the conjuncting between microtubules and antibodies, vacuum gluing section method being founded by us resolved the problem, the new gluing section method was the main reason leading to improvement of results. One most obvious feature of vacuum gluing section method was without sticker. The method resolved all problems caused by sticker, and the method was suitable for the situation that needed gluing section but sticker blocked the later conducting, and the method was possible to be widely used in other researches.

Key words: vacuum gluing section; PEG embed; microtubule; embryo sac

【责任编辑 周志红】