

黄瓜幼叶细胞中钙调素的免疫胶体金定位

田景花 张 红 李 明 王 梅

(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘 要: 采用免疫胶体金电镜技术对黄瓜幼叶叶肉细胞中的钙调素 (CaM) 进行定位。结果表明: 适温下生长的黄瓜幼苗叶肉细胞中的 CaM 主要分布于细胞核和叶绿体内, 细胞核中 CaM 主要存在于染色质和核仁上, 叶绿体中 CaM 主要存在于类囊体膜上; 线粒体中也有一定量的 CaM 分布; 细胞质、液泡、液泡膜及质膜上只有少量 CaM 存在; 而细胞壁和细胞间隙却很难发现显示 CaM 存在的金颗粒。

关键词: 黄瓜; 钙调素; 免疫胶体金; 透射电镜技术

中图分类号: S 642.2; Q 336 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0728-03

1 目的、材料与方法

研究植物细胞中钙调素 (CaM) 的分布对揭示 CaM 的作用位点有重要意义。前人采用不同植物、不同组织以及不同的研究方法得出的 CaM 分布情况存在一定差异, 而关于植物绿色组织中 CaM 的定位研究更少。本研究采用免疫胶体金电镜技术对无土育苗法培育的黄瓜幼苗叶肉细胞中的 CaM 进行定位。免疫电镜技术参照张丰德等^[1]的方法并改进: 取第 3 片真叶 (约 2 cm × 2 cm) 中部的组织块 (0.5 mm × 1 mm), 迅速投入 0.05 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (PBS, pH 7.2) 配制的 2.5% 戊二醛与 2% 多聚甲醛组成的混合固定液中, 抽气, 室温 (22℃) 下固定 1 h, 再于 4℃ 固定 4 h。漂洗, 乙醇梯度脱水后, 用低温水溶性包埋剂 Lowicryl K₄M 置换、渗透、聚合。制备超薄切片, 进行 CaM 的免疫金染色。阻断液为 0.02 mol/L PBS (pH 7.2) 配制的 4% BSA (德国 B.M. 公司产), 室温下阻断 2 h。用 0.02 mol/L 的 PBSB (0.02 mol/L PBS, 0.5% BSA) 稀释 I 抗 (兔抗小麦 CaM 血清, 河北师范大学生物系细胞室制, 工作浓度 1:60), 在 I 抗液滴上室温孵育 1.5 h, 对照切片用 0.02 mol/L 的 PBSB 代替 I 抗; II 抗为胶体金标记的羊抗兔 IgG (北京中山生物技术有限公司, 粒径 10 nm, 工作浓度 1:100), 载网于 II 抗液滴上室温孵育 30 min。洗涤, 醋酸双氧铀染色, JEM-100SX 型透射电镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 固定剂和包埋剂的选择

电镜观察结果表明: 在未加 I 抗的对照切片中, 很难找到金颗粒 (图版, 1), 而在 I 抗处理过的切片中看到有一定量的金颗粒分布 (图版, 2~4), 这说明处理切片中的金颗粒是 CaM 存在的真实反映。

利用免疫胶体金电镜技术的关键是能否使植物材料抗原性和超微结构保存良好, 其中抗原性的保存最为重要, 因此要选用合适的固定剂和包埋剂。一般选用较柔和的固定剂^[1], 如本研究选用的戊二醛和多聚甲醛。戊二醛对超微结构保存较好, 而多聚甲醛对抗原性的保存优于戊二醛。避免使用四氧化锇, 防止抗原性的丧失。但是由于戊二醛和多聚甲醛只对碳水化合物和蛋白质保存较好, 对脂类的保存效果较差^[1], 在一定程度上影响了细胞内膜系统的清晰度。另外, 常规树脂包埋由于高温聚合常使一些组织抗原性部分或全部丧失, 环氧树脂中的环氧基可能改变某些抗原的性质。因而选择采用低温水溶性包埋剂 Lowicryl K₄M 更有利于抗原活性的保存^[1], 但 Lowicryl K₄M 对超微结构保存不利。同

收稿日期: 2002-10-09; 修回日期: 2002-12-06

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (397145)

时, 醋酸双氧铀对膜结构的染色效果较差, 也影响了图像的反差和清晰度^[2], 但采用双染法易生成铅沉淀污染切片而干扰金颗粒的观察。本研究着重采用了适宜保存抗原性的固定剂和包埋剂, 结果表明对抗原性保存良好, 用低浓度的 I 抗、II 抗和较短的反应时间就能观察到较多的金颗粒, 结果的可信度更高, 而细胞中以脂类为主要成分的膜结构清晰度较差, 反差较弱, 但不影响各亚细胞结构的准确辨认。

2.2 黄瓜幼叶细胞中 CaM 的分布

适宜生长温度下的黄瓜幼叶叶肉细胞中, 显示 CaM 存在的金颗粒主要出现在细胞核和叶绿体中, 细胞核中 CaM 主要存在于染色质和核仁中 (图版, 4), 叶绿体中的 CaM 主要存在于类囊体膜上; 线粒体中也有一定量的 CaM 存在; 而细胞质、液泡、液泡膜及质膜上金颗粒密度很小 (图版, 2~4); 细胞壁和细胞间隙却很难发现显示 CaM 存在的金颗粒 (图版, 3)。此研究验证了前人用其他方法得到的部分结果, 但也存在一些差异, 如 Dauwalder 等^[2]采用免疫荧光法发现燕麦黄化苗中的 CaM 在胚芽细胞的细胞质和核质以及根冠细胞的造粉质体上均有标记物荧光, 但未能在细胞壁及核仁中观察到阳性荧光。李家旭等^[3]利用免疫胶体金电镜技术以锇酸后固定, Epon812 做包埋剂定位了玉米根尖细胞中的 CaM, 发现在根冠细胞的细胞核、线粒体、质膜内侧以及造粉质体的淀粉粒等部位均标记有金颗粒, 细胞壁上也标记有少量金颗粒。Muto^[4]以生化方法测得小麦叶细胞中 CaM 大部分存在于细胞溶质, 只有小部分存在于线粒体、叶绿体和微粒体中。笔者认为这些差异一方面可能是由于不同试验方法的局限性造成的, 另一方面可能是由于不同的植物材料或组织中 CaM 分布的确存在差异。这也意味着 CaM 可能与不同植物材料或组织特定的生命活动密切相关, 如根尖细胞的细胞核和线粒体中有一定量的 CaM 分布, 可能与根尖细胞的旺盛分裂及呼吸作用有关; 而黄瓜幼叶细胞的主要功能是进行细胞分裂和光合作用, 在其细胞核及叶绿体中有较多的 CaM 分布, 可能是 CaM 参与细胞分裂及光合作用的直观证据; 线粒体中的 CaM 分布应该与幼叶旺盛的呼吸作用有关; 细胞溶质中 CaM 浓度很低, 其功能可能是通过直接影响其靶酶活性或通过对蛋白质磷酸化过程的控制来调节细胞生理过程; 而质膜及液泡膜上的 CaM 可能对维持细胞溶质内低 Ca^{2+} 水平有重要意义。

参考文献:

- 1 张丰德、王秀玲. 现代生物学技术. 天津: 南开大学出版社, 2001. 52~74, 107~114
- 2 Dauwalder M, Roux S J, Hardison L. Distribution of calmodulin in pea seedlings: immunocytochemical localization in plumules and root apices. *Planta*, 1986, 168: 461~470
- 3 李家旭、刘杰文、孙大业. 玉米根尖细胞内钙调素的胶体金免疫电镜定位. *植物生理学通讯*, 1989, (6): 44~45
- 4 Muto S. Distribution of calmodulin with wheat leaf cells. *FEBS Lett.*, 1982, 147: 161~164

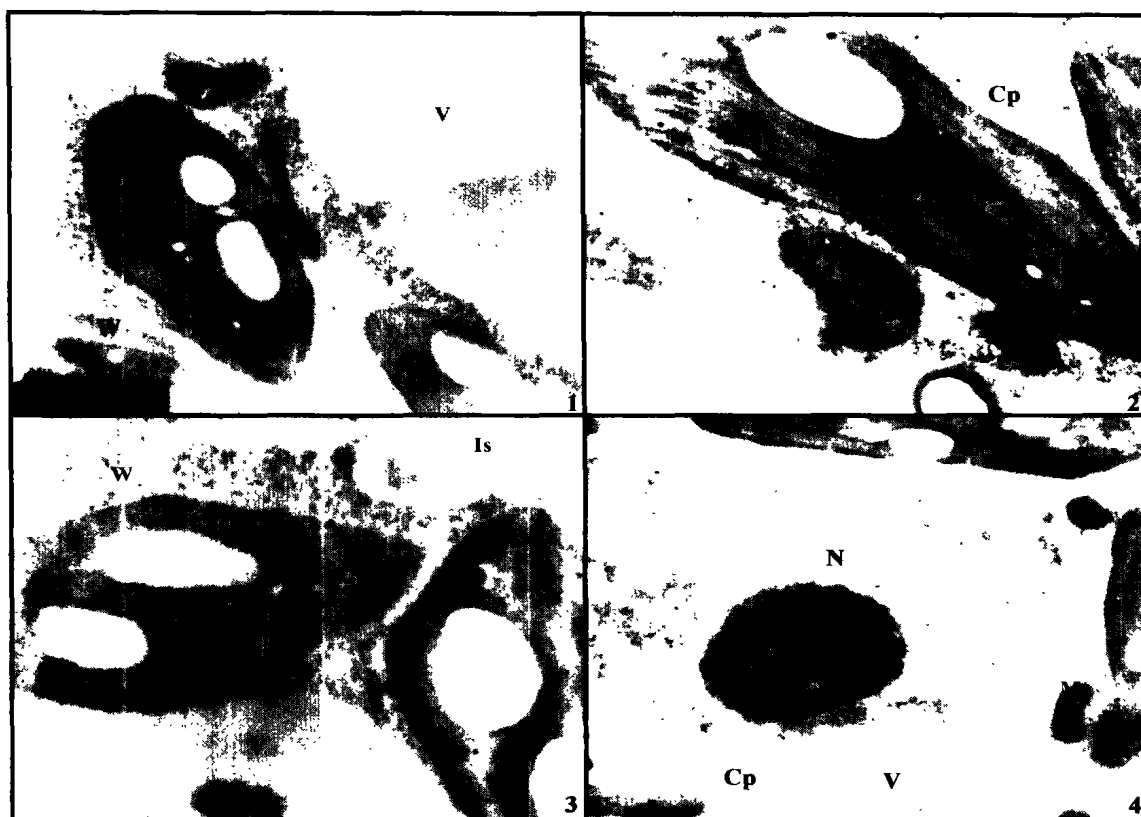
Immunity Colloidal Gold Localization of Calmodulin in Cucumber Young Leaf Cells

Tian Jinghua, Zhang Hong, Li Ming, and Wang Mei

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

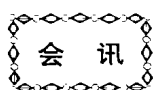
Abstract: Using glutaraldehyde and paraformaldehyde as fixative and Lowicryl K₄M as embedding medium, the immunity colloidal gold localization of calmodulin (CaM) in cucumber young leaf cells was investigated by transmission electron microscope. The results were as follows: at the optimal growth temperature, CaM mainly distributed in nucleus and chloroplast. In addition, there was some CaM in mitochondria, a little in cytoplasm, vacuole, tonoplast and plasma membrane. However, it was difficult to find CaM in cell wall and intercellular space.

Key words: Cucumber; Calmodulin; Immunity colloidal gold; Transmission electron microscope



图版说明 黄瓜幼叶细胞中钙调素的免疫胶体金定位 1. 不加 I 抗的对照切片 (15000 \times); 2. 叶绿体、线粒体及细胞质中 CaM 的分布情况 (24000 \times); 3. 叶绿体、液泡、细胞质、细胞壁及细胞间隙中 CaM 的分布情况 (21000 \times); 4. 细胞核、细胞质及液泡中 CaM 的分布情况 (13200 \times). V: 液泡; Ch: 叶绿体; N: 细胞核; W: 细胞壁; Is: 细胞间隙; Mt: 线粒体; Cp: 细胞质。

Explanation of plates The immunity colloidal gold localization of CaM in cucumber young leaf cells 1. The section treated without antibody 1 (15000 \times). 2. The distribution of CaM in Ch, Mt and Cp (24000 \times). 3. The distribution of CaM in Ch, V, Cp, W and Is (21000 \times). 4. The distribution of CaM in N, Cp and V (13200 \times). V: vacuole; Ch: chloroplast; N: nucleus; W: wall; Is: intercellular space; Mt: mitochondria; Cp: cytoplasm.



美国园艺学会 (ASHS) 百年盛会情况简介

美国园艺学会百年盛会于 2003 年 10 月 3~6 日在美国 Rhode Island 州首府 Providence 举行。来自世界 34 个国家和地区的近 2000 名注册代表赴会, 其中中国大陆有 2 名代表, 中国农业大学食品科学与营养工程学院生吉萍老师和南京农业园艺学院在读博士生史公军参加了此次会议。会议共交流论文 800 余篇, 其中大会报告 293 篇, 墙报 507 篇, 中国代表被录用的论文 16 篇, 涉及园艺作物种质资源与遗传育种、生物技术、采后及发育生理等领域, 有些研究成果居国际领先地位。会议共分为 1 个大会报告、4 个专题报告会、26 个专题研讨会、27 个工作组会议及 50 场分专题报告会。此次大会报告的主题是气候变化对园艺作物的影响及相应科研和教育策略的制定。大会还评选出了 3 名 2003 年度 ASHS 基金获得者, 5 篇年度最佳论文, 6 名优秀教育及科研工作者, 31 名优秀本科生。此外会议还组织安排了会前及会后 6 个专业参观。

南京农业园艺学院

史公军

2003.10.26