

利用显微录像系统研究抗-Rop1Ps 抗体对花粉管生长的影响

郝佳洁 赵和平

(教育部细胞增殖与调控生物学重点实验室,北京师范大学生命科学学院 北京 100875)

摘要 介绍一个简单的花粉萌发液循环装置,利用该循环装置可以在数小时内连续不间断地跟踪观察花粉管的生长状况。并介绍花粉粒显微注射的一些经验。利用该装置,在显微录像系统下研究抗 Rop1Ps 抗体对百合花粉管生长的影响。

关键词 小分子 GTP 酶 Rop 花粉

显微录像系统是生物学研究的重要手段之一。由于显微录像可以实时跟踪细胞的生长,因此对于需要不间断地连续观察的实验,尤其是在实验历时较长的情况下,显微录像是最好的选择^[1]。目前在花粉细胞的研究中,利用瞬时表达目的蛋白已经是一种常用的手段,但是由于在微蛋注射后仍需要 2~3h 以上的时间目的蛋白才能有效表达^[2],因而这种方法不适于从花粉萌动就开始的研究,因为花粉一般在 30min 后就开始萌发,两三个小时后,花粉管就已经长得非常长。而直接对刚开始萌动的花粉粒进行显微注射目的蛋白则可以弥补瞬时转染的缺点。但是由于花粉细胞的显微注射是一种非常精细的技术,一般人员不易掌握。本文对实验室的一些经验加以介绍。

小分子 GTP 酶是细胞信号转导最重要的分子开关之一,参与许多细胞生理过程。Rho 家族小分子 GTP 酶是众多小 G 蛋白家族中的一员,调节微丝骨架是其重要的功能之一^[3]。Rop 亚家族是在植物细胞中发现的属于 Rho 家族的小分子 GTP 酶,其对植物花粉细胞的微丝骨架有着明显的调节作用,并进而调节花粉管的生长^[2,4]。Rop1Ps 是克隆于豌豆的 Rop 基因^[5],已有研究显示,显微注射抗 Rop1Ps 抗体可以抑制豌豆花粉管的生长^[6],那么抗 Rop1Ps 抗体对其它植物,特别是单子叶植物的花粉管的生长是否有抑制作用尚不得而知。本文介绍利用显微录像系统研究植物 Rho 家族小分子 GTP 酶-Rop1Ps 的抗体对百合花粉管生长的影响。

1 实验材料及仪器设备

1.1 实验材料

1.1.1 川百合花粉(*Lilium davidii* Duch) 采自甘

肃省兰州市郊区,阴干后-20℃保存。其萌发率为 40%~50% (27℃,摇晃 1h)。百合花粉萌发液:15% 蔗糖,0.01% 硼酸,0.01% KNO_3 ,0.02% MgSO_4 ,0.03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 。其中 0.01% 硼酸,0.01% KNO_3 ,0.02% MgSO_4 ,0.03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 配成 100× 的母液,4℃ 条件下可以保存,7 个月以内使用。

1.1.2 纯化好的兔抗 Rop1Ps 抗体 使用前透析,5000×g 离心 30min,然后稀释至 0.5 mg/mL,吸取 8×10^6 μL 进行注射。以同样浓度的牛血清白蛋白 BSA 为对照。

1.2 仪器设备

荧光显微镜:Leica-DMLFS;录像系统:JVC 数码 CCD(TK-C1381),JVC 录像机,JVC 监视器;注射装置:MARISHIGE-MM89。

2 实验方法

2.1 花粉粒显微注射方法

目前的显微注射装置多是依据动物细胞的特点设计的,由于植物花粉通常都具有很厚的细胞壁,因此现有的显微注射装置均不太适用于花粉。对此,一个不得已的方法是调节注射的垂直旋钮,使针头压在花粉粒上,然后利用水平移动旋钮进行调控,以维持花粉粒的稳定。在此前提下,再缓慢向下调节垂直旋钮,当针头遇到花粉粒的阻力时,针会产生一定的弯曲,并使针头产生一定的水平位移。如此向下运动和水平移动结合起来就产生一个斜下方向的力量,这一力量使花粉粒表面凹陷。由于花粉壁厚且有韧性,此时并不足以刺穿,如再继续下刺,通常会使花粉从花粉管的顶端(已萌动的花粉粒)或萌发孔破裂,致使细胞质外流。因此,当在显微镜下可以看出有明显凹陷迹象时,可以轻轻沿玻璃针的方

向敲击显微镜的防震台, 如此, 利用玻璃针的快速抖动刺破花粉壁。为确保玻璃针是刺入花粉粒, 需要在注射样品中加入一些荧光染料, 借以判断注射成功与否。此外, 在积累一定的注射经验后, 还可以直接通过观察进行判断。可以向上调节玻璃针, 将花粉粒挑起来, 并移动一下位置。移动时要注意察看花粉粒的状态。如果花粉粒在玻璃针尖比较稳定, 是扎透的; 如果花粉粒在玻璃针尖上不稳定地快速抖动, 是没有扎好, 应该重新换一个花粉粒进行注射。由于在花粉萌发生长过程中, 萌发小室的溶液始终是处于流动状态, 因而为保证花粉生长过程中其所处位置和方向的稳定, 需要下调玻璃针, 轻轻将花粉粒压住, 用力过重容易使花粉管破裂或造成断针。

花粉注射的显微镜室的温度控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。在低倍镜下选择刚萌发的花粉, 然后在 $40 \times$ 长焦物镜下进行注射。每次注射 $8 \times 10^{-6} \mu\text{L}$ 的蛋白溶液, 其浓度均稀释至 0.5 mg/mL 。对照为同样浓度的牛血清白蛋白溶液。

2.2 维持花粉萌发液浓度恒定的循环装置

体外研究花粉生长的通用方法是先将花粉置于萌发液中萌发, 待花粉管长到一定长度后, 吸取少量花粉悬浮液在显微镜下观察。此类方法适合于观察时间较短的实验, 因为随着时间的推移, 萌发液的水分会很快蒸发, 导致溶液浓度增高, 从而抑制花粉管的伸长。这是因为花粉萌发及花粉管的伸长需要特定的蔗糖浓度, 高于或低于此浓度, 花粉皆不能正常萌发和生长。由于 R_{op} 对花粉生长的影响无法在处理较短的时间内观察到, 因此设计简单装置 (见图 1)。用指甲油将一环形塑料 (直径约 2 cm , 高约 0.3 cm) 粘到载玻片上, 制成一小室, 小室底部通过内径 0.5 mm 的塑料管将一恒流泵和一输液器 (约 15 mL) 串连起来, 在输液器上插有一个注射器。恒流泵维持溶液不断地循环, 小室内的溶液处于不断的更替过程中, 散失的水分可以通过注射器内的蒸馏水来补充。水分散失和补充可以通过显微镜图像来判定, 随着水分的散失, 显微镜视野变模糊, 而当水分回补后, 视野又变清楚。考虑到输液器 15 mL 缓冲量, 因此在此过程中溶液的渗透势变化是非常小的, 可以视之为恒定。

2.3 花粉管生长速度的测量

利用显微标尺在显微录象系统的监视器所显示的尺寸, 计算出监视器屏幕上的单位长度所代表的实际长度, 然后通过测量显示器上花粉管每 5 min 的

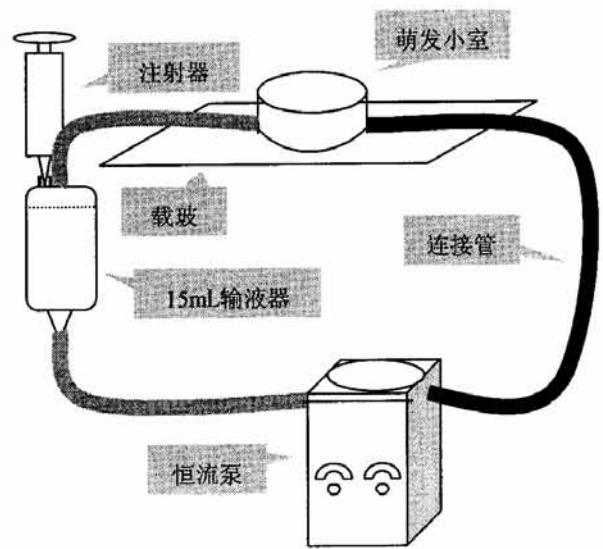


图1 花粉萌发小室示意图

生长长度来推算出花粉管的实际生长长度, 再根据时间计算出实际的花粉管生长速度。

3 实验结果

3.1 不同注射方法的成功率

表1为不同显微注射方法的成功率。从表1中可以看出, 震动注射法成功率远高于常规注射法。而且, 由于震动注射法是在瞬间刺破花粉壁, 其压破细胞的概率比常规方法要小很多。而两种方法堵针的情况相近, 震动注射法只比常规法低2个百分点。

表1 花粉粒显微注射方法成功率的比较

	成功率	压破率	堵针率
常规注射方法	12%	54%	34%
震动注射法	38%	30%	32%

以上结果均为注射一次的统计数据。为保证花粉活力, 所有花粉粒均只注射一次, 若不成功, 则另选一个花粉粒注射。

针已经扎入花粉粒中, 由于堵针而无法将溶液注射进去;

详见实验方法。

对于花粉粒这类植物细胞来说, 由于其具有很厚且坚韧的细胞壁, 而且无论是刚萌动的花粉的萌发孔还是已长出的花粉管顶端都极为薄弱, 因而它比其它植物细胞更易被压破。所以我们认为震动注射法更适合于花粉粒的显微注射。

3.2 循环的萌发液环境有利于花粉管的伸长

在显微镜下观察花粉的生长, 若观察时间较短, 即可以直接吸取少量萌动的花粉悬浮液直接置于镜下观察。而对于较长时间的观察, 则由于水分的散失而使得萌发液浓度增加, 从而抑制花粉管的生长。简单的解决方法可以采用封闭的方法以阻止水分的散失。但在阻止水分散失的同时也阻止气体的交换, 对于长时间观察来说, 则有可能导致缺氧而影响花粉管

的生长。所以,本实验对开放式、不同体积的封闭式以及开放循环式的方法进行比较分析(见表2)。

结果表明开放式在很短的时间内花粉管的生长就受到抑制,而即使封闭后,由于体积不能很大,所以也仅能维持 30min 左右的正常生长。而开放循环的方法,在本实验中,即使在 2.5h 后,也没有观察到明显的抑制情况。这表明在这种方法的条件下,花粉的生长状况几乎与在培养皿中生长花粉的情况完全一致。

表2 不同方式对百合花粉管生长的影响

方法	体积	花粉管不受抑制的生长时间 (min)
开放	20 μ L	10
封闭	20 μ L	15
	200 μ L	30
开放循环	15mL	>150

开放:直接将萌发的花粉悬浮液加于载玻片上观察;封闭:用指甲油做一小室,加入悬浮液后再用指甲油封闭后观察;开放:如方法中所述,外接一个循环的小室,不封闭。花粉管生长速度的标准:与对应的在培养皿中的花粉管生长速度进行比较,即在萌发后不同时间取样,观察 10min 内花粉管伸长的长度,与同时间的不同处理条件下 10min 的伸长长度比较,进行统计计算。样本量为 20。

3.3 抗 Rop1Ps 多克隆抗体对百合花粉管的生长无明显影响

有报道表明,注射抗 Rop1Ps 抗体可以抑制双子叶植物豌豆的花粉管生长⁶,但本实验的结果表明,抗 Rop1Ps 多克隆抗体对单子叶植物百合的花粉管生长无明显影响。图2为注射抗体后不同时间花粉管的生长速度变化曲线,从 T 检验的结果可以看出,除部分时间段外,抗 Rop1Ps 多克隆抗体对百合花粉管生长无明显的抑制作用。

对百合花粉管蛋白的免疫印记检测结果表明(见图3),其中无可与抗 Rop1Ps 多克隆抗体反应的蛋白。抗体抑制 Rop 功能的前提是其可以与 Rop 结合,因此才能阻止其发挥功能,而当抗豌豆的 Rop1Ps 抗体不能与百合的 Rop 识别时,即如免疫印记结果所表明的那样,抗 Rop1Ps 多克隆抗体就无法抑制百合花粉管的生长。

4 讨论

植物花粉粒的细胞壁非常厚且韧,因而其显微注射的操作非常困难。由于目前还没有特地为植物细胞量身定做的显微注射装置,因而其成功操作很大程度上只能依靠操作人员的经验。敲击显微镜台的方法可以在一定程度上提高花粉粒显微注射的成功率,需要进行类似实验的,不妨一试。本文介绍的循环装置非常简单,任何一个实验室都可以自己制

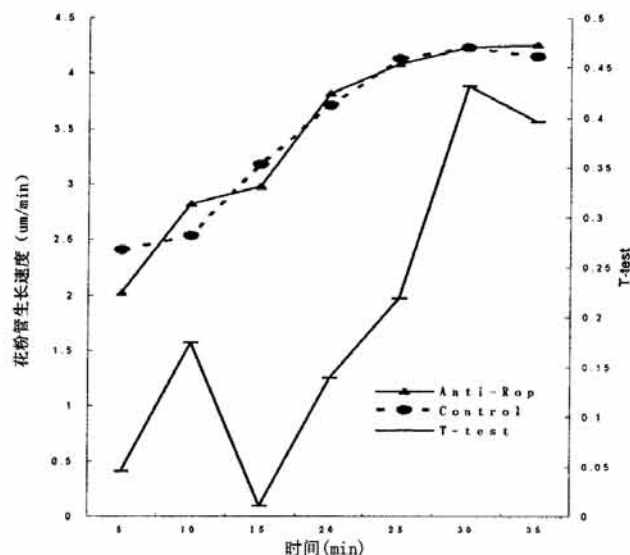


图2 抗 Rop1Ps 抗体对百合花粉管生长的影响(样本量:15)

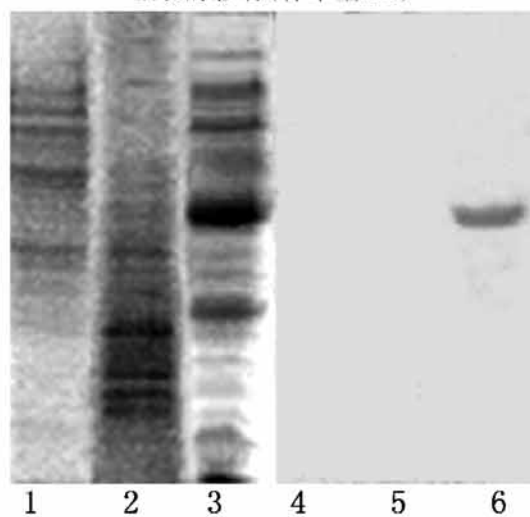


图3 抗 Rop1Ps 抗体的免疫印记结果

1. 可溶性百合花粉蛋白; 2. 百合花粉膜蛋白;
3. 原核表达的 Rop1Ps 粗蛋白; 4、5、6 为 1、2、3 的印记结果

作。该装置虽然简单,但是却可以大幅度地提高花粉镜下观察的时间。

小分子 GTP 酶是调节细胞微丝骨架的分子开关,显微注射外源的植物小分子 GTP 酶可以调节花粉的微丝骨架,并促进花粉管的生长⁸¹。本实验的结果表明,显微注射抗 Rop1Ps 抗体并不抑制百合花粉管的生长,而免疫印记结果也证明百合花粉管中无抗 Rop1Ps 抗体可以识别的蛋白。由于本实验所用的 Rop1Ps 基因克隆自豌豆,而豌豆属于双子叶植物,百合属于单子叶植物,因此本实验的结果表明豌豆的 Rop1Ps 与百合的小分子 GTP 酶之间有较大的差异。因为显微注射抗 Rop1Ps 抗体可以明显地抑制豌豆花粉管的生长⁶¹。考虑到显微注射 Rop1Ps 可以明显地促进百合花粉管的生长⁸¹,以及本实验

相互作用,但是测得的自粘粘合力大小常常决定于其它因素。主要影响因素为弹性体的本体粘弹性、环境以及表面形貌等。研究发现用不同材料模具制作 PDMS 芯片,可得到自粘粘合力相差数倍的芯片。本文利用 XPS 和 AFM 测试研究产生上述现象的原因。利用 XPS 技术对 PDMS 表面进行分析,在优化的 PDMS 芯片制作条件下,PDMS 表面上没有发现元素的化学和物理吸附。从而推断,PDMS 芯片自粘粘合力取决于盖片表面粗糙度,即粗糙度越小自粘粘合力越大,粗糙度越大的自粘粘合力越小。

AFM and XPS study of surface properties of PDMS plate

Huang Daojin You Xueyi

(School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

Abstract The Polydimethylsiloxane (PDMS) is widely applied in the casting of microfluidic chips. Under the same conditions, the bonding intensity of chips is greatly affected by the material of curing mould. For understanding the reason of this phenomenon, the surface properties of cover PDMS plate casted by three moulds made of commonly used materials glass, PMMA and plastic are studied by the AFM and XPS measurement. The results of AFM show the surface roughness of cover plate casted by PMMA mould is obviously smaller than other chips, that casted by plastic mould is in the middle, and that casted by glass mould is the largest. On the other hand, the analysis of XPS spectrum indicates that there is no chemisorption and physisorption on the surface of PDMS cover plate during casting by three moulds under the optimal making conditions. Therefore, it is concluded that the surface roughness of PDMS plates is the most effective factors on the bond intensity of PDMS chips.

Key words Polydimethylsiloxane (PDMS) Casted mould Adhesive strength

Atomic force microscopy (AFM) X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

(下接第 32 页)

的结果,可以推测虽然抗 Rop1Ps 抗体不识别百合的小分子 GTP 酶,但是百合花粉中的小分子 GTP 调控系统却可以接收到 Rop1Ps 的调节信号。也就是说,可以推测单子叶植物的小分子 GTP 酶调控系统可以识别双子叶的小分子 GTP 酶。对此,尚需要有进一步的实验加以证实。

参考文献

- 1 赵和平,黄凌云,何大澄.显微录像系统及光栅显微操作技术在马达蛋白体外运动研究中的应用,现代仪器,2005,56(1):1~4
- 2 Fu Y, Wu G, Yang Z. Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol*, 2001, 152:1019~1032

参考文献

- 1 方肇伦等编著.微流控分析芯片(M),北京:科学出版社,2003
- 2 黄玉东编著.聚合物表面与界面技术(M),北京:化学工业出版社,2003
- 3 〔英〕D. 布里格斯著.聚合物表面分析(M),北京:化学工业出版社,2001
- 4 李生英等.原子力显微镜在聚合物研究中的应用[J],现代仪器,2005,(5):11~14
- 5 陈英飞,章海军,张东仙.原子力显微镜在纳米粗糙度测量中的应用[J],光学仪器,2003,25(4):25~29

- 3 Hall A Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998, 279:509~514
- 4 Heping Zhao and Haiyun Ren. Rop1Ps Promote Dynamics of Actin Cytoskeleton and Control the Tip Growth of Lily Pollen Tube. *Sexual Plant Reproduction*, 2006, 19(2):83~91
- 5 Yang, Z. and Watson, J. C., 1993, Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8732~8736
- 6 Lin, Y. And Yang, Z. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth. *The Plant cell*, 1997, 9:1647~1659

The analysis of the effect of anti-Rop1Ps antibody on the growth of pollen tube by microinjection and micro-video recorder system

Hao Jiajie Zhao Heping

(The College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract A simple device was employed to study the effect of anti-Rop1Ps antibody on the growth of pollen tube. With the device, pollen could be observed continually under micro-video recorder system for several hours. The solution of anti-Rop1Ps antibody was injected into pollen grain by micro-injector under a microscope, and the growth of pollen tube was monitored by a micro-recorder system. It was found that anti-Rop1Ps had no obvious inhibiting effect on the growth of pollen tube. The result indicates that the structure of Rop of dicotyledonous plant could be different from monocotyledonous.

Key words Small molecular GTPase Rop Pollen