



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771129 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611217945.4

(22)申请日 2016.12.26

(71)申请人 河南省农业科学院经济作物研究所

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116号

(72)发明人 赵付安 李艺 李武 房卫平
侯甲男

(74)专利代理机构 郑州红元帅专利代理事务所
(普通合伙) 41117

代理人 范向南

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

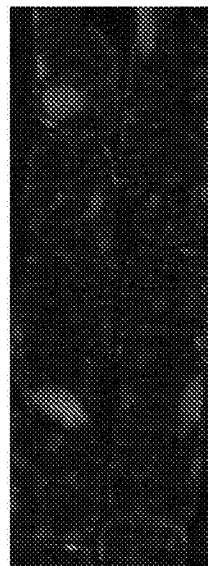
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法

(57)摘要

本发明提供了一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,包括以下工艺步骤:固定液固定、脱水、冷冻切片、非特异性荧光的去除、免疫标记及封片等步骤,本发明是在将荧光素与棉花幼嫩部位的微管骨架相结合,对棉花幼嫩组织微管骨架进行免疫标记,从组织水平上观察幼嫩组织微管骨架的变化,对棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性进行研究。本发明步骤简单,易于掌握,结果清晰,适合对棉花幼嫩组织微管骨架进行观察。对其他植物幼嫩组织微管骨架观察也有一定的参考价值。



1. 一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:包括以下工艺步骤:

第一步、固定液固定

切取棉花幼嫩组织,将该幼嫩组织放入装有固定液的密封容器内,将密封容器抽真空10~15分钟,然后将密封容器在25~30℃温度下静置1.5~3小时,密封容器内的固定液将棉花幼嫩组织固定;

第二步、脱水

将密封容器内的棉花幼嫩组织取出,然后将该幼嫩组织放入蔗糖磷酸缓冲液中浸泡脱水;

第三步、冷冻切片

将脱水后的棉花幼嫩组织放入冷冻切片机内切片,冷冻切片机内部温度为-25~-35℃,切片厚度18~25微米,

第四步、非特异性荧光的去除

将切片放入甘氨酸溶液中浸泡30~40分钟,再用PBS缓冲液冲洗1~2次,每次5min,冲洗温度28~30度;

第五步、免疫标记

a、将切片放入抗 α -tubulin的一抗工作液中,在32℃温度下一次孵育2小时;

b、将一次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次至少8分钟;

c、将漂洗后的切片放入FITC标记的二抗工作液中,在黑暗环境及37℃的温度下二次孵育2小时;

d、将二次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次至少8分钟;

第六步、封片

利用PBS-甘油溶液将免疫标记后的切片封片,至此完成棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记。

2. 根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第一步、固定液固定中,所述的固定液为含有质量百分比为0.4%的戊二醛、质量百分比为3.6%的多聚甲醛、质量百分比为0.02%的Triton-100、pipes、MEGTA及MgSO₄,其中pipes的摩尔浓度为50 mM,MEGTA的摩尔浓度为5 mM,MgSO₄的摩尔浓度为5 mM。

3. 根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第一步、固定液固定中,所述的棉花幼嫩组织指棉花茎尖以下1厘米的组织,或为棉花根尖以上1厘米的组织,切取的棉花幼嫩组织的长度小于等于3厘米,厚度小于等于1厘米。

4. 根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第二步、脱水时,先将固定液固定后的棉花幼嫩组织放入质量体积比为0.5%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,再放入质量体积比为1.5%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,然后放入质量体积比为3%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,最后放入质量体积比为4%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时。

5. 根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第二步、脱水时,所述的蔗糖-磷酸缓冲液的PH值为7.1~7.5。

6. 根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在

于:第三步、冷冻切片时,先将脱水后的棉花幼嫩组织浸没在OCT包埋剂中8~10分钟,然后将棉花幼嫩组织放入冷冻切片机内在-25~-35℃温度下冷冻10~15分钟,最后再将其固定切片。

7.根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第四步、非特异性荧光的去除中,所述的甘氨酸溶液得摩尔浓度为80 mM,所述的PBS缓冲液的PH值为7.3。

8.根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第五步、免疫标记中,所述的一抗工作液及二抗工作液中均含有1%牛血清蛋白,所述的一抗工作液为经PBS溶液稀释200倍的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,所述的二抗工作液为经PBS溶液稀释100倍的FITC标记的anti- α tubulin抗体溶液稀释液。

9.根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第五步、免疫标记中,所述的漂洗液为PBS缓冲液。

10.根据权利要求1所述的棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其特征在于:第六步、封片中,所述的 PBS -甘油溶液中PBS与甘油的体积比为1:1,PBS -甘油溶液中含有间苯二胺,间苯二胺与PBS -甘油溶液的质量体积比为0.1:100,所述的PBS -甘油溶液的PH值为8.5~9.0。

棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法

[0001] 技术领域:

本发明属于棉花科学研究技术领域,具体涉及一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法。

[0002] 背景技术:

棉花是我国重要的经济作物之一,低温、干旱和盐害等一些非生物胁迫严重影响棉花的生长和发育,同时病虫害也是影响棉花生长和发育的重要原因之一,因此,棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性是目前科研人员对棉花进行科学研究的重要内容。

[0003] 荧光抗体标记技术是将荧光素以化学方法与特异性抗体共价结合,形成荧光素-蛋白质结合物,即荧光标记抗体,此结合物仍保留着抗体活性,同时具有荧光素的失踪作用,当它与相应的抗原特异结合后,借助于荧光显微镜观察呈现明亮的特异荧光。在对棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性进行研究时,通常采用荧光抗体标记技术。

[0004] 目前,在对棉花采用荧光抗体标记技术进行研究时,主要是将荧光抗体标记技术标记在棉花的花粉粒、原生质体、以及通过酶解解离出的单个植物根尖细胞。但是,目前还没有将荧光抗体标记在棉花的组织水平上,如棉花的茎尖部位微管骨架、根尖部位的微管骨架。而微管是细胞骨架的重要组成成分。微管骨架以及附属的微管结合蛋白广泛参与细胞形态的维持、细胞伸长与分裂、物质运输、细胞分化等生命活动。同时也可作为信号基体,参与植物生长发育、植病互作、植物与逆境胁迫等。

[0005] 发明内容:

综上所述,为了克服现有技术问题的不足,本发明提供了一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,它是在将荧光素与棉花幼嫩部位的微管骨架相结合,对棉花幼嫩组织微管骨架进行免疫标记,从组织水平上观察幼嫩组织微管骨架的变化,对棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性进行研究。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,其中:包括以下工艺步骤:

第一步、固定液固定

切取棉花幼嫩组织,将该幼嫩组织放入装有固定液的密封容器内,将密封容器抽真空8~15分钟,然后将密封容器在25~30℃温度下静置1.5~3小时,密封容器内的固定液将棉花幼嫩组织固定;

第二步、脱水

将密封容器内的棉花幼嫩组织取出,然后将该幼嫩组织放入蔗糖磷酸缓冲液中浸泡脱水;

第三步、冷冻切片

将脱水后的棉花幼嫩组织放入冷冻切片机内切片,冷冻切片机内部温度为-25~-35℃,切片厚度18~25微米,

第四步、非特异性荧光的去除

将切片放入甘氨酸溶液中浸泡30-40分钟,再用PBS缓冲液冲洗1~2次,每次5min,冲洗温度28-30度;

第五步、免疫标记

a、将切片放入抗 α -tubulin的一抗工作液中,在32℃温度下一次孵育2小时;

b、将一次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次至少8分钟;

c、将漂洗后的切片放入FITC标记的二抗工作液中,在黑暗环境及37℃的温度下二次孵育2小时;

d、将二次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次至少8分钟;

第六步、封片

利用PBS-甘油溶液将免疫标记后的切片封片,至此完成棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记。

[0007] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第一步、固定液固定中,所述的固定液为含有质量百分比为0.4%的戊二醛、质量百分比为3.6%的多聚甲醛、质量百分比为0.02%的Triton-100、pipes、MEGTA及MgSO₄,其中pipes的摩尔浓度为50 mM,MEGTA的摩尔浓度为5 mM,MgSO₄的摩尔浓度为5 mM。

[0008] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第一步、固定液固定中,所述的棉花幼嫩组织指棉花茎尖以下1厘米的组织,或为棉花根尖以上1厘米的组织,切取的棉花幼嫩组织的长度小于等于3厘米,厚度小于等于1厘米。

[0009] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第二步、脱水时,先将固定液固定后的棉花幼嫩组织放入质量体积比为0.5%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,再放入质量体积比为1.5%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,然后放入质量体积比为3%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时,最后放入质量体积比为4%的蔗糖-磷酸缓冲液中浸泡1~3小时。

[0010] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第二步、脱水时,所述的蔗糖-磷酸缓冲液的PH值为7.1~7.5。

[0011] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第三步、冷冻切片时,先将脱水后的棉花幼嫩组织浸没在OCT包埋剂中8~10分钟,然后将棉花幼嫩组织放入冷冻切片机内在-25~-35℃温度下冷冻10~15分钟,最后再将其固定切片。

[0012] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第四步、非特异性荧光的去除中,所述的甘氨酸溶液得摩尔浓度为80 mM,所述的PBS缓冲液的PH值为7.3。

[0013] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第五步、免疫标记中,所述的一抗工作液及二抗工作液中均含有1%牛血清蛋白,所述的一抗工作液为经PBS溶液稀释200倍的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,所述的二抗工作液为经PBS溶液稀释100倍的FITC标记的anti- α tubulin抗体溶液稀释液。

[0014] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第五步、免疫标记中,所述的漂洗液为PBS缓冲液。

[0015] 本发明的技术方案还可以是这样实现的:第六步、封片中,所述的PBS-甘油溶液中PBS与甘油的体积比为1:1,PBS-甘油溶液中含有间苯二胺,间苯二胺与PBS-甘油溶液的质量体积比为0.1:100,所述的PBS-甘油溶液的PH值为8.5~9.0。

[0016] 本发明的有益效果为：

1、本发明是在将荧光素与棉花幼嫩部位的微管骨架相结合，对棉花幼嫩组织微管骨架进行免疫标记，从组织水平上观察幼嫩组织微管骨架的变化，对棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性进行研究。

[0017] 2、本发明对固定液固定后的棉花幼嫩组织通过0.5%、1.5%、3%、4%的蔗糖磷酸缓冲液进行梯度脱水，棉花幼嫩组织含水量较大，冰冻切片，随着切片温度逐渐与室温平衡，细胞内的水分液化膨胀，容易将组织细胞涨破，导致在组织切片图上留下许多孔状的空隙，导致细胞结构的损伤，甚至微管结构的移位，影响实验结果的准确性。因此，需要对棉花幼嫩组织进行梯度脱水步骤，能够有效缓解这种现象。

[0018] 3、本发明采用蔗糖磷酸缓冲液对棉花幼嫩组织进行脱水后，进行冷冻切片，此时，组织表面有蔗糖残留，冷冻时，蔗糖作为冷冻保护剂，蔗糖能与组织细胞中的水分结合，降低细胞内溶液的冰点，减少冰晶或较大冰晶的形成，从而减轻细胞损伤，冰冻切片技术的采用，不仅仅使实验变得快速、简便、易操作，而且缩短了常规石蜡切片缓慢而复杂的处理过程，减少对样品组织活性物质的损伤，更好地保存生物分子活性，同时在一定程度上破坏了细胞壁，在冷冻条件下，利用机械力打开细胞壁，同时细胞的形态不会发生改变，利于微管抗体进入细胞与微管结合。

[0019] 4、本发明的第四步消除了部分非特异性荧光，通过较高浓度的甘氨酸处理，避免了固定液中的残留的醛类物质的自发荧光对实验结果的干扰，使得荧光信号更强，背景信号更弱，微管骨架更清晰。

[0020] 5、本发明步骤简单，易于掌握，结果清晰，实际应用价值高。为棉花细胞生物学研究开辟了崭新的方向，同时也可以弥补棉花分子生物学研究的缺陷，本发明不仅适用于棉花幼嫩部位，对其他植物幼嫩部位微管骨架观察也有一定的参考价值。

附图说明

[0021] 图1为棉花三叶期茎尖以下1厘米处主茎外皮层细胞微管骨架观察结果；

图2为棉花三叶期根尖以上1厘米处根部外皮层细胞微管骨架观察结果；

图3为棉花三叶期根尖以上0.5厘米处根部外皮层细胞微管骨架观察结果。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0023] 实施例一

本实施例对棉花三叶期茎尖以下1厘米主茎外皮层细胞微管骨架进行免疫荧光标记。

[0024] 一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法，包括以下步骤：

第一步、固定液固定

徒手切取棉花三叶期茎尖以下1厘米主茎外皮，将该主茎外皮放入装有固定液的密封容器内，将密封容器抽真空15分钟，然后将密封容器在28℃温度下静置3小时，密封容器内的固定液将棉花幼嫩组织固定；

所述的固定液为含有质量百分比为0.4%的戊二醛、质量百分比为3.6%的多聚甲醛、质量百分比为0.02%的Triton-100、pipes、MEGTA及MgSO₄，其中pipes的摩尔浓度为50 mM，

MEGTA的摩尔浓度为5 mM,MgSO₄的摩尔浓度为5 mM。第二步、脱水

将密封容器内的棉花主茎外皮取出,然后将该主茎外皮放入蔗糖磷酸缓冲液中浸泡脱水;蔗糖磷酸缓冲液的PH值为7.3。

[0025] 脱水时,先将固定液固定后的棉花主茎外皮放入质量体积比为0.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡1小时,再放入质量体积比为1.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡1小时,然后放入质量体积比为3%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡1小时,最后放入质量体积比为4%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡1小时。

[0026] 第三步、冷冻切片

先将脱水后的棉花主茎外皮浸没在OCT包埋剂中10分钟,然后将棉花主茎外皮放入冷冻切片机内在-25℃温度下冷冻15分钟,最后再将其固定切片,切片厚度25微米。

[0027] 第四步、非特异性荧光的去除

将切片放入甘氨酸溶液中浸泡40分钟,所用的甘氨酸溶液的摩尔浓度为80 mM,再用PBS缓冲液冲洗切片2次,每次5min,冲洗温度28度;PBS缓冲液的PH值为7.3。

[0028] 第五步、免疫标记

a、将切片放入抗 α -tubulin的一抗工作液中,在32℃温度下一次孵育2小时;一抗工作液为经PBS溶液稀释200倍的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,一抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0029] b、将一次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0030] c、将漂洗后的切片放入FITC标记的二抗工作液中,在黑暗环境及37℃的温度下二次孵育2小时;二抗工作液为经PBS溶液稀释100倍的FITC标记的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,二抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0031] d、将二次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0032] 第六步、封片

利用PBS-甘油溶液将免疫标记后的切片封片,至此完成棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记。

[0033] 所述的PBS-甘油溶液中PBS与甘油的体积比为1:1,PBS-甘油溶液中含有间苯二胺,间苯二胺与PBS-甘油溶液的质量体积比为0.1:100,所述的PBS-甘油溶液的PH值为9.0。

[0034] 将封片后的棉花主茎外皮切片放入利用激光共聚焦显微镜观察,并拍照,所得照片如图1所示,

由图1可看出,对棉花三叶期茎尖以下1厘米主茎外皮层细胞微管骨架进行免疫荧光标记后,在激光共聚焦显微镜下,可以清晰的观察到微管骨架的分布状况。

[0035] 实施例二

重复实施例一,有以下不同点,本实施例中采用棉花三叶期根尖以上1厘米处根部外皮进行免疫荧光抗体标记,具体实施步骤如下:

第一步、固定液固定

徒手切取棉花三叶期根尖以上1厘米处根部外皮,将该根部外皮放入装有固定液的密封容器内,将密封容器抽真空10分钟,然后将密封容器在28℃温度下静置2小时,密封容器内的固定液将棉花幼嫩组织固定;

所述的固定液为含有质量百分比为0.4%的戊二醛、质量百分比为3.6%的多聚甲醛、质量百分比为0.02%的Triton-100、pipes、MEGTA及MgSO₄,其中pipes的摩尔浓度为50 mM, MEGTA的摩尔浓度为5 mM, MgSO₄的摩尔浓度为5 mM。第二步、脱水

将密封容器内的棉花根部外皮取出,然后将该根部外皮放入蔗糖磷酸缓冲液中浸泡脱水;蔗糖磷酸缓冲液的PH值为7.5。

[0036] 脱水时,先将固定液固定后的棉花根部外皮放入质量体积比为0.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,再放入质量体积比为1.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,然后放入质量体积比为3%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,最后放入质量体积比为4%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时。

[0037] 第三步、冷冻切片

先将脱水后的棉花根部外皮浸没在OCT包埋剂中8分钟,然后将棉花根部外皮放入冷冻切片机内在-30℃温度下冷冻15分钟,最后再将其固定切片,切片厚度20微米。

[0038] 第四步、非特异性荧光的去除

将切片放入甘氨酸溶液中浸泡30分钟,所用的甘氨酸溶液的摩尔浓度为80 mM,再用PBS缓冲液冲洗切片1次,冲洗5min,冲洗温度28度;PBS缓冲液的PH值为7.3。

[0039] 第五步、免疫标记

a、将切片放入抗 α -tubulin的一抗工作液中,在32℃温度下一次孵育2小时;一抗工作液为经PBS溶液稀释200倍的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,一抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0040] b、将一次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0041] c、将漂洗后的切片放入FITC标记的二抗工作液中,在黑暗环境及37℃的温度下二次孵育2小时;二抗工作液为经PBS溶液稀释100倍的FITC标记的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,二抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0042] d、将二次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0043] 第六步、封片

利用PBS-甘油溶液将免疫标记后的切片封片,至此完成棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记。

[0044] 所述的PBS-甘油溶液中PBS与甘油的体积比为1:1,PBS-甘油溶液中含有间苯二胺,间苯二胺与PBS-甘油溶液的质量体积比为0.1:100,所述的PBS-甘油溶液的PH值为8.5。

[0045] 将封片后的棉花根部外皮切片放入利用激光共聚焦显微镜观察,并拍照,所得照片如图2所示,

由图2可看出,对棉花三叶期根尖以上1厘米根部外皮层细胞微管骨架进行免疫荧光标记后,在激光共聚焦显微镜下,可以清晰的观察到微管骨架的分布状况。

[0046] 实施例三

重复实施例一,有以下不同点,本实施例对棉花三叶期根尖以上0.5厘米处根部外皮层细胞微管骨架进行免疫荧光标记。

[0047] 一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法,包括以下步骤:

第一步、固定液固定

徒手切取棉花三叶期根尖以上0.5厘米处根部外皮,将该根部外皮放入装有固定液的密封容器内,将密封容器抽真空8分钟,然后将密封容器在30℃温度下静置2小时,密封容器内的固定液将棉花幼嫩组织固定;

所述的固定液为含有质量百分比为0.4%的戊二醛、质量百分比为3.6%的多聚甲醛、质量百分比为0.02%的Triton-100、pipes、MEGTA及MgSO₄,其中pipes的摩尔浓度为50 mM,MEGTA的摩尔浓度为5 mM,MgSO₄的摩尔浓度为5 mM。第二步、脱水

将密封容器内的棉花根部外皮取出,然后将该根部外皮放入蔗糖磷酸缓冲液中浸泡脱水;蔗糖磷酸缓冲液的PH值为7.3。

[0048] 脱水时,先将固定液固定后的棉花根部外皮放入质量体积比为0.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,再放入质量体积比为1.5%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,然后放入质量体积比为3%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时,最后放入质量体积比为4%的蔗糖-磷酸缓冲液(PBS缓冲液)中浸泡2小时。

[0049] 第三步、冷冻切片

先将脱水后的棉花主茎外皮浸没在OCT包埋剂中10分钟,然后将棉花主茎外皮放入冷冻切片机内在-35℃温度下冷冻15分钟,最后再将其固定切片,切片厚度18微米。

[0050] 第四步、非特异性荧光的去除

将切片放入甘氨酸溶液中浸泡30分钟,所用的甘氨酸溶液的摩尔浓度为80 mM,再用PBS缓冲液冲洗切片2次,每次5min,冲洗温度28度;PBS缓冲液的PH值为7.3。

[0051] 第五步、免疫标记

a、将切片放入抗 α -tubulin的一抗工作液中,在32℃温度下一次孵育2小时;一抗工作液为经PBS溶液稀释200倍的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,一抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0052] b、将一次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0053] c、将漂洗后的切片放入FITC标记的二抗工作液中,在黑暗环境及37℃的温度下二次孵育2小时;二抗工作液为经PBS溶液稀释100倍的FITC标记的anti- α tubulin抗体溶液稀释液,二抗工作液中均含有1%牛血清蛋白。

[0054] d、将二次孵育后的切片用漂洗液反复漂洗三次,每次8分钟;漂洗液为PBS缓冲液。

[0055] 第六步、封片

利用PBS-甘油溶液将免疫标记后的切片封片,至此完成棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记。

[0056] 所述的PBS-甘油溶液中PBS与甘油的体积比为1:1,PBS-甘油溶液中含有间苯二胺,间苯二胺与PBS-甘油溶液的质量体积比为0.1:100,所述的PBS-甘油溶液的PH值为9.0。

[0057] 将封片后的棉花根部外皮切片放入利用激光共聚焦显微镜观察,并拍照,所得照片如图3所示,

由图3可看出,对棉花三叶期根尖以上0.5厘米处根部外皮层细胞微管骨架进行免疫荧光标记后,在激光共聚焦显微镜下,可以清晰的观察到微管骨架的分布状况。

[0058] 要说明的是,上述实施例是对本发明技术方案的说明而非限制,所属技术领域普通技术人员的等同替换或者根据现有技术而做的其它修改,只要没超出本发明技术方案的

思路和范围,均应包含在本发明所要求的权利范围之内。



图1



图2



图3

专利名称(译)	棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法		
公开(公告)号	CN106771129A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611217945.4	申请日	2016-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院经济作物研究所		
[标]发明人	赵付安 李艺 李武 房卫平 侯甲男		
发明人	赵付安 李艺 李武 房卫平 侯甲男		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种棉花幼嫩组织微管骨架的免疫荧光抗体标记方法，包括以下工艺步骤：固定液固定、脱水、冷冻切片、非特异性荧光的去除、免疫标记及封片等步骤，本发明是在将荧光素与棉花幼嫩部位的微管骨架相结合，对棉花幼嫩组织微管骨架进行免疫标记，从组织水平上观察幼嫩组织微管骨架的变化，对棉花对非生物逆境胁迫的抗性以及棉花对病虫害的抗性进行研究。本发明步骤简单，易于掌握，结果清晰，适合对棉花幼嫩组织微管骨架进行观察。对其他植物幼嫩组织微管骨架观察也有一定的参考价值。

