



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108318679 A

(43)申请公布日 2018.07.24

(21)申请号 201710037998.6

(22)申请日 2017.01.18

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 李天忠 顾钊宇 杨清 李威

李洋 于杰

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

### (54)发明名称

一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒

### (57)摘要

本发明提供一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒。所述试剂盒中包括固定液、酶解液、封闭液、一抗和二抗；所述固定液中含有PEPES、蔗糖、TritonX-100、多聚甲醛、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述酶解液中含有纤维素酶、离析酶、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述封闭液中含有牛血清白蛋白、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述一抗为目的蛋白抗体，所述二抗为FITC标记的山羊抗兔二抗。本发明以苹果花粉管为试材，通过酶解花粉管壁后，进行免疫荧光标记。采用本发明的方法可以直接、高效、灵敏、特异性的定位花粉管中的功能蛋白，为直观鉴定木本植物花粉管内功能蛋白的表达及定位提供技术体系。

1. 用于定位木本植物花粉管蛋白的试剂组合,其特征在于,包括固定液、酶解液、封闭液、一抗和二抗;所述固定液中含有PEPES、蔗糖、TritonX-100、多聚甲醛、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述酶解液中含有纤维素酶、离析酶、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述封闭液中含有牛血清白蛋白、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述一抗为目的蛋白抗体,所述二抗为FITC标记的山羊抗兔二抗;其中,所述木本植物包括苹果。

2. 根据权利要求1所述的试剂组合,其特征在于,所述固定液中蔗糖和多聚甲醛的质量百分含量分别为8-12%和4-6%,TritonX-100的体积百分含量为0.5-1.5%,PEPES、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为50-150mM、135-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,以水配制;优选地,所述固定液中蔗糖和多聚甲醛的质量百分含量分别为10%和4%,TritonX-100的体积百分含量为1%,PEPES、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为100mM、137mM、2.7mM、10mM和2mM。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂组合,其特征在于,所述酶解液中纤维素酶和离析酶的质量百分含量分别为0.3-1.0%和0.5-1.5%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为130-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,pH值6.5-7,以水配制;优选地,所述酶解液中纤维素酶和离析酶的质量百分含量分别为0.5%和1%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM和2mM,pH值6.8;

其中,所述纤维素酶和离析酶分别为纤维素酶R10和离析酶R10。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂组合,其特征在于,所述封闭液中牛血清白蛋白的质量百分含量为10%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为130-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,pH值6.5-7,以水配制;优选地,所述封闭液中牛血清白蛋白的质量百分含量为10%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM和2mM,pH值6.8。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的试剂组合,其特征在于,所述一抗、二抗的免疫浓度均为1:100,以PBS缓冲液配制。

6. 用于定位木本植物花粉管蛋白的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求1-5任一项所述试剂组合。

7. 利用权利要求6所述试剂盒定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法,其中,所述木本植物包括苹果;其特征在于,所述方法包括以下步骤:

- 1) 花粉管体外萌发,用固定液固定,收集固定后的花粉管;
- 2) 用酶解液酶解花粉管,收集酶解后的花粉管;
- 3) 用封闭液封闭花粉管;
- 4) 进行一抗免疫;
- 5) 进行二抗免疫。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤1)中待花粉管体外萌发至长度20-30μm,加入固定液进行固定,固定的方式为抽真空固定。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,步骤2)中酶解条件为:37℃酶解10-20min;酶解液的用量为1-2ml;

步骤3)中封闭的方式为室温下置于静音混合器中,旋转封闭;封闭液的用量为1-2ml。

10. 根据权利要求7-9任一项所述的方法,其特征在于,步骤4)具体操作如下:

向封闭后的花粉管中添加1ml稀释后的一抗,使花粉管悬浮于一抗中,将EP管水平置于

4℃冰箱中,孵育过夜;将一抗免疫后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,吸弃一抗;

向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管悬浮于PBS缓冲液中,以清洗花粉管表面的一抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此清洗操作步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

步骤5) 具体操作如下:

向上述一抗免疫后的花粉管中添加1ml二抗溶液,使花粉管悬浮于二抗中;室温下,避光置于静音混合器中,温和旋转1.5h后,将花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,吸弃二抗;

向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管悬浮于PBS缓冲液中,以清洗花粉管表面的二抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此清洗操作步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

## 一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域,具体地说,涉及一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒。

### 背景技术

[0002] 木本植物由于生长周期长、遗传转化困难,因此对于功能基因的研究存在较多技术限制。目前,鉴定木本植物内源蛋白表达、定位的方法主要是将目的蛋白融合荧光蛋白转入模式植物体内,通过对荧光蛋白的观察间接鉴定目的蛋白的表达及定位等性质。但又因其遗传背景不同,导致证据不够充分,无法直观的鉴定体内功能蛋白的性质。

[0003] 随着医学及动物学领域中免疫荧光技术的发展,为植物学研究中直观鉴定蛋白的表达及定位提供了技术基础。然而,植物细胞具有细胞壁这一特点,使得在研究过程中首先要进行组织切片方可进行免疫标记。因此,对于花粉管等无法进行切片的组织则受到很多技术限制。在拟南芥花粉管的研究中,通过酶解花粉管壁后在进行免疫标记可以特异性的观察花粉管内功能蛋白的表达及定位。而木本植物的花粉管壁的组分与拟南芥不尽相同,因此对于木本植物花粉管的研究更为困难。房克凤等(电子显微镜学报,2015)利用免疫荧光标记技术鉴定了苹果花粉管壁的组分,但对于木本植物花粉管内功能蛋白的研究尚未见报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一套用于定位木本植物花粉管蛋白的试剂组合及其试剂盒。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明提供一套用于定位木本植物花粉管蛋白的试剂组合,包括固定液、酶解液、封闭液、一抗和二抗;所述固定液中含有PEPES、蔗糖、TritonX-100、多聚甲醛、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述酶解液中含有纤维素酶、离析酶、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述封闭液中含有牛血清白蛋白、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,所述一抗为目的蛋白抗体,所述二抗为FITC标记的山羊抗兔二抗。其中所述目的蛋白是指花粉管蛋白。

[0007] 本发明所述一抗的制备方法如下:

[0008] (1) 小摇培养,分别将构建在pEASY载体上的带有目的片段的质粒转化BL21 (DE3) PlySs菌液按1:100比例接种至相应抗性培养基中,37℃,200rpm过夜培养。

[0009] (2) 大摇培养,将小摇菌液按1:100比例接种于1L相应抗性培养基中,37℃,200rpm摇菌至OD<sub>600</sub>=0.6,加入0.2M IPTG 2ml,16℃185rpm过夜诱导。

[0010] (3) 收集菌液,8000rpm,4℃,离心5min。

[0011] (4) 将收集的沉淀重悬于PBS缓冲液中,涡旋震荡均匀。

[0012] (5) 超声破碎细胞,工作频率为超声5s,间歇15s,时长20min。

[0013] (6) 将破碎后的菌液于4℃,10000rpm离心1h,收集上清,并将上清液与His蛋白纯

化介质填料孵育1h后,利用重力柱进行亲和层析。

[0014] (7)利用SBB buffer洗脱杂蛋白,收集流穿液至考马斯亮蓝G-250检测不到蛋白。

[0015] (8)利用一定体积SEB buffer洗脱目的蛋白,并利用相应分子量大小的浓缩管浓缩目的蛋白,并再次去除杂蛋白,保存于-80℃冰箱备用。将所获得的目的蛋白送至北京康为生物公司制备兔抗原多克隆抗体。

[0016] 其中,所述固定液中蔗糖和多聚甲醛的质量百分含量分别为8-12%和4-6%,TritonX-100的体积百分含量为0.5-1.5%,PEPES、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为50-150mM、135-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,以水配制。优选地,所述固定液中蔗糖和多聚甲醛的质量百分含量分别为10%和4%,TritonX-100的体积百分含量为1%,PEPES、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为100mM、137mM、2.7mM、10mM和2mM。

[0017] 所述酶解液中纤维素酶和离析酶的质量百分含量分别为0.3-1.0%和0.5-1.5%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为130-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,pH值6.5-7,以水配制。优选地,所述酶解液中纤维素酶和离析酶的质量百分含量分别为0.5%和1%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM和2mM,pH值6.8。

[0018] 其中,所述纤维素酶和离析酶优选为纤维素酶R10和离析酶R10。

[0019] 所述封闭液中牛血清白蛋白的质量百分含量为10%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为130-140mM、2.5-3.0mM、8-12mM和1.5-3mM,pH值6.5-7,以水配制。优选地,所述封闭液中牛血清白蛋白的质量百分含量为10%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM和2mM,pH值6.8。

[0020] 所述一抗、二抗的免疫浓度均为1:100,以PBS缓冲液配制。

[0021] 本发明还提供一种用于定位木本植物花粉管蛋白的试剂盒,所述试剂盒包含上述试剂组合。

[0022] 本发明进一步提供一种利用上述试剂盒定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法,包括以下步骤:

[0023] 1)花粉管体外萌发,用固定液固定,收集固定后的花粉管;

[0024] 2)用酶解液酶解花粉管,收集酶解后的花粉管;

[0025] 3)用封闭液封闭花粉管;

[0026] 4)进行一抗免疫;

[0027] 5)进行二抗免疫。

[0028] 前述的方法,步骤1)中待花粉管体外萌发至长度20-30μm(将花粉分散于液体培养基表面进行萌发),加入固定液进行固定。优选地,固定方式为抽真空固定。固定液的用量为2-3倍体积的液体培养基。

[0029] 前述的方法,步骤2)中酶解条件为:37℃酶解10-20min。酶解液的用量为1-2ml。

[0030] 前述的方法,步骤3)中封闭的方式为室温下置于静音混合器中,旋转封闭。封闭液的用量为1-2ml。

[0031] 前述的方法,步骤4)具体操作如下:

[0032] 向封闭后的花粉管中添加1ml稀释后的一抗,使花粉管悬浮于一抗中,将EP管水平置于4℃冰箱中,孵育过夜;将一抗免疫后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,吸弃一抗。

[0033] 向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管悬浮于PBS缓冲液中,以清洗花粉管表面的一抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此清洗操作步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

[0034] 前述的方法,步骤5) 具体操作如下:

[0035] 向上述一抗免疫后的花粉管中添加1ml二抗溶液,使花粉管悬浮于二抗中;室温下,避光置于静音混合器中,温和旋转1.5h后,将花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,吸弃二抗。

[0036] 向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管悬浮于PBS缓冲液中,以清洗花粉管表面的二抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此清洗操作步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

[0037] 本发明中,所述木本植物包括苹果。

[0038] 本发明具有以下优点:

[0039] 本发明提供了一种用于木本植物花粉管核蛋白提取的方法及其试剂盒,可以直接、高效、灵敏、特异性的定位花粉管中的功能蛋白。本发明以苹果花粉管为试材,通过酶解花粉管壁后,进行免疫荧光标记,为直观鉴定木本植物花粉管内功能蛋白的表达及定位提供技术体系。

## 附图说明

[0040] 图1为本发明实施例1中花粉管内功能蛋白的免疫荧光定位图。

[0041] 图2为本发明实施例2中体外添加的目的蛋白进入花粉管后的免疫荧光定位图。

[0042] 图3为本发明实施例2中体外添加的蛋白进入花粉管后与花粉管内的蛋白的共定位图。

## 具体实施方式

[0043] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0044] 本发明试剂中各组分浓度如无特殊说明,均指终浓度。

[0045] 以下实施例中纤维素酶R10:5U/mg;离析酶R10:5U/mg。

[0046] 纤维素酶R10酶活定义:1g酶粉(或1ml酶液)在50℃、pH4.8条件下,1min水解底物(滤纸、CMC、脱脂棉或水杨素)产生1μg葡萄糖的酶量为1个酶活力单位。

[0047] 离析酶R10酶活定义:1g酶粉(或1ml酶液)在50℃、pH 3.5条件下,1h分解果胶产生1mg半乳糖醛酸为1个酶活力单位。

[0048] 纤维素酶R10(目录号为110921-01)、离析酶R10(目录号为202050)购于Yakult Honsha,其他常规生化试剂购自北京经科宏达生物技术公司和北京欣经科生物技术公司。离心管等常规耗材购于Axygen公司。

[0049] 以下实施例中所用一抗为目的蛋白抗体,所用二抗为FITC标记的山羊抗兔二抗。

[0050] 实施例1定位苹果花粉管蛋白的免疫荧光方法

[0051] 由于发明人前期克隆获得了一个苹果‘国光’花粉管中的功能基因,并经原核表达获得抗原,制备了兔抗原的特异性抗体,为方便后续研究,选择‘国光’花粉为研究对象。定

位苹果花粉管蛋白的免疫荧光方法的流程为:萌发培养及固定—酶解—封闭—抗免疫—二抗免疫—荧光观察,因此分别从以上各个步骤设计实验来确定定位苹果花粉管蛋白的免疫荧光的最佳体系。

[0052] 一、苹果花粉管的萌发及固定

[0053] 1、苹果花粉管的萌发

[0054] 将苹果花粉分散于液体培养基表面,水合15min后,置于23℃培养箱中暗培30-50min进行萌发培养,期间利用体式显微镜观察花粉管的长度,待花粉管长度长至20-30μm,可停止萌发培养。

[0055] 2、苹果花粉管的固定

[0056] 将培养好的苹果花粉管转移至10ml体积的西林瓶中,并向西林瓶中添加1.5倍液体培养基体积的固定液,轻轻混匀,并利用注射器进行抽真空处理,使得固定液充分进入花粉管体内。静置30min后,待花粉管沉于西林瓶底部(沉于底部的花粉管为固定好的花粉管),用移液枪吸弃上清,此时应注意不能吸弃西林瓶底部的花粉管。待上清液全部吸弃后,向西林瓶中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的固定液,室温静置20-30min后,待花粉管沉于西林瓶底部,吸弃上清,重复此步骤3遍。

[0057] 所述固定液由PEPES、蔗糖、TritonX-100、多聚甲醛、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>组成,配方为:蔗糖和多聚甲醛的质量百分含量分别为10%和4%,TritonX-100的体积百分含量为1%,PEPES、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为100mM、137mM、2.7mM、10mM和2mM,以水配制。固定液的用量为4ml。

[0058] 二、苹果花粉管的酶解

[0059] 按照花粉管酶解液配方配制酶解液,55℃加热10min,冷却至室温(25℃)备用。

[0060] 将清洗后的上述花粉管约30μl转移至1.5ml EP管中,加入酶解液,轻弹EP管壁,使花粉管悬浮于酶解液中,置于37℃培养箱,水平放置15min,以保证花粉管充分酶解。将酶解后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃酶解液。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的酶解液,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3遍。

[0061] 所述酶解液由纤维素酶、离析酶、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>组成,配方为:纤维素酶和离析酶的质量百分含量分别为0.5%和1%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM和2mM,pH值6.8,以水配制。其中,所述纤维素酶和离析酶分别为纤维素酶R10和离析酶R10。酶解液的用量为1ml。

[0062] 三、苹果花粉管的封闭

[0063] 向上述酶解后的花粉管约30μl中添加1ml封闭液,使花粉管悬浮于封闭液中,室温下置于静音混合器中,温和旋转1.5h,以保证封闭液充分进入苹果花粉管中。将封闭后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃封闭液。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的封闭液,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3遍。

[0064] 所述封闭液由牛血清白蛋白、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>组成,配方为:牛血清白蛋白的质量百分含量为10%,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为137mM、2.7mM、10mM

和2mM,pH值6.8,以水配制。

#### [0065] 四、苹果花粉管的一抗免疫

[0066] 将花粉管内功能蛋白的特异性兔抗原抗体按照1:100的比例稀释于PBS缓冲液中。向上述封闭后的花粉管中添加1ml稀释后的一抗,使花粉管悬浮于一抗中,将EP管水平置于4℃冰箱中,过夜孵育。确保一抗能够进入花粉管中特异性的识别抗原蛋白。将一抗免疫后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃一抗。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的一抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

#### [0067] 五、苹果花粉管的二抗免疫

[0068] 将FITC标记的二抗按照1:100稀释于PBS缓冲液中。向上述一抗免疫后的花粉管中添加1ml二抗溶液,使花粉管悬浮于二抗中。室温下,避光置于静音混合器中,温和旋转1.5h后,将花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃二抗。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的二抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

#### [0069] 六、花粉管蛋白的荧光检测

[0070] 将免疫荧光处理后的花粉管置于荧光显微镜下,观察目的蛋白在花粉管中的表达及定位情况。如图1所示,绿色荧光代表该蛋白均匀分布于苹果花粉管胞质中。

[0071] 实施例2外源添加蛋白在苹果花粉管中的定位及其与花粉管内蛋白的共定位

[0072] 为了进一步验证定位花粉管蛋白的免疫荧光方法的可行性,我们以苹果花粉为研究对象。由于本发明人前期已证明向体外培养的花粉管中添加一种S核酸酶蛋白,该蛋白可以跨膜转运至花粉管内部,并且前期已制备了该蛋白的鼠抗原特异性抗体,因此我们利用定位花粉管蛋白的免疫荧光方法来检测外源添加的蛋白在花粉管中的定位情况。流程为:萌发培养及固定—酶解—封闭—一抗免疫—二抗免疫—荧光观察。此部分的操作方法如无特殊说明则与实施例1中的方法一致。

#### [0073] 一、苹果花粉管的萌发及固定

##### [0074] 1、苹果花粉管的萌发

[0075] 将苹果花粉分散于液体培养基表面,水合15min后,置于23℃培养箱中暗培30min进行萌发培养,期间利用体式显微镜观察花粉管的长度,待花粉管长度长至10-20μm,向花粉培养基中添加S核酸酶蛋白,继续培养15-30min(以保证S核酸酶蛋白进入花粉管中)后可停止萌发培养。

##### [0076] 2、苹果花粉管的固定

[0077] 花粉管的固定方法与实施例1中的操作方法一致。

##### [0078] 二、苹果花粉管的酶解

[0079] 此过程中的花粉管酶解方法与实施例1中的操作方法一致。

##### [0080] 三、苹果花粉管的封闭

[0081] 此过程中的花粉管封闭方法与实施例1中的操作方法一致。

##### [0082] 四、苹果花粉管的一抗免疫



[0083] 将外源添加的鼠抗原的S核酸酶抗体按照1:100的比例稀释于PBS缓冲液中,同时向PBS缓冲液中按1:100比例加入实施例1中的花粉管内的目的蛋白的兔抗原抗体。此时PBS缓冲液中同时含有两种抗原的抗体。向上述封闭后的花粉管中添加1ml稀释后的一抗,使花粉管悬浮于一抗中,将EP管水平置于4℃冰箱中,过夜孵育。确保一抗能够进入花粉管中特异性的识别抗原蛋白。将一抗免疫后的花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃一抗。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的一抗,静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

#### [0084] 五、苹果花粉管的二抗免疫

[0085] 分别将Rhodamine标记的二抗(山羊抗鼠)以及FITC标记的二抗(山羊抗兔)按照1:100稀释于PBS缓冲液中。向上述一抗免疫后的花粉管中添加1ml二抗溶液,使花粉管悬浮于二抗中。室温下,避光置于静音混合器中,温和旋转1.5h后,将花粉管置于室温,待花粉管沉于EP管底部,可吸弃二抗。向EP管中添加一定体积的PBS缓冲液,使花粉管可以悬浮于PBS缓冲液中,目的是清洗花粉管表面的二抗,室温静置20-30min后,待花粉管沉于EP管底部,吸弃上清,重复此步骤3-5遍,以确保花粉管表面无一抗残留。

#### [0086] 六、花粉管蛋白的荧光检测

[0087] 将免疫荧光处理后的花粉管置于荧光显微镜下,观察目的蛋白在花粉管中的表达及定位情况。如图2所示,红色荧光代表外源添加的S核酸酶蛋白在苹果花粉管中的定位情况。如图3所示,黄色荧光代表体外添加的S核酸酶蛋白的红色荧光信号与花粉管体内内源目的蛋白的绿色荧光信号的叠加,说明两种蛋白在苹果花粉管内具有共定位。

[0088] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

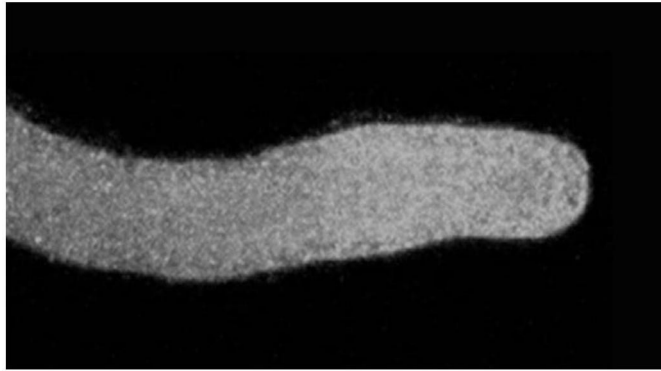


图1

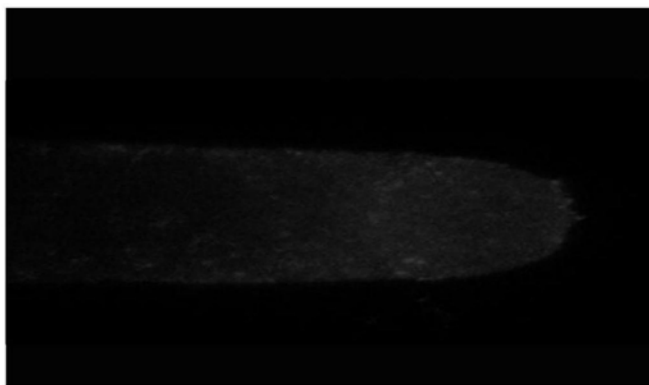


图2

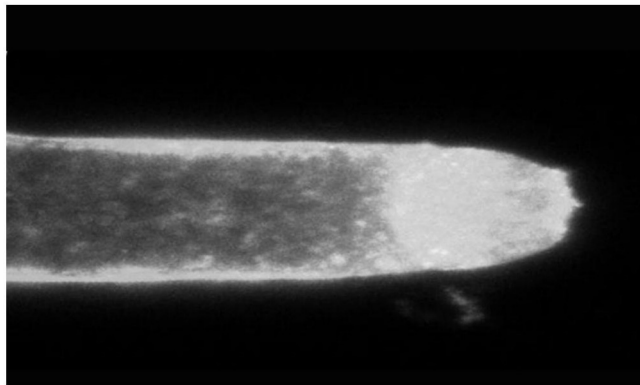


图3

专利名称(译)	一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN108318679A</a>	公开(公告)日	2018-07-24
申请号	CN2017110037998.6	申请日	2017-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	李天忠 顾钊宇 杨清 李威 李洋 于杰		
发明人	李天忠 顾钊宇 杨清 李威 李洋 于杰		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	王文君		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种定位木本植物花粉管蛋白的免疫荧光方法及其试剂盒。所述试剂盒中包括固定液、酶解液、封闭液、一抗和二抗；所述固定液中含有PEPES、蔗糖、TritonX-100、多聚甲醛、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述酶解液中含有纤维素酶、离析酶、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述封闭液中含有牛血清白蛋白、NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，所述一抗为目的蛋白抗体，所述二抗为FITC标记的山羊抗兔二抗。本发明以苹果花粉管为试材，通过酶解花粉管壁后，进行免疫荧光标记。采用本发明的方法可以直接、高效、灵敏、特异性的定位花粉管中的功能蛋白，为直观鉴定木本植物花粉管内功能蛋白的表达及定位提供技术体系。

