



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108507849 A

(43)申请公布日 2018.09.07

(21)申请号 201810307368.0

(22)申请日 2018.04.08

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山
街1号

(72)发明人 李桎钖 周竹青

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

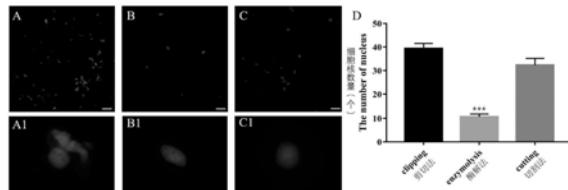
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法

(57)摘要

本发明公开了一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法,其步骤为:(1)小麦幼根的获取,(2)细胞核提取,(3)DAPI荧光染色法检测细胞核,(4)免疫荧光组织化学分析,(5)统计分析,本发明提供的细胞核提取方法可大大减少细胞核提取所需时间,延长细胞核内蛋白活性的保持,增加后续目的蛋白检测的准确性和成功率,降低细胞核悬液中杂质的浓度,减少杂质对免疫荧光实验的影响,增加细胞核悬液中细胞核的数量,便于后续进行相关的统计实验与分析。本发明提供的提取方法适用于制作细胞核悬浮液以便于进行后续的亚显微水平细胞学相关实验。



1. 一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法，其步骤为：

(1) 小麦幼根的获取：

将小麦种子消毒冲洗后在20–25°C置于放有湿润滤纸的培养皿中避光发芽，出芽1天后将幼苗移至培养间生长，生长期间补浇2次营养液，待幼苗生长至第5天，取小麦幼根备用，

所述的幼苗在培养间的培养条件为：18–23°C, 65–75% 相对湿度、光照12–14 h/d；

所述的营养液为1/2 霍格兰氏营养液，其配方为：2 mM 硝酸钙, 2.5 mM 硝酸钾, 0.5 mM 硝酸铵, 0.5 mM 磷酸二氢钾, 1 mM 硫酸镁, 2.5 μM 碘化钾, 50.2 μM 硼酸, 50 μM 硫酸锰, 15 μM 硫酸锌, 0.52 μM 锆酸钠, 0.05 μM 硫酸铜, 0.053 μM 氯化钴, 25 μM 乙二胺四乙酸一钠铁，每次添加20–30 mL；

(2) 细胞核提取：

取步骤(1)获得的小麦幼根0.5 g，将材料截取成4–6 mm的根段，置于冰上培养皿中，加入1 mL MgSO₄缓冲液，用双面刀片将材料在溶液中切成小碎块，之后通过过滤器将培养皿中的溶液转移至离心管中，4°C 1500 r/min 离心8–12 min，弃上清，沉淀加MgSO₄缓冲液重悬，即得细胞核悬液；

步骤(2)中所述的MgSO₄缓冲液的组分为：10 mmol/L 硫酸镁, 50 mmol/L 氯化钾, 5 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 3 mmol/L 二硫苏糖醇，体积比为0.25 % TritonX-100, pH值7.4–7.6，现配现用；

步骤(2)中所述的过滤器由450目尼龙膜和灭菌后的1.5 mL离心管组成，其制作方法为将尼龙膜裁剪成直径2 cm的圆片后，折成漏洞状直接放入离心管中，三层滤膜处靠管壁；

(3) DAPI荧光染色法检测细胞核：

取20 μL步骤(2)所制得的细胞核悬液，滴于附有多聚赖氨酸的载玻片上，制成细胞核贴片，室温晾干后，在避光条件下，载玻片上滴20 μL的DAPI染液染色4–6 min，去除染液后，用0.01mM, pH 7.2的PBS清洗5次，盖上盖玻片，直接置于荧光显微镜下观察并拍照；

(4) 免疫荧光组织化学分析：

取出制好的细胞核贴片，在玻片上加50 μL质量体积比为3%的BSA溶液，盖上盖玻片，于37°C 封闭1 h；揭去盖玻片，用0.01mM, pH 7.2的PBS溶液清洗3次，每次4–6 min；在玻片上加入50 μL 一抗，盖上盖玻片，于4°C 孵育12 h；揭去盖玻片，用0.01mM, pH 7.2的PBS溶液清洗3次，每次4–6 min；避光条件下，在玻片上加50μL带有FITC标记的二抗，盖上盖玻片，于37°C 孵育1 h；揭去盖玻片，用0.01mM, pH 7.2的PBS溶液清洗3次，每次4–6 min；之后再进行DAPI染色，荧光显微镜下检测信号，并拍照记录结果；

(5) 统计分析：

选取5张图片，实验重复3次；细胞核直径、数量的数据统计利用软件Image J, 3次测量取平均值；相关统计数据利用GraphPad Prism 7.00进行双尾T检验分析，P < 0.05说明存在显著性差异。

一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学技术领域,具体涉及一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法,该方法适用于制作细胞核悬浮液以便于进行接下来的亚显微水平细胞学相关实验。

背景技术

[0002] 免疫荧光技术(immunofluorescence)是根据抗原抗体识别反应的原理,先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物,再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内相应的抗原(或抗体)。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素,利用荧光显微镜就可以观察具有荧光标记的细胞或组织,从而确定抗原或抗体的性质、定位,或者利用相关定量技术进行定量的研究【SAINTE MARIE G.A Paraffin-Embedding Technique for Studies Employing Immunofluorescence [J]. Journal of Histochemistry&Cytochemistry, 1962, 10 (3) :250-256】,也被称为免疫组织化学。

[0003] 目前,应用于植物免疫组织化学的实验对象主要为组织标本,主要包括石蜡切片和冰冻切片,其中石蜡切片是制作组织标本最常用、最基本的方法,对于组织形态保存良好,还能长期存档,提供回顾性研究。但是,如果针对细胞核进行研究,特别是表观遗传学中对核内组蛋白的一些修饰进行研究,则组织切片就不是特别合适。首先,细胞核相对于植物组织而言,只是组织细胞中的一部分,但却是至关重要的。在常规组织切片中细胞核相对于整个切片而言个体较小,如果免疫荧光技术应用于细胞核内一些蛋白则不容易观察。其次,石蜡切片制样周期较长,过程繁琐,由于石蜡切片标本均用甲醛固定,使得细胞内抗原形成醛键、羧甲键而被封闭了部分抗原决定簇,同时蛋白之间发生交联而使抗原决定簇隐蔽。所以要求在进行染色时,需要先进行抗原修复或暴露,即将固定时分子之间所形成的交联破坏,从而恢复抗原的原有空间形态【杨捷频,常规石蜡切片方法的改良 [J]. 生物学杂志, 2006, 23 (1) :45-46; 黄华伟, 杜美菊. 免疫荧光分析的研究进展 [J]. 应用化工, 2007, 36 (4) :394-397】时,冰冻切片容易使植物组织本身造成冰冻伤害,只适用于一些特定的研究【Tokuyasu K T. Immunochemistry on ultrathin frozen sections [J]. Histochemical Journal, 1980, 12 (4) :381-403】。因此,目前关于将免疫荧光技术应用于细胞核内蛋白的方法,主要是将植物组织的细胞核提取出来制成细胞核悬浮液,再进一步制成细胞核贴片,进而完成相关免疫组织化学的实验【Grumin A A. Use of immunofluorescence method for studies of plant nuclei [J]. Biulleten, 1977; Beven A F, Simpson G G, Brown J W, et al. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants [J]. Journal of Cell Science, 1995, 108:509; Bai X D, Correa V R, Toruño T Y, et al. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei [J]. Mol Plant Microbe Interact. 2009, 22 (1) :18-30】。

[0004] 为了制备出个体完整,不聚集而且大量的细胞核来进行后续的实验分析,学者们尝试用不同方法进行植物细胞核提取的探索【宁华. 植物细胞核不同制备方法的比较研究

[J]. 华中师范大学学报 (自科版), 2009, 43(2) :308-311; 彭仁海, 刘方, 宋国立, 等. 一种高效提取棉花细胞核的技术 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18) :19-21】。小麦作为中国第三大粮食作物, 近年来其基因组信息不断完善, 同时其基因编辑技术也取得了一定进展【何中虎, 庄巧生, 程顺和, 等. 中国小麦产业发展与科技进步 [J]. 农学学报, 2018(1)】。因此对小麦细胞核内蛋白特别是与表观遗传学紧密联系的核内组蛋白的研究具有非常重要的现实意义。但是由于不同植物的结构以及组织来源的不同, 所以适合其他植物细胞核制备方法并不适用于小麦作物。本发明以小麦幼根为材料, 在前人的研究基础上【Li H, Yan S, Zhao L, et al. Histone acetylation associated up-regulation of the cell wall related genes is involved in salt stress induced maize root swelling [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1) :105; 孙永星, 李素花, 魏小丽, 等. 适合流式细胞仪分析的小麦细胞核提取方法比较 [J]. 生物学杂志, 2012, 29 (3) :88-91】，通过对实验方法以及实验器材的改进, 根据免疫荧光分析实验的结果与先前的细胞核制备方法进行比较, 从而寻找到了一种适合免疫荧光分析的小麦细胞核提取方法, 制备出完整的、形态较好、不聚集的细胞核悬液, 为利用免疫荧光分析实验对小麦细胞核内蛋白的研究提供基础条件。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法, 该方法可减少细胞核提取所需时间, 延长细胞核内蛋白活性的保持, 增加后续目的蛋白检测的准确性和成功率, 降低细胞核悬液中杂质的浓度, 减少杂质对免疫荧光实验的影响, 增加细胞核悬液中细胞核的数量, 便于后续进行相关的统计实验与分析。

[0006] 为了实现上述目的, 本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法, 其步骤为:

[0008] (1) 小麦幼根的获取:

[0009] 将小麦种子消毒冲洗后置于放有湿润滤纸的培养皿中避光发芽 (20-25°C) , 出芽1天后将幼苗移至培养间生长, 生长期补浇2次营养液, 待幼苗生长至第5天, 取小麦幼根备用,

[0010] 步骤(1)中幼苗在培养间的培养条件为: 18-23°C, 65-75% 相对湿度、光照12-14h/d;

[0011] 所述的营养液为1/2霍格兰氏营养液, 其配方为: 2mM硝酸钙 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) , 2.5mM硝酸钾 (KNO_3) , 0.5mM硝酸铵 (NH_4NO_3) , 0.5mM磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) , 1mM硫酸镁 (MgSO_4) , 2.5 μM 碘化钾 (KI) , 50.2 μM 硼酸 (H_3BO_3) , 50 μM 硫酸锰 (MnSO_4) , 15 μM 硫酸锌 (ZnSO_4) , 0.52 μM 钼酸钠 (Na_2MoO_4) , 0.05 μM 硫酸铜 (CuSO_4) , 0.053 μM 氯化钴 (CoCl_2) , 25 μM 乙二胺四乙酸一钠铁 (EDTA FeNa) , 每次添加20-30mL;

[0012] (2) 细胞核提取:

[0013] 取步骤(1)获得的小麦幼根0.5g, 先将材料截取成4-6mm的根段, 置于冰上培养皿中, 加入1 mL MgSO_4 缓冲液, 用新的锋利的双面刀片将材料在溶液中切成小碎块, 之后通过一种简易的自制过滤器将培养皿中的溶液尽可能多的转移至离心管中, 4°C 1500r/min离心8-12min, 弃上清, 沉淀加 MgSO_4 缓冲液重悬, 即得细胞核悬液;

[0014] 所述的 MgSO_4 缓冲液的组分为: 10mmol/L硫酸镁 (MgSO_4) , 50mmol/L氯化钾 (KCl) , 5

mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸,3mmol/L二硫苏糖醇,0.25% (v/v) TritonX-100,pH值7.4-7.6,现配现用;

[0015] (3) DAPI荧光染色法检测细胞核:

[0016] 取20 μ L步骤(2)所制得的细胞核悬液,滴于附有多聚赖氨酸的载玻片上,制成细胞核贴片,室温晾干(制好的细胞核贴片也可以-20℃储存备用),避光条件下,载玻片上滴20 μ L的DAPI染液染色4-6min,去除染液后,用0.01mM,pH 7.2的PBS清洗5次,盖上盖玻片,直接置于荧光显微镜下观察并拍照;

[0017] (4) 免疫荧光组织化学分析:

[0018] 取出制好的细胞核贴片,在玻片上加50 μ L 3% (m/v) BSA溶液,盖上盖玻片,于37℃封闭1 h;揭去盖玻片,用0.01mM,pH 7.2的PBS溶液清洗3次,每次4-6min;在玻片上加入50 μ L一抗,盖上盖玻片,于4℃孵育12h;揭去盖玻片,用0.01mM,pH 7.2的PBS溶液清洗3次,每次4-6min;避光条件下,在玻片上加50 μ L带有FITC标记的二抗,盖上盖玻片,于37℃孵育1h;揭去盖玻片,用0.01mM,pH 7.2的PBS溶液清洗3次,每次4-6min;之后再进行DAPI染色,荧光显微镜下检测信号,并拍照记录结果;

[0019] (5) 统计分析:

[0020] 相关统计实验选取5张图片,实验重复3次;细胞核直径、数量的数据统计利用软件Image J, 3次测量取平均值;相关统计数据利用GraphPad Prism 7.00进行双尾T检验分析,P<0.05说明存在显著性差异。

[0021] 一种简易的自制过滤器,由450目尼龙膜和灭菌后的1.5ml离心管组成。其制作方法为将尼龙膜裁剪成直径2cm的圆片后,折成漏洞状直接放入离心管中,三层滤膜处靠管壁即可。

[0022] 通过上述的技术方案,主要解决了细胞核提取液过滤时容易泄露的问题。在植物组织细胞核的提取过程中,所需提取液用量极少,只有1-2ml,而目前现有的细胞过滤网筛主要用于原生质体的制备,并不针对植物细胞核的过滤,因此相对于植物组织细胞核的提取,其尺寸较大,无法直接过滤至1.5ml离心管,需要其他的玻璃器皿作为转移,那么就不可避免的影响了滤液的收集。利用改进后的细胞核过滤装置明显增加了细胞核滤液中细胞核的数量(图2),由60-75个(20 μ L)增加至 330-350个(20 μ L)。

[0023] 除此之外,所用尼龙网孔径也由500目改为450目,因为麦类作物本身为多倍体作物,比一般高等植物的细胞核要大一些,而植物根部分生区细胞分裂能力强,相对于同一植株中其他部位细胞核又较大一些。因此,目前所用过滤网孔径不能够满足小麦根部细胞核的提取,从图2也可看出,利用原方法提取的小麦根细胞核形态不完整,核悬液中存在细胞碎片。

[0024] 与现有技术相比,本发明的优点和有益效果为:

[0025] (1) 本发明有效解决了细胞核提取液过滤时容易泄露的问题;

[0026] (2) 本发明简化了细胞核过滤的方法,同时增加了细胞核过滤的效率,利用改进后的细胞核过滤装置明显增加了细胞核滤液中细胞核的数量(图2),由60-75个(20 μ L)增加至 330-350个(20 μ L);

[0027] (3) 本发明提供的方法大大减少了细胞核悬液中的杂质,保持了细胞核内蛋白的活性,增加了后续免疫荧光实验的成功率。

[0028] (4) 通过本发明提供的方法提取的小麦根部细胞核,其形态完整,清晰可见,以核内组蛋白 H3、H4为目标蛋白进行免疫组织化学分析发现,其荧光信号明显,染色效果良好,定位准确,说明本发明提供的细胞核提取方法适合用于对小麦根部细胞核进行免疫荧光分析。

附图说明

- [0029] 图1为自制细胞核过滤器示意图;
- [0030] 其中A为常用的细胞过滤网筛;B、C为简易细胞核过滤器组装。标尺=2cm (A,B,C)。
- [0031] 图2为不同细胞核提取方法制备小麦根细胞核贴片的比较;
- [0032] 其中A:剪切法细胞核悬液制片观察;B:酶解法细胞核悬液制片观察;C:切割法细胞核DAPI 染色;A1,B1,C1:不同提取方法细胞核DAPI染色;标尺=50 μm (A,B,C);标尺=20 μm (A1, B1,C1);D:不同细胞核提取方法制得细胞核玻片的细胞核数量统计。***表示该组统计数据与另外两组具有显著性差异 ($P<0.001$)。
- [0033] 图3为小麦幼根核内组蛋白H3、H4免疫荧光分析;
- [0034] 实验所用一抗为Histone H3、Histone H4 (Active Motif, 上海), FITC标记使用488nm激光器进行激发,图片利用软件Image J进行融合。标尺=20 μm 。
- [0035] 图4为小麦幼根核内组蛋白H3、H4荧光信号平均灰度值统计
- [0036] 统计实验选取5张图片,利用软件Image J进行灰度值测量,3次测量取平均值。**表示数据存在显著性差异, $0.001 < P < 0.01$

具体实施方式

- [0037] 实施例1
- [0038] 一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法,其步骤为:
- [0039] (1) 小麦幼根的获取:
- [0040] 实验材料为小麦品种(*Triticum aestivum L.*)华麦8号,种子消毒冲洗后置于放有湿润滤纸的培养皿中避光发芽(20–25°C),出芽1天后将幼苗移至培养间生长,生长期补浇2次营养液,待幼苗生长至第5天,取小麦幼根进行细胞核抽提实验,幼苗在培养间的培养条件:18–23°C,65–75%相对湿度、光照12–14h/d。
- [0041] 所述的营养液为1/2霍格兰氏营养液,其配方为:2mM硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$),2.5mM硝酸钾(KNO_3),0.5mM硝酸铵(NH_4NO_3),0.5mM磷酸二氢钾(KH_2PO_4),1mM硫酸镁(MgSO_4),2.5 μM 碘化钾(KI),50.2 μM 硼酸(H_3BO_3),50 μM 硫酸锰(MnSO_4),15 μM 硫酸锌(ZnSO_4),0.52 μM 钼酸钠(Na_2MoO_4),0.05 μM 硫酸铜(CuSO_4),0.053 μM 氯化钴(CoCl_2),25 μM 乙二胺四乙酸一钠铁(EDTA FeNa),每次添加20–30mL,配制方法参见Deng X Y,Li J W,Yang C N,et al.A preliminary study on programmed cell death aspects and roles of reactive oxygen species during aerenchyma formation in wheat roots under water logging [J].Journal of Triticeae Crops,2009。
- [0042] (2) 细胞核提取:
- [0043] 2.1不同细胞核提取液配方
- [0044] 近年来,植物细胞核提取方法按细胞壁去除的方式主要分为两类,一类以直接剪

切法为代表的机械破壁法,MgSO₄缓冲液为剪切法所用细胞核提取液;一类以细胞壁降解酶为主要作用的酶解破壁法,酶解液为其提取细胞核所用提取液。配方如下:

[0045] (1) MgSO₄缓冲液(配制方法参见Zhang L,Qiu Z,Hu Y,et al.ABA treatment of germinating maize seeds induces VP1gene expression and selective promoter-associated histone acetylation[J].Physiologia Plantarum,2011,143 (3) :287-296)组分:10mmol/L硫酸镁(MgSO₄) ,50mmol/L氯化钾(KCl) ,5mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) ,3mmol/L二硫苏糖醇(DTT) ,0.25% (v/v) TritonX-100, pH值7.4 或7.5或7.6,现配现用。

[0046] (2) 酶解液(配制方法参见Loureiro J,Rodriguez E,Doležel J,et al.Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry[J].Ann Bot,2006,98 (3) :679-689)组分:纤维素酶R-10 (Yakult,日本)(1.5%,w/v) ,果胶酶Y-23 (Yakult,日本)(0.1%,w/v) ,5mmol/L二水合氯化钙(CaCl₂ • 2H₂O) ,5mmol/L甘露醇,0.5mmol/L磷酸二氢钾(KH₂PO₄) ,2mmol/L硫酸镁(MgSO₄) , 3mmol/L 2-氨基吗啉乙烷磺酸(MES) ,pH值5.5或5.6或5.7,现配现用。

[0047] 2.2多种细胞核提取方法

[0048] 2.2.1剪切法(方法参见Loureiro J,Rodriguez E,Doležel J,et al.Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry[J].Ann Bot,2006,98 (3) :679-689)

[0049] 取0.5g步骤(1)获得的小麦幼根,加入步骤2.1配制的MgSO₄细胞核提取液,在冰上用锋利手术剪刀将其剪碎,500目的尼龙网过滤至离心管中,4℃条件下,静置孵育10min,1000r/min离心10min,弃上清,沉淀加步骤2.1配制的MgSO₄细胞核提取液冲洗一次,再次经500目的尼龙网过滤,此即细胞核悬液。

[0050] 2.2.2酶解法

[0051] 取步骤(1)获得的小麦幼根0.5g,用双面刀片将其切成小碎块,置于步骤2.1配制的酶解液中于25℃的环境中暗解3h左右,中间每隔30min振荡一次(小麦幼根与酶解液之比(m/v)为1:5),之后用280目尼龙网过滤,除去未完全酶解的组织碎片,滤液转移至离心管中,800r/min离心2min 后收集并用PBS悬浮,在PBS悬浮液中,加入0.5% (v/v)的Triton X-100,孵育5-10min,500 目尼龙网过滤,滤液为细胞核悬液。

[0052] 2.2.3切割法

[0053] 综合上述两种方法,并加以改进,取步骤(1)获得的小麦幼根0.5g,先将材料截取成4或5 或6mm的根段,置于冰上培养皿中,加入1mL步骤2.1配制的MgSO₄缓冲液,用新的锋利的双面刀片将材料在溶液中切成小碎块,之后通过一种简易的自制过滤器将培养皿中的溶液尽可能多的转移至离心管中,4℃1500r/min离心8或10或12min,弃上清,沉淀加步骤2.1配制的MgSO₄细胞核提取液重悬,即得细胞核悬液。

[0054] (3) DAPI荧光染色法检测细胞核:

[0055] 取20μL步骤2.2.3所制得的细胞核悬液,滴于附有多聚赖氨酸的载玻片上,制成细胞核贴片,室温晾干(制好的细胞核贴片也可以-20℃储存备用),避光条件下,载玻片上滴20μL的DAPI染液(碧云天,C1006)染色4或5或6min,去除染液后,用PBS(0.01mM,pH 7.2)清洗5次,盖上盖玻片,直接置于荧光显微镜(Olympus BX-53)下观察并拍照。

[0056] (4) 免疫荧光组织化学分析:

[0057] 取出制好的细胞核贴片,在玻片上滴加50 μ L 3% (m/v) 的BSA,盖上盖玻片,于37℃ 封闭1 h;揭去盖玻片,PBS溶液(0.01mM, pH 7.2)清洗3次,每次4或5或6min;在玻片上加入50 μ L 一抗,盖上盖玻片,于4℃ 孵育12h;揭去盖玻片,PBS溶液清洗3次,每次4或5或6min;避光条件下,在玻片上加50 μ L带有FITC标记的二抗,盖上盖玻片,于37℃ 孵育1h;揭去盖玻片,PBS溶液清洗3次,每次4或5或6min;之后再进行DAPI染色,荧光显微镜(Olympus BX-53) 下检测信号,并拍照记录结果。

[0058] (5) 统计分析:

[0059] 相关统计实验选取5张图片,实验重复3次;细胞核直径、数量的数据统计利用软件Image J, 3次测量取平均值;相关数据利用GraphPad Prism 7.00进行双尾T检验分析,P<0.05说明存在显著性差异。

[0060] 实施例2

[0061] 细胞核过滤方法的优化与改良

[0062] 细胞核过滤的方法是细胞核悬液制备过程中的一步关键性实验,本实验针对小麦根部细胞核提取方法的改良与优化主要是针对以往复杂不便的细胞核过滤方法的改进。首先过滤设备由通常细胞核过滤所用细胞网筛(图1A)替换为一种可自制的简易过滤器(图1C),所需材料为450目尼龙膜和灭菌后的1.5ml离心管(图1B),将尼龙膜裁剪成直径2cm的圆片后,折成漏洞状放入离心管中,三层滤膜处靠管壁(图1C)。

[0063] 目前现有的细胞过滤网筛相对于植物组织细胞核的提取,其尺寸较大,无法直接过滤至1.5ml 离心管,操作不便。利用改进后的细胞核过滤装置,简化了细胞核过滤的步骤,同时明显地增加了细胞核滤液中细胞核的数量,由60-75个(20 μ L)增加至330-350个(20 μ L)。除此之外,所用尼龙网孔径也由500目改为450目,因为麦类作物根部细胞核相对于一般植物其他部位细胞核较大。用原方法提取小麦根部细胞核,会造成其形态的不完整,使细胞核悬液中残留细胞核碎片(图2A、A1)。

[0064] 总的来说,改良后的细胞核过滤方法,简化了细胞核的过滤,操作更加简便,同时增加了细胞核过滤的效率,减少了细胞核悬液中的杂质,保持了细胞核的完整性。

[0065] 实施例3

[0066] 三种不同的提取方法提取小麦幼根细胞核效果比较

[0067] 不同方法提取小麦幼根细胞核结果如图2所示。从图中可以看出,剪切法制备的细胞核玻片上杂质较多,存在细胞碎片与细胞核不易区分(图2A)。另外,有些细胞核形态不完整,并且细胞核多成团存在,粘连在一起不易分离(图2A1)。但是剪切法所得细胞核悬液中细胞核数量最多(图 2D)。

[0068] 酶解法制备细胞核悬液的过程周期较长,不宜保证细胞核的活性。而且其方法提取的细胞核数量最少(图2D)。但是,通过此方法制备的细胞核形态完整,杂质较少(图2B1)。

[0069] 用切割法制备的小麦幼根细胞核贴片,细胞核数目较多,杂质少,视野中只有极少量的细胞碎片(图2C)。DAPI染色后在显微镜下观察到细胞核形态呈饱满的圆形或者椭圆形(图2C1),其细胞核提取过程简单方便,细胞核悬液制备方便快捷。因此,使用通过此方法制备的细胞核玻片进行小麦幼根核内组蛋白H3、H4免疫荧光组织化学实验。

[0070] 小麦幼根核内组蛋白H3、H4免疫荧光分析结果如图所示(图3)。通过切割法制备的

小麦根细胞核玻片进行核内组蛋白H3、H4免疫组织化学实验,暗室条件下,将完成免疫组织化学后的细胞核玻片置于荧光显微镜下(100倍油镜)观察。其细胞核形态完整,清晰可见,目标蛋白FITC荧光信号明显,融合后能够明确观察到荧光信号的重叠,同时,可利用Image J等软件对细胞核的直径、数量以及荧光信号进行定量处理。本实验中通过切割法制备的细胞核悬液中小麦幼根细胞核平均直径为26 μm ,平均数量为340个(20 μl),目标蛋白荧光信号定量分析见图4。

[0071] 在以往的细胞核悬液制备过程中,细胞核过滤的效率是细胞核悬液内细胞核数目和完整性的关键因素之一【Gualberti G, Doležel J, Macas J, et al. Preparation of pea (*Pisum sativum*, L.) chromosome and nucleus suspensions from single root tips [J]. *Theoretical&Applied Genetics*, 1996, 92 (6) : 744–751】。用于细胞核过滤的滤网孔径的大小及材质,国内外学者都已做了较为详细的研究【Gualberti G, Doležel J, Macas J, et al. Preparation of pea (*Pisum sativum*, L.) chromosome and nucleus suspensions from single root tips [J]. *Theoretical&Applied Genetics*, 1996, 92 (6) : 744–751; 丁国昌, 黄秀清, 林思祖, 等. 流式细胞检测中杉木细胞核悬浮液的制备 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2013, 33 (1) : 97–100】, 目前通用的细胞核过滤网孔径大小为500目, 材质也由原来的不锈钢改进为现在所用的尼龙网【宁华. 植物细胞核不同制备方法的比较研究 [J]. 华中师范大学学报 (自科版), 2009, 43 (2) : 308–311】。但是, 将提取液过滤至离心管中, 使用现有的细胞过滤网筛(图1A)则会有许多不便, 而且很容易造成提取液外漏导致细胞核提取数量的减少。另外, 对于高等作物小麦来说, 其细胞核尺寸相较于其他植物的要偏大, 而根部细胞核又比植株其他部位(如叶片)的偏大【Ali Arak University Rezaei, Majid Arak University Mahdiyeh. DNA fragmentation and change of nucleus in salt-treated cells of wheat root [J]. *International Journal of Forest Soil&Erosion*, 2013; 刘健, 方芳, 徐宝华, 等. 普通小麦根端分生组织细胞核中核内包涵体结构的电镜观察 [J]. 分析仪器, 2011 (2) : 54–56】, 因此, 500目孔径并不一定适合小麦根部细胞核的提取。本发明针对小麦根部细胞核的提取方法的改良, 首先就是对细胞核提取液的过滤, 设计了一种可自制的简易过滤器(图1C)。如此, 当使用移液器将细胞核提取液, 顺着离心管管壁慢慢注入过滤器时, 即可避免提取液的遗漏, 增加悬液中细胞核的数量。

[0072] 针对适用于免疫组织化学实验的细胞核提取, 这就要求制备的细胞核悬液中要有大量的完整的细胞核, 且不能聚集。因此, 为了保证细胞核形态和功能的完整性, 提取缓冲液中需要加入各种成分。无机盐(KCl)能够维持缓冲液中的离子强度, Mg²⁺可以稳定细胞核中的染色质【Lee H, Lin T. Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23 (1) : 53–58】; DTT能够消除酚类混合物对核内DNA染色的影响, 保护染色质蛋白【金亮, 张宪银, 薛庆中. 分离缓冲液对水稻细胞核悬液DNA分辨率效应的比较 [J]. 浙江农业学报, 2007, 19 (2) : 93–96】; Triton X-100是非离子去垢剂, 能够促使细胞核从细胞内释放至溶液中, 同时利用Tris碱维持缓冲液中pH的相对稳定。在酶解法提取细胞核的过程中, 最后重悬细胞核使用的是PBS溶液, 其pH与提取所用酶解液差别较大, pH的改变容易导致小麦幼根内细胞核的破碎【Masuda A, Oyamada M, Nagaoka T, et al. Regulation of cytosol-nucleus pH gradients by K⁺/H⁺ exchange mechanism in

the nuclear envelope of neonatal rat astrocytes[J].Brain Research, 1998,807 (1-2) :70】，这应该是造成细胞核悬液中小麦幼根细胞核数目不多的直接原因。因此，对提取小麦根细胞核的改良保留了剪切法中MgSO₄缓冲液的使用。除此之外，在处理材料时不易将组织切的过碎，避免过滤时滤液中混有除细胞核外的杂质【孙永星,李素花,魏小丽,等.适合流式细胞仪分析的小麦细胞核提取方法比较[J].生物学杂志,2012,29 (3) :88-91;孙永星.增强UV-B辐射与 He-Ne激光辐照对小麦细胞凋亡影响的研究[D].山西师范大学,2012】。剪切法中用手术剪处理材料会造成过多的细胞碎片，因此在改良的切割法中利用新的锋利的刀片替换，材料用锋利的刀片切成小碎块，使根细胞的细胞核在提取液中流出即可，这样，最后制得的细胞核悬液中就不会存在过多的细胞碎片杂质(图2C)。

[0073] 在本发明中，利用改良后的切割法提取小麦根部细胞核并经过免疫组织化学染色后，在荧光显微镜下检测，再利用相关软件对图像进行数据处理并量化分析，其结果如图2，图3所示。本实验中利用改良后的切割法提取的小麦根部细胞核，其形态完整，清晰可见，以核内组蛋白H3、H4为目标蛋白进行免疫组织化学分析发现，其荧光信号明显，染色效果良好，定位准确，说明此细胞核提取方法适合用于对小麦根部细胞核进行免疫荧光分析。

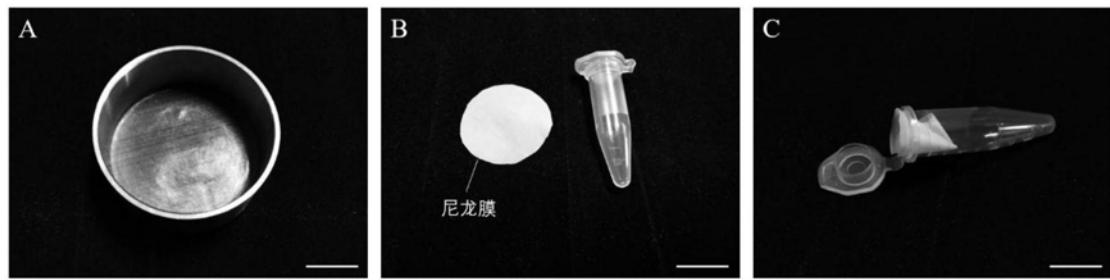


图1

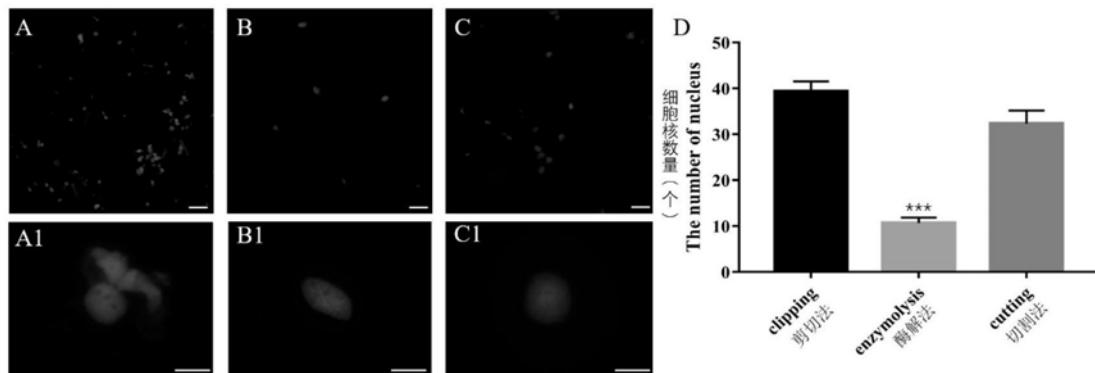


图2

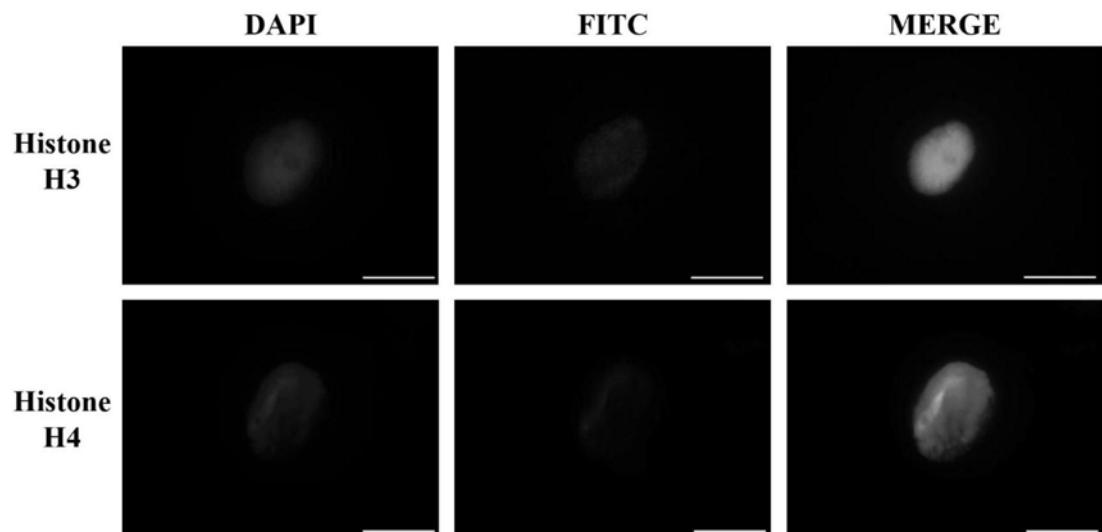


图3

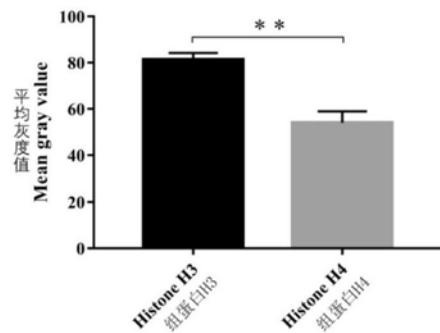


图4

专利名称(译)	一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法		
公开(公告)号	CN108507849A	公开(公告)日	2018-09-07
申请号	CN201810307368.0	申请日	2018-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	李桎钖 周竹青		
发明人	李桎钖 周竹青		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
代理人(译)	王敏峰		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种适用于免疫荧光分析的小麦根部细胞核提取方法，其步骤为：(1)小麦幼根的获取，(2)细胞核提取，(3)DAPI荧光染色法检测细胞核，(4)免疫荧光组织化学分析，(5)统计分析，本发明提供的细胞核提取方法可大大减少细胞核提取所需时间，延长细胞核内蛋白活性的保持，增加后续目的蛋白检测的准确性和成功率，降低细胞核悬液中杂质的浓度，减少杂质对免疫荧光实验的影响，增加细胞核悬液中细胞核的数量，便于后续进行相关的统计实验与分析。本发明提供的提取方法适用于制作细胞核悬浮液以便于进行后续的亚显微水平细胞学相关实验。

