

葡萄种子细胞中脱落酸的胶体金免疫电镜定位^①

黄丛林 张大鹏^② 贾文锁

(中国农业大学园艺学院)

摘 要 用胶体金免疫电镜技术,对脱落酸(ABA)在葡萄种子细胞超微结构水平上的分布进行了研究。按葡萄种子细胞液泡中是否含有电子密度大的染色物质,可将其分为含酚和无酚2个主要类型。在含酚细胞中电子密度大的染色物质呈多种状态存在,先是均匀而稀疏地分布在液泡中,然后逐渐凝聚成块状,最后浓缩成一薄层并均匀分布在液泡膜内侧。无酚细胞中金颗粒主要标记在细胞核和细胞质,特别是细胞核有大量金颗粒标记,细胞壁有少量金颗粒标记,液泡中没有发现金颗粒标记。和无酚细胞相似,在含酚细胞中金颗粒主要标记在细胞核和细胞质,特别是细胞核金颗粒密度很大,细胞壁有极少金颗粒标记。引人注目的是液泡中聚集态的染色物质上也发现金颗粒标记,但稀疏而均匀分布的染色物质上几乎找不到金颗粒标记,当染色物质最终浓缩成薄层状态时则发现有大量的金颗粒标记。无论用免疫前兔血清染色的对照切片还是材料,不被EDC固定的对照切片中都很难找到金颗粒标记,说明该ABA免疫胶体金电镜定位结果是特异、可靠的。

关键词 葡萄; 种子; 脱落酸; 胶体金免疫电镜; 定位

分类号 S663.1; Q945.65

Immunogold Electronic-microscopy Localization of Abscisic Acid in Seed Cells of Grapevine

Huang Conglin Zhang Dapeng Jia Wensuo
(College of Horticulture Sciences, CAU)

Abstract Abscisic acid (ABA) localization was carried out with immunogold electron-microscopy technique in seed cells of grapevine (*Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L.). Two different kinds of cells were observed in the grape seed, one kind containing in their vacuole large amounts of electronically dense substances (phenolic compounds?) (called phenol-rich cells), and another containing no such substances (called non-phenol cells). In the phenol-rich cells the electronically dense substances appeared in many different states, from the sparsely and evenly distributed state gradually aggregating to lumped state and finally concentrating to a thin and very dense layer near the vacuole membrane. In the non-phenol cells both nucleus and cytoplasm were heavily labeled by gold particles, and few gold particles were also found in the cell wall, but no particles were observed in the vacuole. In the phenol-rich cells both nucleus and cytoplasm were heavily labeled by gold particles, and few particles were also found in cell wall, which is similar to the non-phenol cells. In the phenol-rich cells the electronically dense substances-distributed areas were also labeled by gold particles

收稿日期: 1999-01-04

①国家自然科学基金资助项目 39670518 和 39500103

②张大鹏,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

especially when these substances aggregated to the lumped and the final thin layer state. Gold particles were scarcely found nor in the sections treated with pre-immune rabbit serum instead of the anti-ABA IgG neither in the sections without EDC fixation, which demonstrated that the immunogold localization of ABA was specific and reliable.

Key words grapevine; seed; immunogold electron-microscopy; localization; abscisic acid

脱落酸(ABA)是一种重要的植物激素,它有广泛的生理功能,特别是在胚胎发育,种子及芽的休眠与萌发,气孔运动及植物对逆境的反应等过程中起着非常重要的作用^[1,2]。多年来,ABA被认为是调控许多果实如葡萄果实发育及成熟的重要因素^[3~6]。传统上,有关植物激素的研究一般采用高压液相色谱、放射免疫分析以及酶联免疫分析等方法对植物整体器官或组织中的激素含量进行分析。但植物激素在组织和细胞中的分布可能是极不均匀的^[7~9],而只有作用位点中的激素积累才能诱发生理效应,因此深入揭示激素在组织和细胞中的分布是一项十分重要的工作。我们曾在蚕豆叶肉细胞及保卫细胞中进行了ABA的超微结构水平定位,并取得了理想结果^[10,11]。鉴于ABA在葡萄种子发育中的重要作用,以及种子中ABA对果实发育及成熟的重要调控作用,本试验对葡萄种子中的ABA进行了亚细胞水平上的免疫胶体金电镜定位研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料和电镜制样

葡萄浆果取自三年生田间栽培的红富士品种(*Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L.),于盛花后2周取种子(发育初期的种子)为材料进行ABA定位研究。种子取出后迅速分割并投入2%EDC[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide]溶液中,抽气0.5h后,以4%多聚甲醛+1%戊二醛的磷酸盐缓冲液,在4℃下固定8h,经磷酸盐缓冲液充分洗涤后,酒精系列脱水。Lowicryl K₄M -20℃浸透过夜,-20℃UV聚合48h后,-4℃下继续聚合24h。超薄切片捞在100目以0.3%Formar膜覆盖的镍网上。

1.2 抗体制备

按贾文锁等的方法^[10]。

1.3 免疫染色程序

根据贾文锁等^[10]的方法略加改进。简述如下:超薄切片经1mg·mL⁻¹正常羊血清IgG阻断30min后,不洗涤直接在兔抗ABA IgG中4℃下孵育过夜,TBST(0.025mol·L⁻¹ Tris-HCL buffer pH7.6+0.15molL⁻¹ NaCL+0.1% triton x-100)充分洗涤后,转入金标羊抗兔抗体(金颗粒直径15nm)室温孵育1h,TBST及双蒸水充分洗涤及铀染和铅染后,电镜观察。

1.4 对照

本研究设置2种对照,一是用正常兔血清代替ABA多抗染色,二是材料不经EDC固定,如不用EDC固定,ABA将丢失殆尽。因此,在2种对照中,都不应有较多的金颗粒标记。

2 结果

2.1 种子细胞的特征

从种子细胞的整体照片(图版 I-1a,-1b,-1c)可以看出,种子细胞主要包括2个类型,一是液泡内含染色物质丰富的细胞,二是液泡中几乎不含染色物质的细胞。Nii 和 Coombe^[12]曾在葡萄果皮组织中根据苏丹黑染色结果推测这种物质为酚类物质,但由于苏丹黑不仅可以染酚类物质,而且还可以染糖类等物质,所以这些物质的确切性质尚需进一步的研究才能最后断定。这种富含染色物质的细胞在种子组织中占绝大多数。我们暂且将富含这种物质的细胞称为含酚细胞,不含这种物质(或含量很少)的细胞称为无酚细胞。在含酚细胞中,染色物质呈多种状态存在,先是以稀疏而均匀的状态分布在整个液泡中(图版 I-1a,-1b,细胞 A),然后逐步聚成不同大小的块状(图版 I-1a,-1b,-1c 细胞 B),最后完全浓缩为一薄层并紧贴液泡膜内侧分布(图版 I-1a,-1b,-1c 细胞 C)。染色物质分布状态在细胞间的连续变化是一个十分引人注目的现象。无论是含酚还是无酚的细胞,在种子发育的初期,庞大的液泡就已将相对微量的细胞质挤在紧贴细胞壁的部位。由于 Lowicryl K₄M 对膜系统的保存不太好,以 Lowicryl K₄M 包埋时,常看到细胞质是以囊泡集群的状态存在(图版 I-1c,-2,图版 II-5)。我们曾以 Spurr 做包埋剂进行电镜观察,证实这些囊泡实际上是内膜系统如内质网和液泡膨大或分割而成的。

2.2 ABA 免疫电镜定位

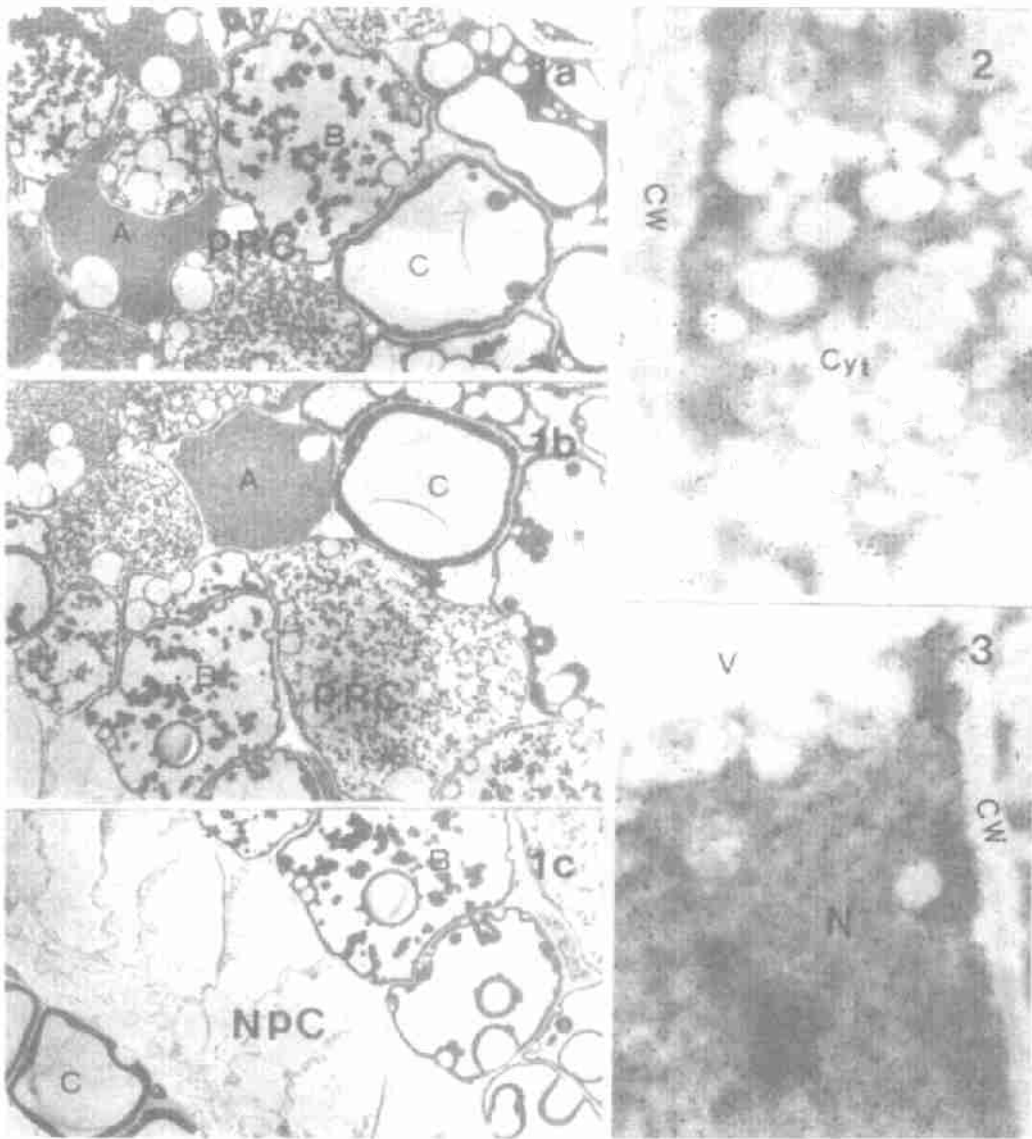
无酚细胞中,金颗粒主要标记在细胞质(图版 I-2)和细胞核(图版 I-3),特别是细胞核有大量金颗粒标记,细胞壁也有很少的金颗粒标记,液泡中没有发现金颗粒标记(图版 I-2,-3)。和无酚细胞类似,含酚细胞中金颗粒主要标记在细胞核(图版 II-3)和细胞质(图版 II-2,-3),特别是细胞核标记密度较高(图版 II-3),细胞壁仅有少量金颗粒标记(图版 II-1~4);此外,在酚类物质分布区域也发现金颗粒标记(图版 II-2,-4),但当酚类物质呈均匀而稀疏状态分布时,几乎找不到金颗粒标记(图版 II-1,-2),随着酚类物质的凝聚,特别是当酚类物质最终浓缩为一薄层并均匀分布在液泡膜内侧时,酚类物质分布区域则有大量金颗粒标记(图版 II-4)。

2.3 对照

用免疫前兔血清代替 ABA 抗体染色的切片很难找到金颗粒标记(图版 II-5),如果材料不用 EDC 固定,切片上也很难发现金颗粒标记(图版 II-6)。两种对照都说明,本实验中金颗粒标记是特异的,因此,本实验中 ABA 免疫胶体金电镜定位结果是可靠的。

3 讨论

胶体金免疫电镜技术一般适用于蛋白质等大分子物质的定位^[13]。近年来,少数研究者试图利用该技术对植物激素进行定位研究^[10,14,15],但由于激素是小分子半抗原物质,流动性强,抗原抗体反应较差,因此其定位难度很大。胶体金免疫电镜定位必须兼顾超微结构保存和抗原活性保存两个方面。Spurr, Epon 812 以及 LR white 结合锇酸固定对细胞超微结构的保存很好,但对抗原活性的保存十分不利。我们以 Spurr 包埋对蚕豆叶片进行 ABA 定位的研究表明,ABA 多抗处理的切片和用免疫前兔血清外理的切片金标密度差异不大,说明抗原活性大部分丢失,并且 Spurr 本身引起了非常高的非特异染色^[10]。Lowicryl K₄M 可以很好地保存抗原活



图版 I 葡萄种子的两种细胞及 ABA 在其中的分布

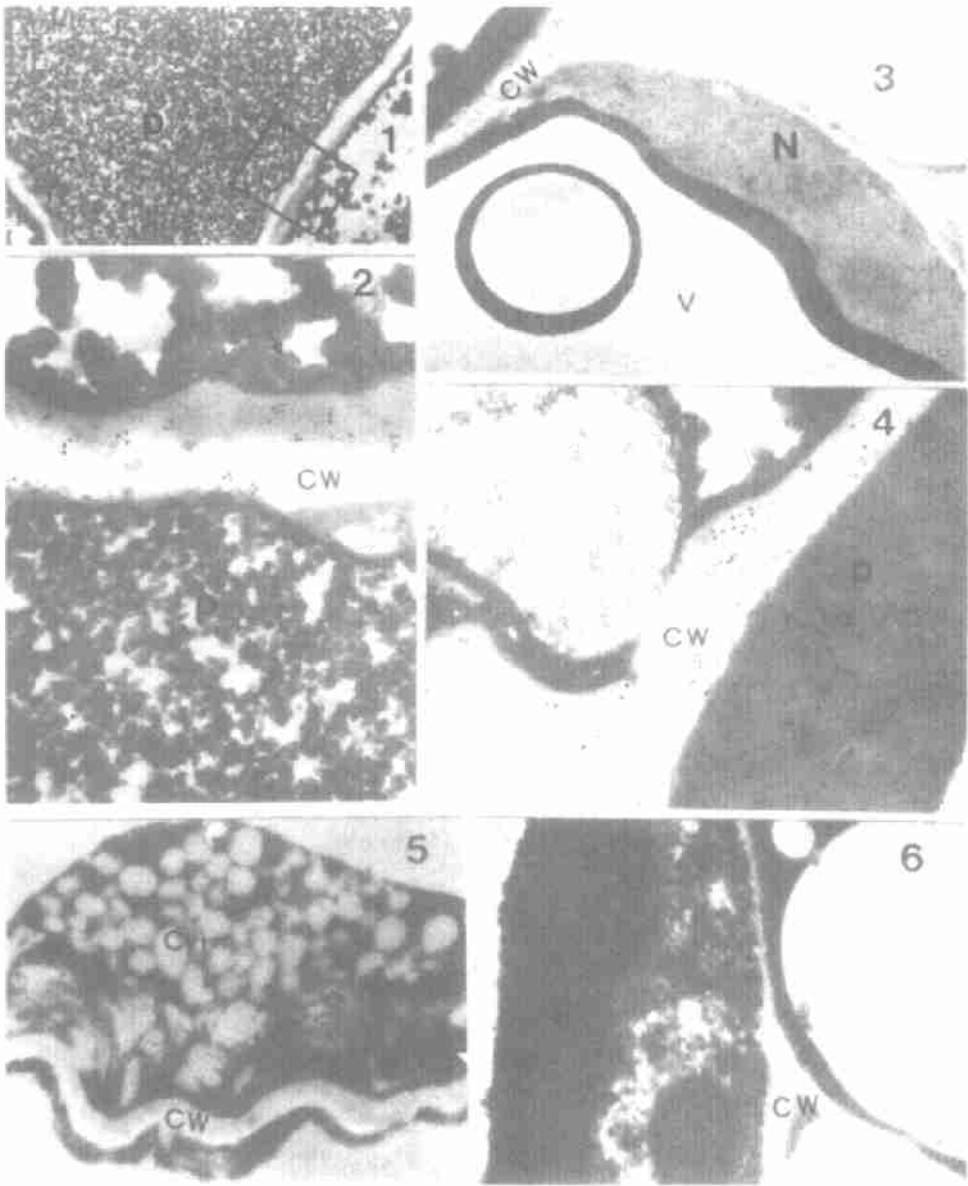
图版说明

PRC 含酚细胞; NPC 无酚细胞; CW 细胞壁; P 酚类染色物质; N 细胞核; Nu 核仁; V 液泡; Cyt 细胞质。下同。

1a, 1b, 1c 葡萄种子细胞整体照片, 细胞主要分为含酚(PRC)及无酚(NPC)2个类型, 在含酚细胞中, 染色物质呈多种状态存在, 先是以稀疏而均匀的状态分布在整个液泡中(细胞A), 然后逐步聚成不同大小的块状(细胞B), 最后完全浓缩为一薄层并紧贴液泡膜内侧分布(细胞C), $\times 1\ 000$;

2 无酚细胞, 示细胞质被许多金颗粒标记, 细胞壁有极少的金颗粒标记, $\times 16\ 000$;

3 无酚细胞, 示细胞核被大量金颗粒标记, 液泡中没发现金颗粒标记, $\times 13\ 000$ 。



图版 I 葡萄种子细胞中 ABA 的定位

- 1 含酚细胞的低倍照片, 示细胞内染色物质均匀而稀疏分布, $\times 3\ 300$;
- 2 图 1 画框部分的放大, 示均匀而稀疏分布的染色物质区域几乎找不到金颗粒标记, 初步凝聚的染色物质区域有极少的金颗粒标记(箭头), $\times 33\ 000$;
- 3 含酚细胞, 示细胞核被大量金颗粒标记, 细胞质被许多金颗粒标记, 液泡中未发现金颗粒标记, $\times 5\ 000$;
- 4 含酚细胞, 示最终凝聚成薄层状的染色物质区域被大量金颗粒标记, 细胞壁被少量金颗粒标记(中间较透明区域为细胞壁, 细胞壁与染色物质区之间为被压缩成薄层的细胞质), $\times 26\ 000$;
- 5 用免疫前兔血清代替 ABA 抗体染色的对照, 几乎没发现金颗粒标记, $\times 16\ 000$;
- 6 材料没经 EDC 固定的对照, 几乎没发现金颗粒标记, $\times 10\ 000$ 。

性且非特异染色很低,本实验中细胞核等部位可被大量金颗粒标记(图版 I-3, 图版 II-3),以及两种对照切片中很难发现金颗粒标记(图版 II-5,-6),可以清楚地说明这个问题。但是与 Spurr 和 Epon 812 相反,Lowicryl K₄M 带来的问题是其降低了细胞膜的负染,其结果使质膜及许多内膜系统消失,许多细胞器和周围细胞质的界限也很难区分^[16]。虽然如此,对于不同的材料,细胞超微结构的保存是有所不同的,例如以蚕豆叶片为材料时,虽同样用 Lowicryl K₄M 包埋,但细胞超微结构的保存还是比较理想的^[10,11]。葡萄果实及其种子细胞不同于其他组织细胞,即使用 Spurr 或 Epon 812 包埋有时也很难得到非常理想的超微结构^[17]。因此,以果实及其种子细胞进行免疫电镜定位时,如何改进超微结构的保存是一个非常重要的问题。研究表明,LR White 结合锇酸固定,可以得到如同 Spurr 或 Epon 812 包埋的超微结构^[13]。锇酸固定虽然对抗原保存是不利的,但在果实及种子细胞定位时,在保证必要的特异金标密度的前提下,能否通过 LR white 包埋改进细胞结构,是今后有待尝试的问题。然而,根据研究的目的和要求不同,如不是刻意追求细胞质超微结构的定位,Lowicryl K₄M 包埋因能非常好地保存抗原及降低非特异染色,用于果实及种子细胞的免疫电镜定位,其结果还是比较理想的。

本研究首次揭示了葡萄种子中 ABA 在细胞超微结构水平上的分布,证实了 ABA 在细胞中并非均匀分布,而是呈区隔化状态存在,细胞的不同部位 ABA 含量大不相同。ABA 主要分布在细胞核及细胞质,特别是细胞核中含有大量 ABA,细胞壁及液泡含有很少的 ABA。由于对 ABA 作用的细胞分子生物学机制了解甚少,所以有关 ABA 在细胞中区隔化分布的具体意义如何还很难推测。如果 ABA 受体位于细胞核,那么细胞核中大量 ABA 的存在将为 ABA 的作用提供一种快速而有效的方式;如果 ABA 受体位于质膜外侧,那么,细胞中 ABA 再分配的调节将为 ABA 作用提供一种非常重要的调控方式。不管涉及哪种机制,ABA 的区隔化分布都具有特殊的意义,因为只有作用位点中的 ABA 积累才可诱导生理效应,否则即使 ABA 在库存区域积累很高水平也不能引起生理效应;另一方面,即使整体器官或组织中的 ABA 含量没有明显变化,细胞或亚细胞水平上的 ABA 再分配也可诱发相应的生理效应。因此,在今后植物激素的研究中,我们不仅要重视器官或组织水平上激素含量变化,而且还要充分重视激素在细胞及亚细胞水平上的分布与再分配情况。本研究用免疫胶体金定位技术揭示出葡萄种子在发育的第 I 期含有大量 ABA。有关种子 ABA 大量存在的生理意义如何,以及 ABA 对种子和果实发育的调控机制如何,是今后仍需努力探讨的课题。

参 考 文 献

- 1 Addicott F T. Abscisic acid. New York: Praeger, 1983
- 2 Davies W J, Jones H G, eds. Abscisic acid: Physiology and biochemistry. Oxford Science Publishers, 1991
- 3 Coombe B G. Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormone changes, and uneven ripening of Concord grapes. J Amer Soc Hort Sci, 1982, 107: 1097~1104
- 4 Coombe B G, Hale C R. The hormone content of ripening grape berry and the effects of growth substance treatments. Plant Physiol, 1973, 51: 629~634
- 5 Nii D L, Morris J R. Research on development and ripening of the grape berry. Am J Enol Vitic, 1992, 43:101~110
- 6 Inaba A, Ishida M, Sobajima Y. Changes in endogenous hormone concentrations during berry develop-

- ment in relation to the ripening of Delaware grapes. J Japan Soc Hort Sci, 1976, 45:245~252
- 7 Loves B R. The intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. Physiol Plant, 1977, 40:6~10
 - 8 Slovik S, Baier M, Hartung W. Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves: 1. Mathematical formulations. Planta, 1992, 187:14~25
 - 9 Daeter W, Hartung W. Stress-dependent redistribution of abscisic acid (ABA) in *Hordeum vulgare* L. leaves: the role of epidermal ABA metabolism, tonoplastic transport and the cuticle. Plant, Cell and Environment, 1995, 18:1367~1376
 - 10 贾文锁, 王学臣, 娄成后. 蚕豆叶肉细胞中脱落酸的胶体金免疫电镜定位. 植物生理学报, 1994, 20(4): 380~384
 - 11 王学臣, 贾文锁. 水分胁迫下蚕豆气孔关闭与叶片细胞中 ABA 区隔化与再分配的关系. 植物生理学报, 1995, 21(4):324~328
 - 12 Nii N, Coombe B G. Structure and development of the berry and pedicel of the grape. Acta Hort., 1983, 139:129~140
 - 13 Hermat E M. Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. Ann Rev Plant Physiol, 1987, 38: 156~178
 - 14 贾文锁, 黄丛林, 张大鹏. 蚕豆叶片细胞中 IAA 的胶体金免疫电镜定位. 植物学报, 1997, 39(7):596~600
 - 15 Sossountzov L, Sotta B, Maldiney R, et al. Immunoelectron-microscopy localization of abscisic acid with colloidal gold on lowicryl-embedded tissues of *Chenopodium polyspermum* L. Planta, 1986, 168:47~481
 - 16 Goodchild D J, Andersson B, Anderson J M. Immunocytochemical localization of polypeptides associated with the oxygen evolving system of photosynthesis. Eur J Cell Biol, 1985, 36:294~298
 - 17 张大鹏, 李珉, 王毅. 葡萄果实发育过程中果肉细胞超微结构的观察. 植物学报, 1997, 39(5):389~396