

青杆花粉细胞中蛋白免疫染色定位实验—以 RAC1 蛋白为例

Subcellular Localization of RAC1 in Pollen Tube of *P. willsonii* by Immunostaining and Confocal Laser Scanning Microscopy

张凌云*

森林培育与保护教育部重点实验室，北京林业大学，北京，中国

*通讯作者: lyzhang@bjfu.edu.cn

引用格式: 张凌云. (2018). 青杆花粉细胞中蛋白免疫染色定位实验—以 RAC1 蛋白为例. *Bio-101* e1010240. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010240.

How to cite: Zhang, L. Y. (2018). Subcellular localization of RAC1 in Pollen Tube of *P. willsonii* by immunostaining and confocal laser scanning microscopy. *Bio-101* e1010240. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010240. (in Chinese)

摘要: 通过获得的目的蛋白抗体，在一定条件下进行抗原抗体结合反应，进行目的蛋白的亚细胞定位实验。本实验一抗为 RAC1 多克隆抗体，二抗为连接荧光素抗体。通过激光共聚焦扫描显微镜观察，进行 RAC1 蛋白在青杆花粉管发育过程中细胞定位。

关键词: 蛋白质，免疫定位，细胞

材料与试剂

注: 以下试剂除特别说明外，均购自Sigma-Aldrich公司。

1. 载玻片
2. 盖玻片
3. 移液枪头
4. 多聚赖氨酸
5. 多聚甲醛
6. Triton X-100
7. Cellulase R-10
8. Macerozyme R-10
9. 甘露醇

10. CaCl_2
11. 蛋白酶抑制剂 (Aprotinin, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin; Calbiochem)
12. 脱脂奶粉或 BSA
13. 10%胎牛血清 (FBS)
14. anti- RAC1 antibody (*Nicotiana tabacum*) was a generous gift from Prof. Alice Cheung (University of Massachusetts, Amherst, MA)
15. 免疫前动物血清
16. NaCl
17. KCl
18. Na_2HPO_4
19. KH_2PO_4
20. 碘化丙锭 (PI)
21. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
22. 固定液 (见溶液配方)
23. 1.5% Cellulase R-10 (见溶液配方)
24. 1.2% Macerozyme R-10 (见溶液配方)

仪器设备

1. 支架
2. 离心机
3. 落射式荧光显微镜
4. LCSM (ZEISS, model: LSM 510 META)

实验步骤

1. 准备工作：用 Poly-Lysine 包被载玻片
 - 1.1 用蒸馏水配制 1 mg/ml 多聚赖氨酸溶液 (400 kD)，应每周新配制一次。
 - 1.2 在干净的载玻片、滴加 1-2 滴多聚赖氨酸溶液作用 10 min。
 - 1.3 蒸馏水冲洗玻片数次，放于支架上，空气干燥，然后室温保存。
2. 染色过程
 - 2.1 黏附

- 1) 取培养不同时期的花粉管悬浮液。
- 2) 400 x g 离心 5 min, 洗涤细胞。
- 3) 重悬细胞于 PBS 中, 重复 1 次。
- 4) 重悬细胞于 PBS 中, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- 5) 滴加到多聚赖氨酸包被的载玻片上, 室温下静置 10 min。

2.2 固定

- 1) 加入 4%多聚甲醛 (现用现配), 室温孵育 2 h。
- 2) 吸去多聚甲醛, PBS 充分洗涤 2 x 5 min。

2.3 透化

- 1) 加入含酶混合液反应 10 min, 酶混合液包括用 15 mM MES 配制的 1.5% 的纤维素酶 (cellulase R-10) 和 1.2% 离析酶 (macerozyme R-10), pH 5.5, 400 mM 甘露醇, 5 mM CaCl_2 , and 1 mg ml⁻¹ 蛋白酶抑制剂 (Aprotinin, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin; Calbiochem)。
- 2) PBS 洗涤 4 x 5 min。

2.4 封闭

用 PBS 配制的 3% (W/V) 脱脂奶粉或 BSA [或 10%胎牛血清 (FBS)] 室温下封闭 1 h。

2.5 一抗孵育

- 1) 用 anti-RAC1 antibody (1:40 dilution) 在 30 °C 下孵育 1-2 h (一抗用含 1% (W/V) 脱脂奶粉的 PBS 配制)。
- 2) 用 PBST 清洗 3 x 10 min (PBST: PBS + 0.05 或 0.2% (V/V) Triton X-100) 吸净液体, 但不可干燥。

注: 加入足够量的一抗使其覆盖细胞, 但不要溢出载玻片边缘, 通常加入 10 μl -25 μl 。通常要湿孵。

2.6 二抗孵育

- 1) 加入 FITC 标记的二抗, 30 °C 下孵育 1 h (二抗用 PBS + 1%脱脂奶粉以 1:100 稀释)。
- 2) 用 PBST 清洗 3 x 10 min (PBST: PBS + 0.05 或 0.2% (V/V) Triton X-100) 同上吸干。

2.7 封片

滴加 50 μ l 封固液于载玻片上，加盖玻片，注意赶出气泡。空气干燥 30 min。

2.8 用 DAPI 复染

- 1) 如需要用 DAPI 对核进行染色，需向二抗中加 0.01 mg 4',6-diamindino-2-phenylindole (DAPI) 溶液数微升孵育 10 min，即可使核酸特异性染色。
- 2) 观察 Confocal 显微镜观察，激发波长参考表 1。

注：1 μ g/ml 碘化丙锭 (PI) 适用于激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM)。

表 1. 荧光染料激发光及发射光波长参考

荧光染料	激发光波长 (nm)	发射光波长 (nm)	颜色
DAPI	358	461	蓝
FITC	495	525	绿

注意事项

1. 以免疫前动物血清代替一抗。
2. 省去一抗，以检测二抗的背景。
3. 封闭液也可用 3%BSA 或 10%胎牛血清 (FBS)。

溶液配制

1. PBS 缓冲液

10 mM 磷酸缓冲液，pH 7.4

138 mM NaCl

2.7 mM KCl

将 8.0 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄，溶解于 800 ml 蒸馏水中，调整 pH 至 7.4，补充液体至 1 L，可配成 10x 储存液 (参考抗体技术指南)

2. 固定液

4%多聚甲醛，用 PBS 配制 (参考抗体技术指南)

3. 封片液

0.35 g Gelvatol 加至 3 ml 蒸馏水和 1.5 ml 甘油中，沸水加热溶解，加 DABCO 至 2.5%，4 °C 可保存数月。

4. 15 mM MES 配制

计算 MES 用量至终浓度 150 mM，用 Tris 碱溶液调节 pH 至 5.5；加水定量便可

5. 1.5% Cellulase R-10

用 15 mM MES 配制

6. 1.2% Macerozyme R-10

用 15 mM MES 配制

参考文献

1. 抗体技术指南
2. Zhang, L. Y., Hao, H. Q. and Lin, J. X. (2007). [The localization of Rac GTPase in Picea willsonii pollen tubes implies roles in tube growth and the movement of the tube nucleus and sperm cells.](#) *PLANT SCI* 172(6):1210-1217.