

苹果果肉细胞胶体金免疫电镜观察样品的制备

Sample Preparation of Apple Fruit for Observation of Protein Subcellular Localization by Immunogold Labeling and Electron 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). 苹果果肉细胞胶体金免疫电镜观察样品的制备. *Bio-101* e1010242. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010242.

How to cite: Zhang, L. Y. (2018). Sample Preparation of Apple Fruit for Observation of Protein Subcellular Localization by Immunogold Labeling and Electron Microscopy. *Bio-101* e1010242. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010242. (in Chinese)

摘要: 通过超薄切片，获得细胞水平的结构；同时通过免疫染色，观察目的蛋白在细胞内的定位及变化情况。

关键词: 胶体金，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. 苹果
2. 多聚甲醛
3. 戊二醛
4. PBS (磷酸缓冲液, pH 7.2)
5. 乙醇
6. Lowicryl K4M
7. Formvar 膜
8. 金标羊抗兔抗体 (Amersham Pharmacia Biotech)
9. 柠檬酸铅
10. 兔血清

11. Na_2HPO_4
12. KH_2PO_4
13. KCl
14. NaCl
15. 明胶
16. BSA
17. Tween 20
18. 2% (w/v) 醋酸双氧铀 (蒸馏水配制)
19. 前固定液 (见溶液配方)
20. 含 50 mM 甘氨酸缓冲液 (见溶液配方)
21. PBGT 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镍网
2. 抽气泵
3. 紫外灯
4. LKB-8800 型切片机
5. 透射电镜

实验步骤

1. 样品包埋
 - 1.1 固定: 将苹果果肉切分成 $2\text{-}3\text{ mm}^3$ 的小块, 迅速投入已预冷的前固定液 (见溶液配方 1) 中, 抽气直到组织块完全浸入固定液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下固定 4 h。
 - 1.2 冲洗: 用 0.1 M PBS (磷酸缓冲液, pH 7.2; 280 ml 1 mol/L 磷酸二氢钠, 720 ml 1 mol/L 磷酸氢二钠) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 洗三次, 每次 30 min。
 - 1.3 乙醇系列脱水

30%乙醇 (20min)→50%乙醇 (20min)→70%乙醇 (过夜)→80%乙醇 (20min)
→90%乙醇 (60min)→100%乙醇 (60min)→100%乙醇 (60min)

1.4 乙醇-Lowicryl K4M 置换

无水乙醇:K4M 2:1 1 h

无水乙醇:K4M 1:1 1 h

无水乙醇:K4M 1:2 1 h

纯 K4M 1 h (此为逐步过渡到 K4M 中, 1 h 后更换 K4M, 然后浸透过夜)

1.5 浸透: 换入新的纯 K4M 浸透过夜 (以上步骤均在 4 °C 下进行)。

1.6 包埋: 紫外灯下 (-20 °C) 聚合 48 h 以上, 室温继续聚合 3 天以上, 直到手感可触硬化。

1.7 切片: 用 LKB-8800 型切片机制备超薄切片, 切片捞在 100 目以 0.3% Formvar 膜覆盖的镍网上。

2. 免疫染色

2.1. 切好的超薄切片先用含 50 mM 甘氨酸缓冲液 (见溶液配方 2) 室温下处理 30 min 以封闭自由醛基, 然后在 PBGT 溶液 (见溶液配方 3) 中继续封闭 30 min 以封闭非特异性位点。

2.2. 切片不经清洗, 直接在使用 PBGT 缓冲液稀释 100 倍的一抗中于 4 °C 下温育过夜 (或室温下 1-2 h)。

2.3. 经 PBGT 充分洗涤 3 次, 每次 5 min。

2.4. 清洗完毕后, 转入用 PBGT 稀释的金标羊抗兔抗体 (交联 10 nm 金颗粒, 1:50 比例稀释), 室温下温育 1-2 h。

2.5. 经 PBGT 冲洗三遍, 后经双蒸水充分洗涤三遍。每次 5 min。

2.6. 2% (w/v) 醋酸双氧铀室温染色 18 min, 之后用双蒸水冲洗 3 次。

2.7. 柠檬酸铅继续染色 10 min, 用双蒸水充分洗涤 (6 x 5 min)。

2.8. 用透射电镜进行细胞超微结构及金颗粒定位观察。

注: 为了检验免疫定位结果的特异性和可靠性, 需分别设置 2 种不同的对照:

a. 以免疫前兔血清代替蛋白抗体以验证一抗的特异性;

b. 免去蛋白抗体以检测二抗的非特异性标记, 其余步骤同上。

溶液配方

注：本实验方案中所需的溶液除特殊说明外，均用蒸馏水配制。

1. 前固定液
 - 4% (w/v) 多聚甲醛
 - 2.5% (v/v) 戊二醛
 - 0.1 M PBS, pH 7.2 配制
2. 50 mM 甘氨酸缓冲液, pH 7.4
 - Na₂HPO₄ 8 mM
 - KH₂PO₄ 1.5 mM
 - KCl 3 mM
 - NaCl 500 mM
3. PBGT 缓冲液
 - PBS 缓冲液
 - 0.1% (w/v) 明胶
 - 0.5% (w/v) BSA
 - 0.1% (v/v) Tween 20

致谢

本篇实验方案改编自先前发表的文章 Zhang *et al.* (2004)。

参考文献

1. Zhang, L. Y., Peng, Y. B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y. F., Lu, Y. M., Gao, X. P., Shen, Y. Y., Delrot, S. and Zhang, D. P. (2004). [Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit](#). *Plant Physiol* 135(1): 574-586.