

福建农业大学学报 30(2): 257- 261, 2001
Journal of Fujian Agricultural University

文章编号: 1006-7817-(2001)02-0257-05

荧光抗体在热带作物小粒种咖啡的 C₃/C₄ 属性鉴别中的应用

张江洪¹, 杨汉金², 林梅馨², 潘廷国³

(1 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012; 2 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 用从烟草提纯的 1, 5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 羧化酶制备免抗 RuBP 羧化酶抗体, 并以异硫氰酸盐荧光素 (FITC) 标记抗体 采用直接免疫荧光法对典型 C₃ 植物水稻、C₄ 植物甘蔗和小粒种咖啡等进行了 RuBP 羧化酶的组织化学定位 结果表明: C₃ 和 C₄ 植物叶切片中 RuBP 羧化酶的分布明显不同, C₃ 植物的特异荧光位于叶肉细胞, C₄ 植物的特异荧光绝大部分位于维管束鞘细胞; 小粒种咖啡的特异荧光仅分布在叶肉细胞 因此认为, 小粒种咖啡应属 C₃ 植物

关键词: C₃ 植物; C₄ 植物; 小粒种咖啡; 叶肉细胞; 维管束鞘细胞; RuBP 羧化酶; 免疫荧光法

中图分类号: Q 945.11 **文献标识码:** A

Application of immunofluorescence to C₃/C₄ attribute identification of a tropical crop, *Coffea arabica*

ZHANG Jiang-hong¹, YANG Han-jin², LIN Mei-xin², PAN Ting-guo³

(1 Xiamen Exit-Entry Inspection & Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361012, China; 2 Life Science College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract Rabbit antiserum raised purified ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) from tobacco was used to locate RuBPCase in leaf blade transection of classical C₃, C₄ plants and *Coffea arabica* by direct immunofluorescence method. The antibody was labelled by fluorescein isothiocyanate (FITC). It was discovered that in classical C₄ plant (sugarcane), the specific fluorescence was located almost exclusively in bundle sheath cell chloroplasts, while in C₃ plant (rice), the specific fluorescence was in mesophyllous cell chloroplasts, which proved the difference in RuBPCase location between classical C₄ and C₃ plants. The specific fluorescence of *C. arabica* was located only in mesophyllous cell chloroplasts, so it was concluded that *C. arabica* belongs to C₃ plant.

Key words: C₃ plant; C₄ plant; *Coffea arabica*; bundle sheath cell; leaf mesophyllous cell; ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase; immunofluorescence method

1, 5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 羧化酶主要存在于叶绿体的间质中, 呈可溶状态 其由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成^[1]; 可被抗酶血清抑制也可被抗大亚单位血清抑制, 但不被抗小亚单位血清抑制^[2]. 不同种植物抗大亚单位血清无特异性, 而抗小亚单位血清具有特异性 多年来, 人们分别对该酶的分离纯化、稳定性、动力学特性、结构功能和遗传信息定位等方面进行了一系列深入的研究^[3, 4], 由于影响 RuBP 羧化酶的因素很多, 分离纯化的离体测定活力研究尚无法取得一致的结果 RuBP 羧化酶离体后活力降低, 原因可能是其诱导失活^[5], 因而对该酶活力

收稿日期: 2000- 12- 21

作者简介: 张江洪 (1966-), 男, 农艺师, 硕士 研究方向: 植物生理生化

测定结果的解释须格外谨慎 Hattersley et al^[6]最早用间接免疫荧光法,对 C₃ 和 C₄ 植物叶片的徒手切片中 RuBP 羧化酶的分布进行了比较研究 王美琪等^[7]采用比间接免疫荧光法更具特异性的直接免疫荧光法,先后对木瓜、大米草等植物的叶切片进行了相应的研究 由于对热带作物基础研究较少,迄今尚未有小粒种咖啡的碳素同化途径的报道 本试验采用免疫荧光方法,通过对小粒种咖啡叶切片的 RuBP 羧化酶的组织化学定位,以探明小粒种咖啡的碳素同化途径,以及在个体发育过程中的一些光合特性的变化

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试小粒种咖啡(*Coffea arabica*)采自厦 门大学生物馆前面的苗圃,以典型的 C₃ 植物水稻和 C₄ 植物甘蔗作分析比较

试验主要试剂及仪器有异硫氰酸盐荧光素(FITC)(瑞典 Fluka 产品),Sephadex G-25(Pharmacia 产品),Sephadex G-50(Pharmacia 产品),Sephadex G-200(Pharmacia 产品),DEAE 纤维素(DE-52)(Whatman 产品),卡介苗(厦 门卫生防疫站提供),Kodacolor Gold 400(27D N)彩胶(澳大利亚 Melbourne 产品),紫外分光光度计(UV-240 型,日本岛津产品),Olympus 荧光显微镜(BH2-RFL5 型)。

1.2 小粒种咖啡叶片 RuBP 羧化酶的提取、纯化

参照张志良等^[8]改进过的方法 透明液依次经 SephadexG-50 柱、SephadexG-200 柱、DEAE-纤维素柱(DE-52),以磷酸缓冲液洗脱,合并酶活部分的洗脱液

1.3 RuBP 羧化酶抗体的制备、纯化

用于 RuBP 羧化酶兔抗血清制备的抗原——从烟草中提取的 RuBP 羧化酶,经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,呈现一条纯化的谱带

1.3.1 免疫方法 按照单价免疫球蛋白常量免疫方法(多点注射)^[9]进行 分别取 RuBP 羧化酶抗原 10、20、25 mg 溶于 1 mL 50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.4)中,加入等体积的 Freund 完全佐剂 第一次注射至兔子的四脚掌皮下;10 d 后第 2 次注射至肩胛骨中间;又隔一周第 3 次注射至髌骨部位下;10 d 后再注射水剂抗原(RuBP 羧化酶 10 mg)一针,一周后取兔耳静脉血测定血清的抗体效价 另取一只不进行免疫的灰色雄兔为对照

1.3.2 抗体鉴定 按免疫电泳法^[8]进行抗体鉴定 抗原稀释 1 024 倍,抗体对质量浓度为 60 μg·mL⁻¹的 RuBP 羧化酶仍能产生一条蓝色沉淀线^[10] 经类似测试从烟草提取的 RuBP 羧化酶兔抗血清与小粒种咖啡提取的 RuBP 羧化酶之间存在明显的交叉反应 因而,这一抗体的荧光标记物可用来检测咖啡叶片内该酶的分布

1.3.3 抗体纯化 当对免疫兔的耳静脉血的效价测定较高时,让免疫兔断食 1 d 后,即从其颈动脉采出全部血液,待收集的 血于室温下完全凝固后放入冰箱过夜 次日倾出血清,于 20 000 × g 离心 20 min,弃残留的红血球 在透明的抗血清中加入等体积的 PBS(内含 8.5 g·L⁻¹ NaCl 的 10 mmol·L⁻¹磷酸缓冲溶液,pH 7.6),于 20 000 × g 离心 20 min,弃沉淀,上清液中加入(NH₄)₂SO₄ 达 0.5 饱和度 在冰箱静置 2 h 后,于 20 000 × g 离心 20 min,弃上清液 沉淀溶于适量 PBS 中,再加入(NH₄)₂SO₄ 达 0.5 饱和度 重复操作,弃上清液,沉淀溶于少量 10 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.6)中

1.4 抗体的荧光素标记

采用 Y. T. Tchan 改进的直接法, 用 FITC 直接标记纯化的 RuBP 羧化酶抗体, 反应液 pH 维持在 9.0-9.5^[11]。标记完毕的抗体蛋白液经 Sephadex G-25 柱分装若干小管, 待 F/P 比值测定用

1.5 标记抗体的鉴定

以 PBS 为空白对照, 精确配制各梯度质量浓度的 FITC 标准液, 用 72 型分光光度计测得其 $D(490\text{ nm})$ 值, 绘制标准曲线, 然后根据所测得的荧光标记抗体液的 $D(490\text{ nm})$ 值, 从曲线中反查 FITC 质量浓度, 以紫外分光光度计测定总蛋白质质量浓度, 若经 Sephadex G-25 柱的 2、3、4 管标记抗体液的 F/P 值符合文献[12]的要求, 为精制的荧光抗体液

1.6 标记抗体染色组织切片

供试叶片置于 0℃ 下预冷 20-30 min 后, 徒手切片, 迅速将叶切片置于载玻片上, 用体积分数为 75% 乙醇固定 10-15 min, 使抗原固定在原位, 冷风吹干后, 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 反复冲洗 15 min 后, 用冷风吹干, 滴 2-3 滴精制好的荧光抗体液于载玻片中的组织切片上, 于 37℃、自然光、保湿状态下结合反应 60 min, 以 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 反复冲洗 15 min 后, 封片。设置的对照有: (1) 正常血清; (2) $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4); (3) 先加未标记的抗体液反应 60 min 后, 加标记抗体液。3 种对照结合反应均为 1 h, 用 PBS 冲洗, 封片。

1.7 荧光显微观察、拍照

染色好的组织切片应立即进行荧光显微观察。超高压汞灯为激发光源, 用 510 nm 滤光片将叶绿素的红色自发荧光滤去。由于特异荧光在兰紫色激发光下淬灭很快, 需选用 27D N 的高速彩胶, 荧光显微拍照的曝光时间宜控制在 20 s 以内。组织切片中特异荧光呈黄绿色, 去除叶绿素的红色自发荧光, 还剩细胞壁的自发荧光。

2 结果与分析

2.1 典型 C_3 和 C_4 植物的 RuBP 羧化酶免疫荧光定位

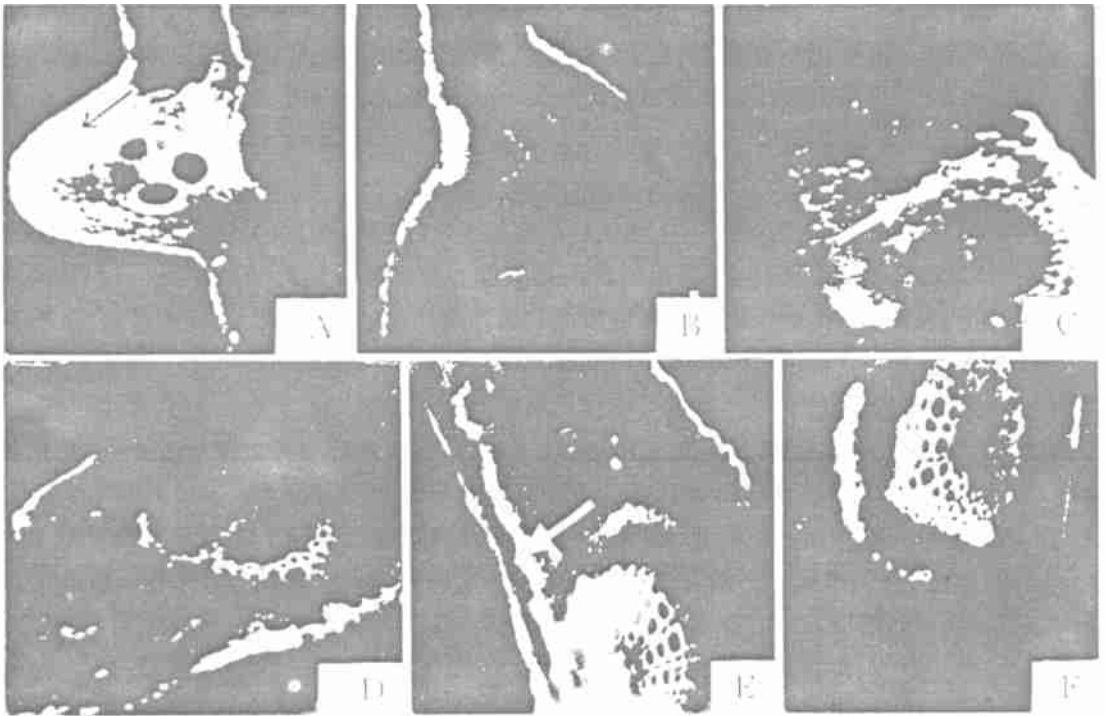
用 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色典型 C_3 植物水稻和 C_4 植物甘蔗的叶切片。结果表明: 水稻叶切片叶肉细胞特异荧光较强 (图 1A), 表明该酶广泛分布于叶肉细胞的叶绿体内, 而在其正常血清对照试验中则看不到特异反应 (图 1B); 在甘蔗叶切片中, 其特异荧光聚集在维管束鞘细胞内, 环绕维管束呈花环状 (图 1C), 表明 RuBP 羧化酶分布于维管束鞘细胞的叶绿体内, 而在正常血清对照组织中没有特异荧光, 只有细胞壁的自发荧光 (图 1D)。上述两种植物中特异荧光分布的不同显示了它们 RuBP 羧化酶分布的不同。

2.2 小粒种咖啡的免疫荧光定位

小粒种咖啡叶切片经 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色后, 仅在叶肉细胞有特异反应, 维管束鞘细胞则没有特异反应 (图 1E); 而在正常血清对照组中没有特异荧光, 只有细胞壁的自发荧光 (图 1F), 呈典型的 C_3 植物反应。小粒种咖啡的碳素同化途径尚未见报道。

2.3 不同光照条件下的 RuBP 羧化酶免疫荧光反应

由于荧光抗体技术在植物研究方面的应用才刚刚起步, 目前尚未有用这一技术研究 RuBP 羧化酶对光反应的报道。本试验在其他反应条件均相同的情况下, 比较不同光照下 RuBP 羧化酶免疫荧光特异反应。结果表明, 在自然光条件下, 叶切片中的 RuBP 羧化酶和荧



A. 水稻叶切片经用 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色, 示特异荧光仅与叶肉细胞(箭头所示)的叶绿体结合; B. 水稻叶切片的正常血清对照, 示只有自发荧光而无特异荧光; C. 甘蔗叶切片经用 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色, 示特异荧光仅与维管束鞘细胞(箭头所示)的叶绿体结合; D. 甘蔗叶切片的正常血清对照, 示只有自发荧光而无特异荧光; E. 小粒种咖啡叶切片经用 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色, 示特异荧光与叶肉细胞(箭头所示)的叶绿体结合; F. 小粒种咖啡叶切片的正常血清对照, 示只有自发荧光而无特异荧光

图 1 水稻、甘蔗和小粒种咖啡叶切片的荧光显微比较 (× 368)

Fig. 1 Comparison of fluorescent microscopy in leaf blade transections of rice, sugarcane and *Coffea arabica* (× 368)

光抗体结合呈特异反应明显要比在避光条件下强烈得多, 这也从免疫组织化学上得到进一步证实: RuBP 羧化酶是一种光激活的酶 同时也与现有的分子免疫学理论相符的, 即抗原和抗体的结合反应中, 作为抗原的酶蛋白不仅要依赖于一级结构, 同时也依赖于其四级结构 荧光抗体技术显示的是被活化的 RuBP 羧化酶

3 讨论

C₃ 和 C₄ 植物的解剖学和生理学特性明显不同: C₃ 植物维管束鞘细胞几乎无叶绿体, RuBP 羧化酶严格地位于叶肉细胞; 而 C₄ 植物维管束鞘细胞叶绿体有序排列, 具有花环状解剖结构, RuBP 羧化酶严格地位于维管束鞘细胞 C₃-C₄ 中间型植物维管束鞘细胞有叶绿体, RuBP 羧化酶不像 C₄ 植物那样严格地位于维管束鞘细胞, 在叶肉细胞和维管束鞘细胞都有 现有资料表明: C₄ 植物光合途径是对短暂雨季和长期高温干旱的热带气候的适应, 由 C₃ 植物进化而来. 本试验对小粒种咖啡叶切片的荧光显微观察结果表明, 其维管束鞘细胞不具有花环状解剖结构; RuBP 羧化酶的免疫荧光定位与 Bauw e^[13]对黄菊属中的 C₃ 植物种的试验结果一致, 与 Chollet et al^[14]对 *Flaveria cronquistii* 种的免疫荧光反应相吻合. 上述结果表明, RuBP 羧化酶在不同碳素同化途径植物的叶肉、维管束鞘细胞的严格分布特点, 可以作为鉴定 C₃ 或 C₄ 植物的一个极为重要的生理生化指标

荧光抗体技术以其高度的特异性、定位性、敏感性和快速性等特点, 已成为现代生命科学研究的强有力手段之一。该技术是组织化学和免疫学的结合, 在医学、微生物学等早就有广泛的应用, 只是近 20 年来才被应用于高等植物叶片内酶的定位^[6,7]。这一技术与普通染色法、电子显微术、放射自显影术等结合, 其应用越来越广泛。它不仅可以进行组织定位, 还可以进行细胞乃至亚细胞水平定位的研究, 这是一般血清学方法及同位素示踪法所不及的。由于其免疫反应的试验结果又具有形态学特征, 这就显著提高了结果判断的可靠性。

致谢: RuBP 羧化酶兔抗血清制备的烟草 RuBP 羧化酶抗原由中国科学院植物生理研究所李立人研究员惠赠, 谨此致谢。

参考文献:

- [1] BAKER T S. RuBPCase: a two-layered square-shaped molecular of symmetry [J]. **Science**, 1977, 191: 429.
- [2] 李立人. RuBP 羧化酶及其亚基的免疫化学特异性[J]. **植物生理学报**, 1986, 12(4): 362- 369.
- [3] 李立人. 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶的结构、功能及组装[A]. 余叔文, 汤章城. **植物生理与分子生物学**[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 223- 226.
- [4] GRAY J C. The synthesis of the small subunit of RuBPCase in the French bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. **Eur J Biochem**, 1974, 44: 491- 500.
- [5] LORMER G H. RuBisCO: improved methods for the activation and assay of catalytic activities [J]. **Annu Biochem**, 1977, 78: 66- 75.
- [6] HATTERSLEY P W, WATSON L, OSMOND C B, et al. In situ immunofluorescent labelling of RuBPCase in leaves of C_3 and C_4 plants [J]. **Aust J Plant Physiol**, 1977, 4: 523- 539.
- [7] 王美琪, 韩琪. 热带作物木瓜 C_3/C_4 属性的鉴别[J]. **植物生理学报**, 1984, 10(2): 103- 104.
- [8] 张志良, 吴光耀. **植物生物化学技术和方法**[M]. 北京: 农业出版社, 1985. 1- 17, 77- 82.
- [9] 王世中. **免疫化学技术**[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 43- 163.
- [10] 张江洪. 巴西橡胶等作物叶片内 RuBP 羧化酶的免疫荧光定位研究[D]. 厦门: 厦门大学图书馆, 1991.
- [11] 中山大学生物系生化微生物室. **生物化学导论**[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978. 251- 267.
- [12] 解放军 59175 部队. **荧光显微术**[M]. 上海: 上海科技情报出版社, 1975. 5- 182.
- [13] BAUWE H. Photosynthetic enzyme activities and immunofluorescence studies on the localization of RuBPCase in leaves of C_3 , C_4 and C_3 - C_4 intermediate species of *Flaveria* [J]. **Biochem Physiol Pflanzen**, 1984, 179: 253- 268.
- [14] CHOLLET R, BAUWE H. Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from C_3 , C_4 and C_3 - C_4 intermediate species of *Flaveria* [J]. **Plant Physiol**, 1986, 82: 695- 699.