

技术与方法 Techniques and Methods

不同的固定方法对激光显微切割分离油松胚珠雌配子体的影响

王英旗, 姚阳, 陈彬丽, 张淑静, 李芳, 郑彩霞*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 为了精确分离油松胚珠雌配子体, 获得单一类型的细胞, 进一步研究油松胚珠发育分子调控的时空特异性, 本文利用激光显微切割技术(LCM)对2年生油松胚珠雌配子体进行了微切割; 比较了冷丙酮(4 °C)、卡诺固定液、FAA固定液固定及冻藏处理4种不同方法对冰冻切片的影响。结果表明, 冻藏处理结合冰冻切片可以保证雌配子体的完整性, 采用该方法获得了不同时期油松胚珠雌配子体, 为后续油松胚珠雌配子体发育相关分子机制的研究提供了实验材料。

关键词: 油松胚珠; 雌配子体分离; 冰冻切片; 激光显微切割

Effects of Different Fixing Methods on Isolation of Ovules in Female Gametophyte of *Pinus Tabulaeformis* Carr. by Laser Capture Microdissection

WANG Ying-Qi, YAO Yang, CHEN Bin-Li, ZHANG Shu-Jing, LI Fang, ZHENG Cai-Xia*

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: In order to separate the ovules in female gametophyte accurately, acquire single cell type and further study the molecular mechanisms of the ovules in female gametophyte during development, laser capture microdissection (LCM) was used to isolate the ovules in female gametophyte of 2-year old *Pinus tabulaeformis*. And the effects of four methods, including cold acetone fixation (4 °C), Carnoy's fixation, FAA fixation and frozen storage, on frozen sections were compared. The results showed that frozen storage combined with frozen sections could ensure the intact morphology of female gametophyte, and obtain the female gametophytes from different developing stages. The method could provide experimental materials for investigating the molecular mechanisms of the development of ovules in female gametophyte of *Pinus tabulaeformis*.

Key words: ovule of *Pinus tabulaeformis*; female gametophyte separation; frozen section; laser capture microdissection

油松是我国北方主要的绿化造林树种, 生产中需要大量优质的种子。研究油松胚珠发育的分子调控机制对于提高种子质量及实现人工制种有重要意义。我们课题组在前期研究中发现, 油松28号无性系胚珠是败育的, 原因是其雌配子体游离核有丝分裂中途停止(贺窑青和郑彩霞2007)。我们之前的工作还证明, 此无性系存在特异的DNA片段和蛋白质(李敏俐和郑彩霞2002; 丁坤善等2004), 其败育可能与遗传因素及环境因素有关(李凤兰和郑彩霞1990; 杨远媛等2008)。为进一步研究游离核有丝分裂中途停止的分子调控机制, 需要将雌配子体从胚珠中分离。但是雌配子体体积小且水分含量高、易破碎, 一般很难将其与周围2倍体组织精确分离, 无法获得单一的雌配子体, 最终限制了人们对胚珠发育分子调控机制时空特

异性的研究。因而, 建立精确分离完整油松雌配子体的技术是十分必要的。

激光显微切割(laser capture microdissection, LCM)是利用二极管固体脉冲激光分离目标区域, 通过重力作用收集样品, 以达到快速、准确地从组织切片中分离并获得单一类型细胞群或单个细胞的技术。该技术具有无接触、无污染、操作性强等优点, 成功地解决了目标细胞异质性的问题(陆叶等2007), 尤其在所研究的目标细胞与样品细胞难以分离, 以及目标细胞分布分散、无规则时,

收稿 2013-01-04 修定 2013-01-30

资助 国家自然科学基金(31170563)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20110014110014)。

* 通讯作者(E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62337717)。

激光显微切割具有更显著的优势。LCM技术已较广泛地应用在动物学及医学领域,但在植物学研究领域的应用历史不长,Asano等(2002)首次在水稻的研究中应用了该技术,目前运用LCM技术已经成功分离了拟南芥胚(Casson等2005),水稻韧皮部、花粉和绒毡层细胞(Suwabe等2008; Asano等2002),玉米胚芽鞘表皮和维管组织(Ohtsu等2007; Nakazono等2003),番茄根部巨细胞(Ramsay等2004),烟草花药细胞(Sanders等2005),棉花胚珠纤维原始细胞和表皮细胞(Wu等2006),草莓果实皮质细胞(Raab等2006),葡萄风信子花被、花药和心皮(Nakada等2006),挪威云杉石细胞(Li等2007)等,显示了该技术在植物细胞及组织分离中广阔的应用前景。

本文采用冷丙酮(4 °C)、卡诺固定液、FAA固定液固定和冻藏组织4种方法处理样品进行冰冻切片,并与激光显微切割技术结合,通过分析比较,筛选并建立了从油松胚珠中分离获得单一且完整性好的雌配子体的技术方法,为进一步研究油松胚珠发育的分子调控时空特异性奠定实验基础。

材料与方 法

1 材料

自北京林业大学校园采集雌配子体游离核分裂前期和后期的油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)球果,迅速剥离胚珠并固定。游离核分裂前期,雌配子体中央大液泡形态明显,数十个游离核围绕在其周围,之后游离核持续分裂为数千个,胚珠增大,进入游离核分裂后期。

2 不同的固定方法

(1)冷丙酮(4 °C)固定:将剥离的油松胚珠迅速投入冷丙酮固定液中,于4 °C抽真空30 min,避光固定12 h。(2)卡诺固定液(100%酒精:冰醋酸=3:1)固定:将剥离的油松胚珠迅速投入卡诺固定液中,室温抽真空30 min后固定1 h,95%酒精冲洗3次,转入70%酒精中保存。(3)FAA固定液(50%酒精:冰醋酸:福尔马林=89:6:5)固定:将剥离的油松胚珠迅速投入FAA固定液中,室温抽真空30 min后固定24 h。(4)冻藏处理:将油松胚珠用锡箔纸包裹,液氮处理30 min后放入-80 °C冰箱保存。

3 石蜡切片

材料于FAA固定液中固定48 h;依次于50%、

70%、85%、95%和100%酒精中梯度脱水,各2 h;然后于1/2二甲苯+1/2 100%酒精、纯二甲苯中透明,各2 h;之后放于1/2二甲苯+1/2石蜡中,38 °C温箱过夜。浸蜡3遍,每次4 h,石蜡包埋。调节切片厚度为10 μm,切片。二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,番红-固绿染色,树胶封片。

4 冰冻切片

采用Leica CM 1950冰冻切片机。切片前喷洒75%酒精和外源RNA酶清除剂对空气和机箱进行消毒。钢刀、镊子和毛刷等切片用具用0.1%焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水浸泡处理24 h以上,然后高温高压灭菌待用。设置机箱温度(CT)为-22 °C,样品头温度(OT)为-20 °C,刀座角度为8°。在-20 °C环境下将油松胚珠用JUNG包埋剂包埋并固定于样品托上,放置冷冻台上冷冻30 min。选择切片厚度为30 μm修平样品后进行切片,切片厚度为10 μm,将切片转移至附着聚乙烯萘膜(PEN)的RNase-free载玻片上粘片。

5 雌配子体的激光显微切割

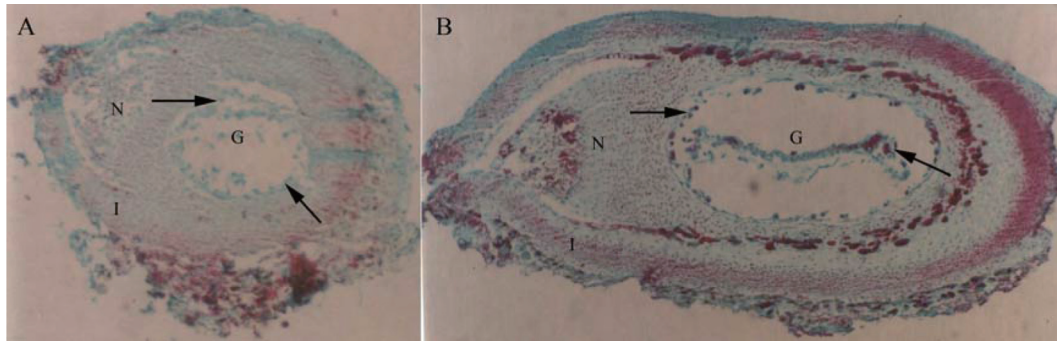
采用Leica LMD 6000激光显微切割系统。切割前喷洒75%酒精和外源RNA酶清除剂对空气和仪器进行消毒,保证所在环境无RNase污染。环境温度4 °C,脉冲激光参数分别为Power, 125; Speed, 6; Specimen Balance, 0; Line Spacing for Draw+Scan, 10。将粘贴样品的载玻片和收集管分别安装在载物台和收集器上,10倍物镜下找到雌配子体组织并调焦至清晰。标注目标切割区域,在“Draw+cut”模式下切割并收集样品。

实验结果

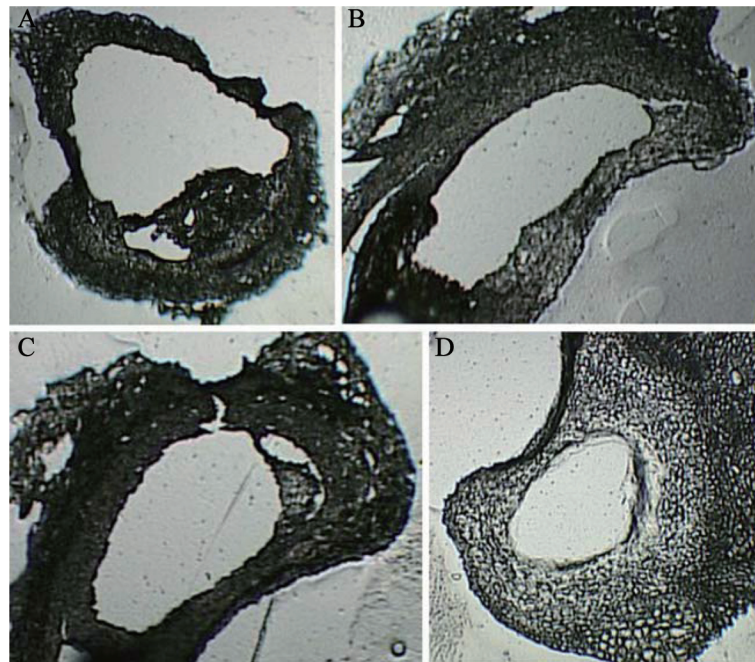
1 不同切片和固定方法的比较

参照油松胚珠石蜡切片的观察结果确定胚珠冰冻切片中雌配子体的位置,游离核开始分裂前期的胚珠(图1-A),雌配子体中几十个游离核围绕在中央大液泡周围,之后胚珠增大,液泡逐渐皱缩至消失,游离核分裂为数千个,呈线性排列于细胞质中,此时,胚珠进入雌配子体游离核分裂的后期(图1-B)。

冰冻切片虽然在组织显微观察上不如石蜡切片清晰,但雌配子体的轮廓清晰可见(图2和图3)。4种固定方法对油松雌配子体结构的固定效果不

图1 游离核分裂期油松胚珠石蜡切片($\times 200$)Fig.1 Paraffin sections of *P. tabulaeformis* ovules at free nuclear stage

A: 游离核分裂前期油松胚珠; B: 游离核分裂后期油松胚珠; N表示珠心组织; I表示珠被组织; G表示雌配子体; 箭头所指为游离核。

图2 游离核分裂前期油松胚珠冰冻切片($\times 200$)Fig.2 Frozen sections of *P. tabulaeformis* ovules at early free nuclear stage

A: 冷丙酮固定, 胚珠细胞与雌配子体受损严重; B: 卡诺固定液固定, 胚珠与雌配子体受损变形; C: FAA固定液固定, 雌配子体与胚珠细胞有变形; D: 冻藏处理, 胚珠细胞与雌配子体较为完整。

同, 清晰度和皱缩程度存在差异(图2)。冷丙酮固定后雌配子体皱缩明显, 结构不清晰, 产生了较严重的组织破裂, 难以应用于雌配子体的分离(图2-A)。卡诺固定液中含有酒精成分, 酒精可以使细胞脱水, 导致细胞轻微皱缩, 雌配子体组织受损变形(图2-B)。FAA固定液固定后雌配子体与周围组织有变形, 细胞产生轻微皱缩和破裂(图2-C), 且FAA中含有福尔马林(38%甲醛), 甲醛可以导致不

同程度的DNA、RNA断裂, DNA-DNA交联及DNA-蛋白质交联, 并且醛类固定剂对核酸和蛋白质的复性作用不如沉淀类固定剂, 如乙醇和丙酮等(Ahram等2003)。因此, FAA固定的材料不适用于高质量RNA、DNA和蛋白质的提取。考虑到减少实验时间, 保证雌配子体完整性, 避免DNA、RNA和蛋白质的断裂、降解等因素, 本实验直接使用冻藏材料进行冰冻切片, 雌配子体结构较完

整, 中央液泡形态正常, 无明显的细胞皱缩及胀大(图2-D), 可以很好地应用于激光显微切割。

2 雌配子体的收集

胚珠中雌配子体的分离过程如图3所示。移动目标区域至视野中, 在显微镜下调节雌配子体区域清晰(图3-A和B), 沿雌配子体外缘绘制切割轨迹(图3-C和D), 激光切割, 雌配子体借助重力落入PCR管盖中, 分别收集雌配子体(图3-G和H)与胚珠残余部分(图3-E和F), 冻藏备用。

讨 论

1 切片方法的选择

油松胚珠石蜡切片中雌配子体结构清晰、完整, 游离核着色明显, 在组织细胞观察性研究中具有较大的实用价值(图1), 但是实验周期长, 步骤较多, 需要烤片和脱蜡, 破坏了组织细胞中的生物分子。油松胚珠含水量较高, 冰冻切片过程中易形成冰晶, 破坏组织结构, 组织观察效果不如石蜡切

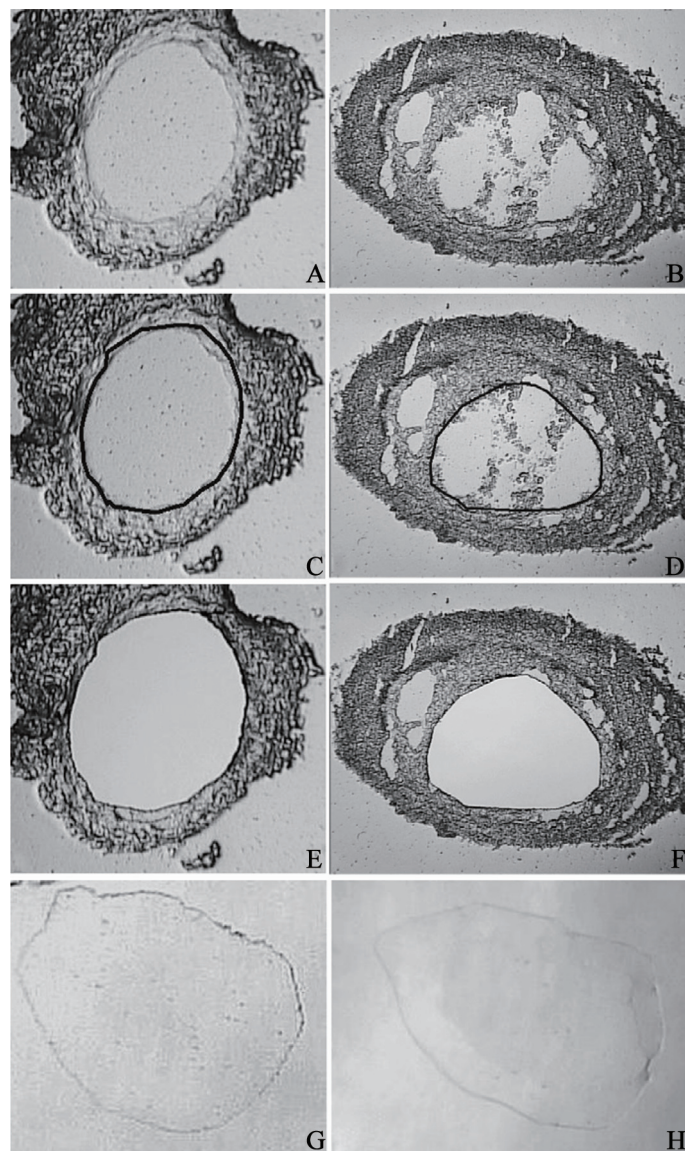


图3 激光显微切割分离雌配子体的过程($\times 200$)

Fig. 3 Separation of *P. tabulaeformis* ovules in female gametophyte by laser capture microdissection

A、C、E为游离核分裂前期油松胚珠; B、D、F为分裂后期油松胚珠; A和B为切割前胚珠横切面; C和D标注部分为雌配子体; E和F为切割后胚珠剩余部分; G和H为收集到的雌配子体。

片,但其实验周期短,步骤简单,不需要烤片、脱蜡、染色,保护了组织细胞中的生物分子,有效保证了DNA、RNA和蛋白质的完整性和生物活性,最大程度降低了它们的断裂及降解。考虑到探究油松雌配子体发育的分子机制需要提取相应的生物大分子,特别是高质量RNA的提取对实验条件要求较高,本研究采用了冰冻切片技术作为激光显微切割的前步骤,进行了不同发育时期油松胚珠雌配子体的切割和收集(图3)。

2 切片厚度对冰冻切片及激光显微切割的影响

切片厚度大于12 μm 的冰冻切片卷片、碎片少,材料不易发生自我皱缩、破损,成功率高,但是需要的激光脉冲能量大,难以被激光完整切割,材料暴露在空气中时间长,生物分子易破坏、降解,且长时间的高脉冲能量导致仪器过热,对激光显微切割仪器损害大。8~10 μm 厚的冰冻切片卷片、碎片较少,容易被激光切割。需要的激光脉冲能量较低,可以长时间使用仪器进行切割;而小于8 μm 的切片很薄,发生自我皱缩,破损的情况严重,切片的成功率低。因此,本文采用了10 μm 的厚度来进行冰冻切片,获得了高质量的雌配子体细胞。

3 问题与展望

激光显微切割技术具有操作性强,特异性高等特点,在分离植物单一组织或细胞方面具有广阔的应用前景。本文与后续分子生物学分析相结合,研究游离核分裂时期油松胚珠的基因表达与调控,希望揭示游离核有丝分裂停止的原因,为裸子植物胚珠发育机制提供参考。在冰冻切片时保证组织的清晰和完整性,在有限的资源基础上切割获得足够的目标组织,避免核酸、蛋白质分子的损伤及降解都是需要进一步探讨的问题。总之,激光显微切割技术可以快速、精确地获得油松胚珠雌配子体细胞,为油松胚珠雌配子体的分离及相关大分子的提取提供了良好的技术支持。

参考文献

丁坤善, 郑彩霞, 包仁艳(2004). 油松雌性不育系的POD同工酶和蛋白质多肽分析. 西北植物学报, 24 (1): 17~20
 贺窑青, 郑彩霞(2007). 油松雌性不育性与胚珠发育过程中物质代谢关系的初探. 北京林业大学学报, 29 (5): 88~93
 李凤兰, 郑彩霞(1990). 油松胚珠后期败育问题初探. 北京林业大学学报, 12 (3): 68~74

李敏俐, 郑彩霞(2002). 油松雌性不育系(28号无性系)的RAPD分析. 北京林业大学学报, 24 (4): 35~38
 陆叶, 席梦利, 刘光欣, 徐进, 施季森(2007). 激光显微切割技术在植物细胞和分子生物学研究中的应用进展. 南京林业大学学报, 31 (2): 113~117
 杨远媛, 李友丽, 郑彩霞(2008). 离体培养条件下不同育性油松胚珠发育的细胞学观察. 江苏农业科学, (4): 76~79
 Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Ornstein DK, Niu S, Zhao Y, Petricoin III EF, Emmert-Buck MR (2003). Evaluation of ethanol 2 fixed, paraffin 2 embedded tissues for proteomic applications. *Proteomics*, (3): 413~421
 Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K (2002). Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J*, 32: 401~408
 Casson S, Spencer M, Walker K, Lindsey K (2005). Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of Arabidopsis. *Plant J*, 42: 111~123
 Li SH, Schneider B, Gershenzon J (2007). Microchemical analysis of laser-microdissected stone cells of Norway spruce by cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, 225: 771~779
 Nakada M, Komatsu M, Ochiai T, Ohtsu K, Nakazono M, Nishizawa NK, Nishiyama R, Kameya T, Kanno A (2006). Isolation of *MaDEF* from *Muscari armeniacum* and analysis of its expression using laser microdissection. *Plant Sci*, 170: 143~150
 Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, Schnable PS (2003). Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of gene expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of Maize. *Plant Cell*, 15: 583~596
 Ohtsu K, Smith MB, Emrich SJ, Borsuk LA, Zhou R, Chen T, Zhang X, Timmermans MCP, Beck J, Buckner B et al (2007). Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.). *Plant J*, 52: 391~404
 Raab T, Lopez-Raez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Munoz-Blanco J (2006). FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enoneoxidoreductase. *Plant Cell*, 18: 1023~1037
 Ramsay K, Wang Z, Jones MGK (2004). Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root knot nematodes. *Mol Plant Pathol*, 5: 587~592
 Sanders PM, Bui AQ, Le BH, Goldberg RB (2005). Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence. *Sex Plant Reprod*, 17: 219~241
 Suwabe K, Suzuki G, Takahashi H, Shiono K, Endo M, Yano K, Fujita M, Masuko H, Saito H, Fujioka T et al (2008). Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol*, 49: 1407~1416
 Wu Y, Machado AC, White RG, Llewellyn DJ, Dennis ES (2006). Expression profiling identifies genes expressed early during Lintfiber initiation in cotton. *Plant Cell Physiol*, 47: 107~127