

植物根内皮层凯氏带染色的小檗碱-苯胺蓝对染法

徐建华^{1,*} 陶冶¹ 黄艳¹ 孙家林^{2,**}

¹中国科学院高能物理研究所, 北京 100039; ²清华大学物理系, 北京 100084

A Berberin-aniline Blue Counterstaining Method for Dying Caspary Band in Root Endodermis

XU Jian-Hua^{1,*}, TAO Ye¹, Huang Yan¹, SUN Jia-Lin^{2,**}

¹The Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; ²Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084

提要 介绍了一种能观察到植物根内皮层凯氏带精细结构的小檗碱-苯胺蓝对染法。

关键词 植物根; 内皮层; 凯氏带; 小檗碱; 苯胺蓝

构成植物根内皮层凯氏带的物质主要是木质素和木栓。用于这类物质的染色法很多^[1,2], 如国内常用的番红-固绿对染、苏丹 III 染色等^[3]。但这些方法或者对检测少量物质不够灵敏, 或者操作程序复杂, 因此较少使用, 限制了对内皮层的研究。荧光显微技术出现后, 由于其光学镜头在暗场的陪衬下, 对比度大, 灵敏度高^[4], 极大地促进了对凯氏带典型结构的观察。1941年, Elisei^[5]首先报道一些取自白屈菜(*Chelidonium majus*) 活体根的提取物可以充当凯氏带的荧光染色剂, 便于在荧光显微镜下观察。后经证实, 这些化学物质包括小檗碱、白屈菜红碱、血根碱、白屈菜胺以及其他异喹啉生物碱^[6]。经研究发现, 不仅白屈菜根内含有这类生物碱, 其它许多植物种内也含有这些物质^[7], 这就为荧光染色提供了大量的自然染色资源。Wilcox^[8]及Peirson和Dumbroff^[9]是较早使用这种提取物染内皮层凯氏带和木质素的。Peterson等^[10]也采用这一方法清楚地看到禾谷类和葱等植物根外皮层中的凯氏带。但使用这一方法时, 细胞内容物和靠近木栓层的酚类物质需要热碱清除掉, 而植物组织切片经碱处理后往往变得很柔软, 难以操作和固定。为了解决这个问题, Brundrett等^[11]比较了以上几种生物碱的特性, 发现可以用小檗碱染植物的新鲜切片, 苯胺蓝用作对染, 以取代热碱清除步骤。经检测, 用苯胺蓝作小檗碱的对染剂, 既可除去背景荧光, 又解决了组织切片过程中由于其过于柔软而难以控制的问题。

我们采用小檗碱-苯胺蓝对染法研究了几种植物根内皮层的结构, 现介绍如下。

材料与方法

1 材料

植物材料为玉米(*Zea mays*), 水稻(*Oryza sativa*)、野牛草(*Buchloe dactyloides*)。

2 方法

将以上几种植物幼根的成熟区(距根冠10~12 mm处)在水中切下后, 快速冷冻切片, 或不经冷冻作徒手切片, 挑选出完整而均匀的切片置于载玻片上, 按以下步骤荧光染色: (1)切片浸泡在0.1%(W/V)小檗碱半硫酸盐(berberin hemi-sulphate, Sigma, C. I. no. 75160)中1 h, 试剂用蒸馏水配制。(2)用蒸馏水反复清洗5次左右。(3)浸泡在0.05%(W/V)苯胺蓝(aniline blue, Polysciences, C. I. no. 42755)中约0.5 h, 以后的清洗步骤如上。试剂用蒸馏水配制。(4)样品置于经过滤的0.5%(W/V) FeCl₃与甘油的混合液(体积比1:1)中, 几分钟(一般为5 min)后即可用于观察。FeCl₃固定的目的是使染色保留的时间更持久。

3 荧光显微镜成像

染色完毕的切片用Zeiss Photomicroscope III

收稿 2003-10-20 修定 2004-02-17

资助 国家自然科学基金(10174043)。

* E-mail: xujianhua@ihep.ac.cn, Tel: 010-88235978

** 通讯作者(E-mail: jlsun@mail.tsinghua.edu.cn, Tel: 010-62772687)。

和 Zeiss Aziophot microscope, UV照明, 激发滤器 G365 (365 nm 发射峰), 色差分光器 FT395 (395 nm), 阻挡滤片 LP420 (允许大于 420 nm 波长的光通过)。多数照片用 100 ASA 胶片拍摄。虽然用 FeCl_3 固定后染色时间可持续 1 d 多, 但最好在染色后几小时内观察, 这样拍摄的照片效果更好。根据我们的经验, 将染色后的样品放在 $4\sim 5^\circ\text{C}$ 冰箱内, 不但可保存多日, 而且观察效果也非常理想。

结果与讨论

图 1-a 是玉米根的染色结果。从中可以看出, 经小檗碱染色的中柱导管木质化细胞壁呈黄色; 内皮层凯氏带呈黄白色; 根部内皮层内外的薄壁组织细胞均被苯胺蓝染成蓝色。在图 1-b 野牛草根

中, 内皮层中的凯氏带染成黄白色, 而位于凯氏带外部的木栓层则染成蓝白或蓝色。某些植物的凯氏带基本退化, 如适应水中生长的水稻和水生植物, 一般方法很难观察到。但采用此法亦可较清楚地看到仅存于水稻内皮层细胞侧向壁的凯氏带结构 (图 1-c)。由此可见, 小檗碱-苯胺蓝对染法是观察木质化细胞壁、凯氏带、木栓层的快速、简单而又灵敏的方法。根据 Peterson 等^[12]对洋葱根表皮和皮层细胞的染色模式的解释, 认为洋葱表皮细胞壁包含酚醛类及自发荧光的混合栓质, 可被小檗碱染色, 而部分则被苯胺蓝去除。皮层薄壁细胞壁通常无自发荧光, 几乎全部小檗碱的染色都能被苯胺蓝去除。小檗碱-苯胺蓝可使外皮层细胞凯氏带的荧光变得很强, 而在未染色切片中则由于能自发荧光以致无法辨认。总之, 小檗

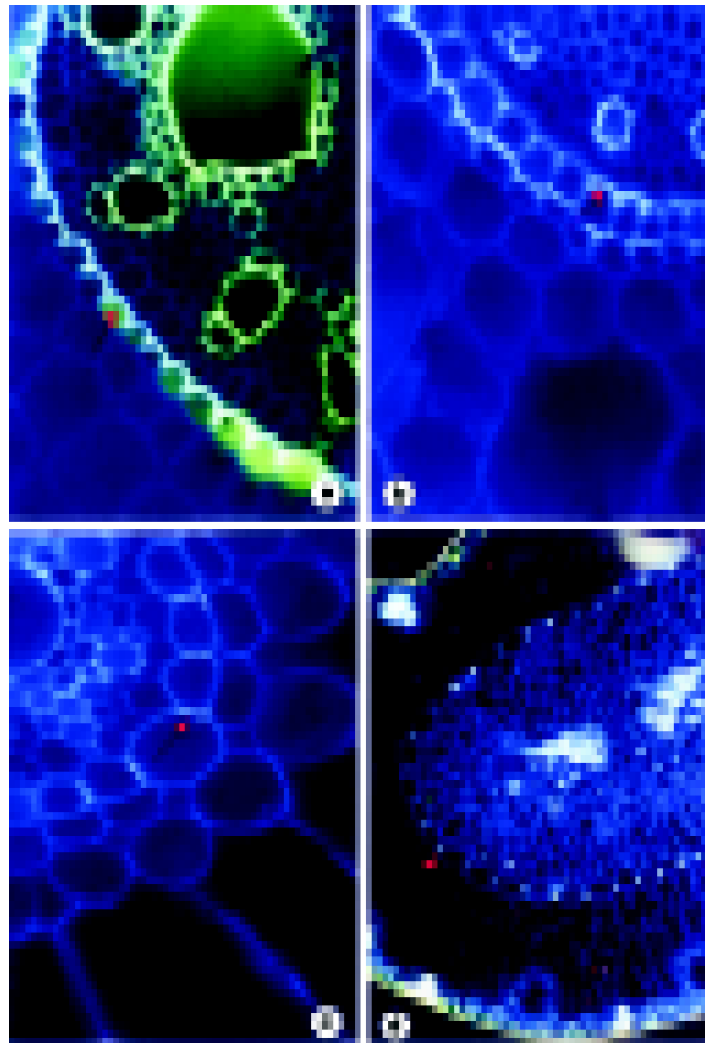


图1 几种植物根内皮层的小檗碱-苯胺蓝染色
箭头所示均为内皮层。a、b 和 c 分别是玉米、野牛草和水稻根的染色结果, d 为松针叶中的内皮层。

碱-苯胺蓝染色技术可以很容易鉴定根内皮层和中柱的各个不同结构。

除植物根中的内皮层外, 此法对其他组织中的内皮层也很适用, 如松针叶的内皮层染色(图1-d)。

1 苯胺蓝的对染特点

在生物组织染色中很重要的一点就是要去除背景荧光, 突出所要观察的结构。实验证明, 苯胺蓝作为对染剂的效果很好。例如, 当完全没有染色的根切片用UV光检测时, 管状分子壁和内皮层凯氏带以及栓质层均产生自发荧光, 这就使得位于“三明治式结构”中间的凯氏带很难辨别。苯胺蓝染色会减轻管状分子自发荧光, 并能部分去除木栓层的自发荧光, 因此, 内皮层凯氏带能清楚地看到。另外, 小檗碱染色引起的木质部荧光太强, 以致在同样的曝光条件下无法观察到内皮层栓质。苯胺蓝对染可以减弱多余的木质部荧光, 在突出木栓质层的同时, 还可以部分去除木质化细胞壁的染色, 特别是不成熟的木质部细胞吸收染色较差, 可以根据其着色的程度判断木质部发育的不同阶段。苯胺蓝也能去除植物组织中的初生荧光, 包括叶绿素及许多次生代谢产物, 其对不成熟木质部管道(没完全木质化)的去除程度大于已完全木化的; 去除木栓层的程度也大于凯氏带的(特别是前者相对薄时)。细胞壁各组分的荧光去除可以苯胺蓝处理切片的时间长短加以调控。

需要注意的是, 最好在使用前苯胺蓝溶液就配好并过滤, 避光保存, 这样的染色效果更好; 而临时配制苯胺蓝溶液往往染色不够均匀, 小檗碱也是如此。根据我们的经验, 提前准备溶液和溶液过滤对能否染出颜色柔和、结构清晰的效果很重要, 这一细节容易忽略, 应该考虑。

2 小檗碱的染色特点

白屈菜的几种生物碱提取物中, 除白屈菜胺未表现出染色特性外, 小檗碱、白屈菜红碱、血根碱和白屈菜胺的染色特点都很相似, 均能产生不同强度的黄或橙色。但在UV光照射下, 后三者生物碱染色产生的荧光都会很快衰退。在具有染色能力的生物碱中, 只有小檗碱的染色能力好, 抗漂白能力强, 是植物组织染色中最好的染

色剂。事实上, 小檗碱早已用于各种组织结构的染色, 包括动物细胞中的肝素和DNA^[13]以及植物细胞中的纤维壁等^[14]。小檗碱在紫外和蓝光部分有几个激发带, 较宽的发射峰在550 nm左右^[13]。用这种染色法进行紫外激发会得到较好的结果。与蓝光和紫光激发相比, 加紫外滤光片更多的可见光可以通过。

UV照射引起的荧光衰退常使染色切片无法在高倍下进行观察和检测。衰退速率可能与光强、波长和荧光团浓度有关。抗氧化剂如对苯二胺、没食子酸和重氮双环辛烷都可用于防止其他荧光团的衰退^[15, 16], 但对小檗碱不起作用。这可能是由于染色壁较厚, 氧化剂无法进去。一个简单的降低衰退速度的方法是在UV激发前通过白光聚焦, 尽可能地减少UV的照射时间。

小檗碱和白屈菜提取物对细胞壁有很强的吸附性, 在足以穿透细胞壁的浓度下也会出现细胞内含物和纤维壁呈非特异性染色的现象。因此, 木栓质和木质素在植物组织中的特殊位置需用苯胺蓝的对染予以加强。当高浓度的苯胺蓝固定在FeCl₃中时, 会与多余的荧光试剂发生反应, 形成无荧光的化合物。可用于去除细胞壁中小檗碱的荧光。

小檗碱和苯胺蓝染色的切片固定在甘油中会迅速退色。只有含FeCl₃的甘油可以防止苯胺蓝和小檗碱退色。用这种浸片剂染色可以长时间保存。环氧树脂和异丁烯酸包埋的切片无法用苯胺蓝作小檗碱的对染剂。即便去除包埋剂之后也是如此。由于切片过程中的固定、脱水和渗透等处理使细胞壁的透性受到破坏, 因而染色剂无法着色。

总之, 以小檗碱-苯胺蓝对染法观察内皮层结构比传统的组织化学方法有以下几个优点: 操作简单; 灵敏度高, 例如用传统的方法无法区别木栓层和凯氏带, 而用此法借助苯胺蓝的对染, 不但可以清晰地辨认凯氏带、木栓层等内皮层的精细结构, 还可以根据细胞壁木质化和着色程度的不同来判断细胞的不同发育阶段。这一点对研究植物发育及解剖结构与生理功能之间的联系尤其有价值。植物根部内皮层中的凯氏带对根内外物质运输很重要, 这已得到普遍认同^[17], 而外皮层

凯氏带对根的生长发育所起的作用也日渐引起人们的关注, 只是因其不易观察到而常被忽略, 用本文中的对染法则可以像研究内皮层凯氏带一样研究外皮层凯氏带的结构^[18]。由于此法有以上特点, 所以近年来已得到广泛应用^[19, 20]。

参考文献

- Johnson DA. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill, 1940
- Jensen WA. Botanical Histochemistry: Principles and Practice. San Francisco: WH Freeman, 1962
- 李正理. 植物制片技术. 北京: 科学出版社, 1987
- O'Brien TP, McCully ME. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne Termarcarphi Pty, 1981
- Elisei FG. Ficherche microfluoroscopiche sui punti de Caspary. Pavia Univ Inst Bot Atti, 1941, 13:1~64
- Stahl E, Schild W. Pharmazeutische Biologie. Drogenanalyse, II Inhaltsstoffe und Isolierungen. New York Gustav Fischer, 1981. 69~70
- Philogene BJR, Arnason JT, Towers GHN et al. Berberine: a naturally occurring phototoxic alkaloid. J Chem Ecol, 1984, 10: 115~123
- Wilcox W. Primary organization of active and dormant roots of noble fir, *Abies procera*. Am J Bot, 1954, 41: 812~821
- Peirson DR, Dumbroff EB. Demonstration of a complete Casparian strip in *Avena* and *Ipomoea* by a fluorescent staining technique. Can J Bot, 1969, 47:1869~1871
- Peterson CA, Emanuel ME, Wilson CW. Identification of a Casparian band in the hypodermis of onion and corn roots. Can J Bot, 1982, 60:1529~1535
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin and callose in plant tissue. Protoplasma, 1988, 146:133~142
- Peterson CA, Peterson RL, Robards AW. A correlated histochemical and ultrastructural study of the epidermis and hypodermis of onion roots. Protoplasma, 1981, 96:1~21
- Enerbach L. Berberin sulphate binding to mast cell polyanions: a cytofluorometric method for the quantitation of heparin. Histochem, 1974, 42:301~313
- Karabestos JH, Pappelis AJ, Russo VM. Visualization of halos in the epidermal cell wall of *Allium cepa* caused by *Colletotrichum dematium* f. *circinans* and *Botrytis allii* using fluorochromes. Mycopathologia, 1987, 97:137~141
- Johnson GD, Davidson RS, McNamee et al. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. J Immunol Methods, 1982, 55:231~242
- Malnes K, Brandtzaeg P. Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. J Histochem Cytochem, 1985, 33: 755~761
- 徐建华, 孙家林, 郭继华等. 植物根的内皮层结构与生理功能. 植物生理学通讯, 2002, 38: 187~192
- Zeier J, Schreiber L. Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*: identification of the biopolymers lignin and suberin. Plant Physiol, 1997, 113: 1223~1231
- Seagle JL Jr, Peterson CA, Enstone DE. Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. Can J Bot, 1999, 77:113~121
- Steudle E, Peterson CA. How does water get through roots? J Exp Bot, 1998, 322:775~788