

技术与方法 Techniques and Methods

植物亚显微结构中钾离子的原位检测技术

张莉, 王巧艳, 李思, 董鹤, 姚雅琴*

西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌712100

摘要: 利用亚硝酸钴铅钠[NaPbCo(NO₂)₆]与K⁺能形成KPbCo(NO₂)₆电子不透过性颗粒并沉淀在原位的原理, 以玉米叶片为材料, 建立了K⁺的原位检测方法。检测结果显示, K⁺主要分布在维管束、细胞膜、叶绿体、细胞核及核仁等部位, 与现有的结论相符。该方法显色特异性强、灵敏度高、处理的植物组织和细胞结构保持较完好, 因此, 可以作为一种新技术用于植物亚显微结构中K⁺的原位检测。

关键词: 亚显微结构; K⁺; 原位检测

In situ Detection Technology of Potassium in Submicroscopic Structures of Plants

ZHANG Li, WANG Qiao-Yan, LI Si, DONG He, YAO Ya-Qin*

College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: An *in situ* detection method for K⁺ was found with maize leaves as the materials in this paper. The distribution of sodium lead cobaltinitrite [NaPbCo(NO₂)₆] in submicroscopic structures of plant cells was observed by means of the production of KPbCo(NO₂)₆, which precipitated to form electronic impermeable particles *in situ*, when NaPbCo(NO₂)₆ reacted with K⁺. We found K⁺ is mainly distributed in the vascular bundles, cell membrane, chloroplasts, nuclei and nucleoli using this method, which is considerably consistent with current research results. The method has advantages of high sensitivity and specificity in coloration, with cell structure of plant tissue remaining relatively intact. Therefore, this method can be used as a new technology in detecting K⁺ in plant submicroscopic structures *in situ*.

Key words: submicroscopic structure; K⁺; *in situ* detection

K⁺作为植物体中含量最丰富的一价阳离子, 广泛分布于植物的各组织器官中(靳义荣等2012), 对植物的生长发育具有重要的生理功能。K⁺在酶活性的调节、膜电位的调整等一系列生理生化过程中起关键作用, 在维持植物细胞动态平衡、细胞膨压调整、调节气孔运动等生理过程中也起重要的调节作用(Szczerba等2009)。

目前对于K⁺的测定有多种方法, 如火焰光度计法(潘浩2003)、离子选择性电极测量法(Shabala和Newman 1999)、原子吸收法(Hughes等1997)、同位素⁸⁶Rb的摄取法(Yu等1999)、温度滴定法、离子色谱法、四苯硼酸钾重量法(孙焕等2012)、ICP-MS法(李隼等2011)、色氨酸酶法(Kimura等1992)、比浊法(李忠等2001)、反射仪-K⁺试纸法(张晓海2006), 以及用电解质分析仪(田强等2011)、Beckman CX7全自动生化检测仪(王琳和

王长安2012)、紫外分光光谱仪(顾星和谭秦湘2005)进行测定等。以上实验方法均需要将细胞离体再进行实验处理, 细胞离体实验对细胞有一定的损伤, 不可避免地对实验结果造成影响。Macallum (1905)用Na₃Co(NO₂)₆对玉米表皮细胞内的K⁺进行过染色观察, 但是仅局限于光学显微镜。目前, 在亚细胞结构水平上对动、植物材料进行K⁺的原位检测技术很少。

Na₃Co(NO₂)₆作为化学实验中K⁺分析的常用试剂, 可以与K⁺结合形成颗粒沉淀, 但在光学显微镜下需要与硫化铵进一步作用才能形成可观察的棕黑色颗粒沉淀(Macallum 1905)。连宁(1999)使

收稿 2015-05-05 修定 2015-08-31

资助 国家高技术研究发展计划项目(2011AA100504)。

* 通讯作者(E-mail: yaoyaqin@nwsuaf.edu.cn)。

用寿命更长的 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 代替了容易分解的 $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, K^+ 与 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 能形成更稳定的 $\text{KPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 沉淀复合物, 组织中有 K^+ 存在的位置就有此沉淀复合物分布。由于复合物中重金属铅在透射电镜下显黑色, 根据组织中黑色颗粒的分布位置可以确定 K^+ 在各种亚显微结构中的分布状况, 黑色颗粒的多少和深浅可以比较 K^+ 的相对含量。

本文根据光学显微镜和电子显微镜的成像原理建立了一个新方法, 在显微及亚显微结构水平上对 K^+ 进行原位检测, 不仅能够减少甚至能够避免这些伤害, 从而更准确地显示出组织细胞内部 K^+ 原有的状态, 进行 K^+ 的细胞或亚细胞定位。

材料与方法

1 植物材料

玉米(*Zea mays* L.) ‘郑单958’叶片。

2 方法设计

设计了4种方法: (1)前固定-染色-后固定-脱水-包埋, pH为6.3; (2)前固定-染色-后固定-脱水-包埋, pH为7.2; (3)染色-前固定-后固定-脱水-包埋, pH为6.3; (4)染色-前固定-后固定-脱水-包埋, pH为7.2。对照除了未经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色外, 其他处理均相同。

3 操作流程

取大田玉米叶片, 切成 $2\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ 的小方片; 参照连宁(1999)的方法配制 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 溶液, 染色1 h; 用Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH=6.3)漂洗2次, 每次15 min, 再用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲砷酸钠(CAB)溶液漂洗4次, 每次15 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下用2.5%戊二醛与2%多聚甲醛的混合液前固定30 min; 用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAB溶液漂洗4次, 每次15 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAB溶液配制的1%锇酸后固定2 h; $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAB溶液漂洗4次, 每次15 min; 30%~100%酒精梯度脱水; 丙酮过渡; Spon812包埋剂渗透包埋, LKB BROMMA 2088超薄切片机切片, 切片不经铅和钼染色直接在JEOL-1230透射电镜下观察并拍照。

实验结果

光学显微镜下, 玉米叶片表皮气孔开关过程中, $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 对保卫细胞和副卫细胞中 K^+ 的染色结果与Macallum (1905)用 $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ 染色的结果一致。此实验结果也与Mumm等(2011)的研究结果一致, 即光照时气孔打开, K^+ 主要分布在保卫细胞中(图1-A和B), 黑暗时气孔关闭, K^+ 主要分布在副卫细胞中(图1-D和E)。

透射电镜下, 观察和比较4种不同的样品处理方法, 结果表明, 4种处理方案均能用于组织中 K^+

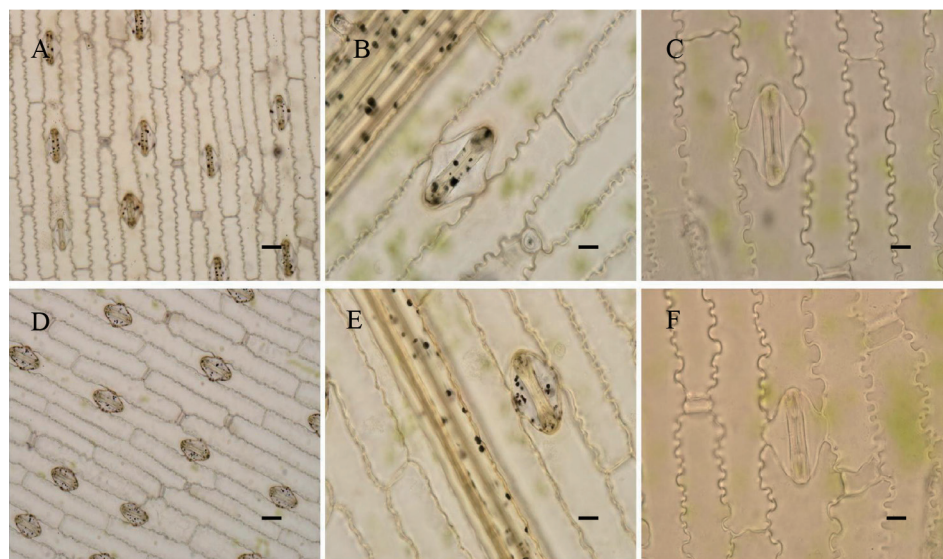


图1 光学显微镜下玉米叶片气孔中经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色的 K^+

Fig.1 K^+ in maize leaf stoma stained by $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ under light microscope

A和B: 光照处理后染色; C: 光照处理后未染色; D和E: 黑暗处理后染色; F: 黑暗处理后未染色。标尺=20 nm。

亚显微水平的原位检测, 其中, 染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH为6.3)的方法效果最佳。从图2-A和B可见, 维管束导管中有较多的 K^+ 分布, 与光学显微镜的染色观察结果(图1-B和E)一致, 说明维管束是植物体吸收 K^+ 的运输通道; 张明菊等(2015)的研究也已证实了这一点。

由图3-A可见, 在胞间连丝周围电子不透过性颗粒较多, 说明 K^+ 在此处相对聚集, 印证了胞间连丝具有物质运输的功能。图3-D显示, 电子不透过

性颗粒沿着细胞膜形成一条明显的细胞边界, 说明细胞膜具有介导 K^+ 交换的功能。另外, 图3-C显示, 在靠近维管束的三角形细胞间隙内贮存了大量的 K^+ , 其原因尚不明确。

从图4-A可以看出 K^+ 在叶绿体内的分布, 说明植物细胞内部叶绿体也是 K^+ 的一个贮存场所。此外, 还观察到核仁中沉积了较多的 K^+ , 在细胞核中的其余地方也有 K^+ 的分布(图4-C); 与Libanati和Tandler (1969)得到的结果相似。

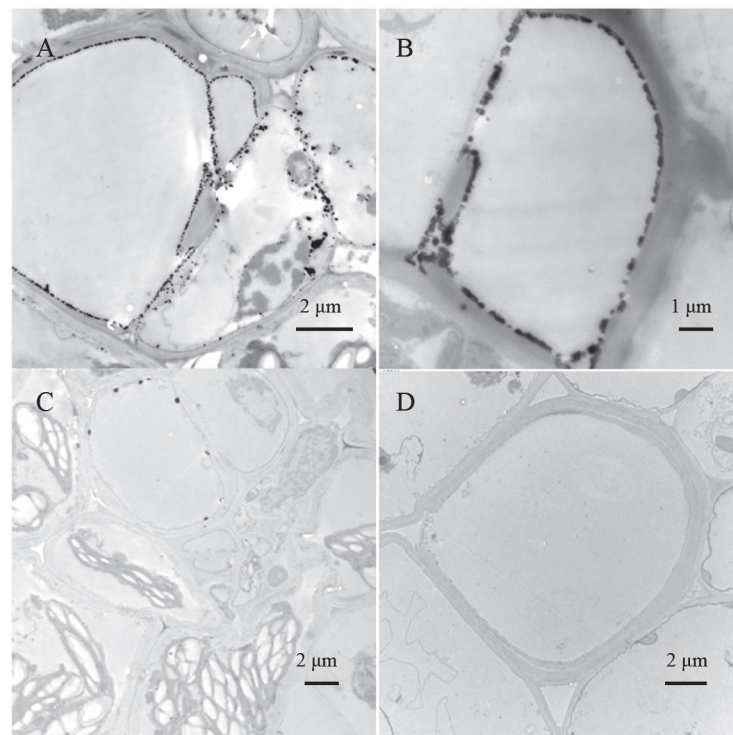


图2 透射电镜下维管束导管中经 $NaPbCo(NO_2)_6$ 染色的 K^+

Fig.2 K^+ in vascular catheter stained by $NaPbCo(NO_2)_6$ under transmission electron microscope

A: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH为6.3)处理的维管束; B: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH为6.3)处理的导管; C: 其他处理的代表; D: 未经 $NaPbCo(NO_2)_6$ 染色的对照。

讨 论

本研究采用 $NaPbCo(NO_2)_6$ 与Macallum (1905)用的 $Na_3Co(NO_2)_6$ 进行了光学显微镜下的比对试验, 两者的显色特性完全相同, 而且 $NaPbCo(NO_2)_6$ 的显色效果明显优于 $Na_3Co(NO_2)_6$ 。说明用 $NaPbCo(NO_2)_6$ 捕获 K^+ 进行细胞或亚细胞水平的分布研究是可靠的。

基于 K^+ 专用捕获剂 $NaPbCo(NO_2)_6$ 中含有重金

属铅, 我们比较了4种对植物材料的处理方法, 建立了用 $NaPbCo(NO_2)_6$ 对 K^+ 进行亚细胞定位的透射电镜组织细胞化学染色技术。光学显微镜下 K^+ 染色缓冲液的最适pH为6.3, 而用于透射电镜观察的植物样品细胞化学定位的常用缓冲液pH为7.2, 所以对染色和前固定之后的漂洗液Tris-顺丁烯二酸缓冲液的pH进行了试验, 同时染色与前固定过程可能会相互影响。先进行前固定再染色能够较好地保持样品结构的完整性, 但是前固定会对细胞

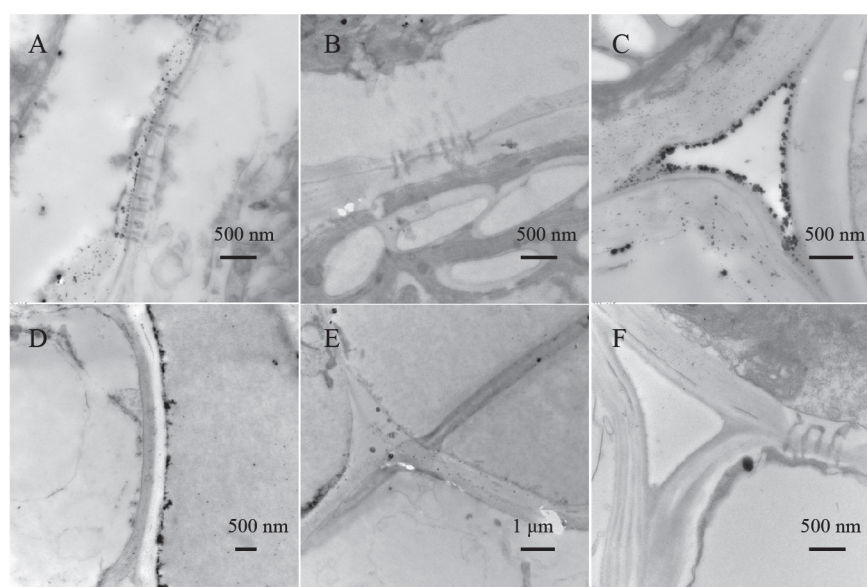


图3 透射电镜下胞间连丝、三角形细胞间隙和细胞膜中经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色的 K^+
Fig.3 K^+ in plasmodesma, triangular intercellular space and membrane stained by $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$
under transmission electron microscope

A: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH 6.3)处理的胞间连丝; B: 胞间连丝的其他处理组代表; C: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH 6.3)处理的三角形细胞间隙; D: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH 6.3)处理的细胞膜周围; E: 三角形细胞间隙及细胞膜的其他处理组代表; F: 未经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色的三角形细胞间隙、细胞膜、胞间连丝的对照。

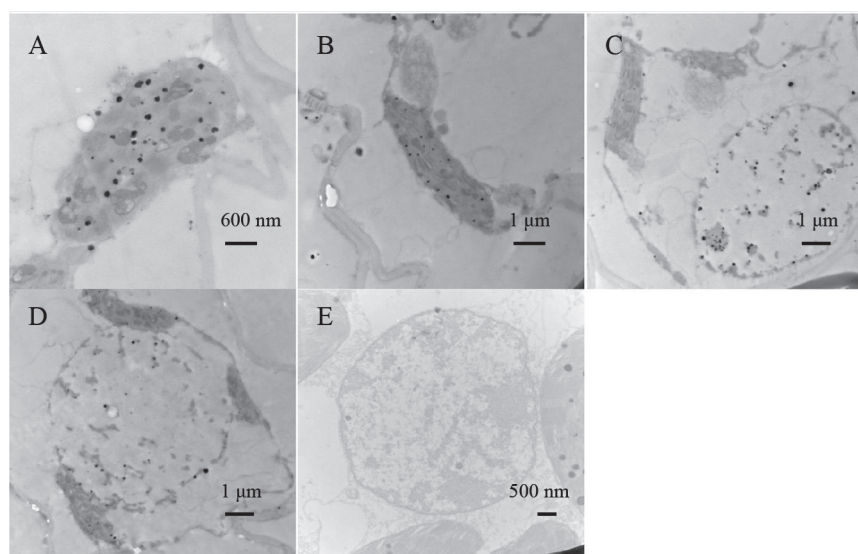


图4 透射电镜下叶绿体、细胞核中经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色的 K^+
Fig.4 K^+ in chloroplast and nucleus stained by $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ under transmission electron microscope

A: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH 6.3)处理的叶绿体; B: 叶绿体的其他处理组代表; C: 经染色-前固定-后固定-脱水-包埋(pH 6.3)处理的细胞核; D: 细胞核的其他处理组代表; E: 未经 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色细胞核及叶绿体的对照。

内化学反应的显色产生影响, 这可能是先进行前固定后染色的2组处理效果差的原因。先染色虽然对组织也有损伤, 但本实验结果表明, 先染色仍可

使细胞结构保持相对完整。由于用 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 染色与光学显微镜 $\text{NaPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 捕获 K^+ 的原理相同, 所以在染色之后, 用光学显微镜使用的pH为6.3的

Tris-顺丁烯二酸缓冲液漂洗效果最好,可能是其对 $\text{KPbCo}(\text{NO}_2)_6$ 沉淀颗粒的稳定性有益。

细胞核作为细胞内的离子库,参与细胞内部电解质的聚集(Tandler等1970),本文图4-C中细胞核内部的大量 K^+ 沉淀能证实这一点。叶绿体不仅是 K^+ 的一个储存库,而且其参与的光合作用更离不开 K^+ , K^+ 对于叶绿体来说是不可或缺的(郑炳松等2002),维管束、胞间连丝、细胞膜等具有 K^+ 运输的功能也是众所周知的,这些在本文结果中均得以体现。此方法不仅能够对 K^+ 进行亚细胞定位,而且可以通过电子不透性颗粒的大小与多少,反映 K^+ 在某个部位的相对含量变化,即能够直接观察不同条件下细胞或亚细胞水平上 K^+ 在相对位置和相对含量上的变化。

参考文献

- 顾星,谭秦湘(2005). 自汗患者汗液中的钠、氯、钙、钾无机离子测定. 中国中医基础医学杂志, 11 (5): 371~372
- 靳义荣,刘好宝,宋毓峰,董连红,白岩,张良,王倩(2012). 植物Shaker家族钾离子通道研究进展. 分子植物育种(网络版), 10: 1360~1368
- 李隼,黄胜东,赵福庚(2011). 重金属镉对水稻根毛细胞钾离子吸收过程的影响. 植物生理学报, 47 (5): 481~487
- 李忠,蒋次清,刘巍,施红林,杨光宇(2001). 烟草中钾含量测定的研究. 分析科学学报, 17 (1): 60~61
- 连宁(1999). 亚硝酸钴钠沉淀液的配制及重制回收. 西南民族学院学报(自然科学版), 25 (3): 260~262
- 潘浩(2003). 火焰光度计法快速检测药液中钾离子浓度. 海峡药学, 15 (5): 48~49
- 孙焕,李涛,陶玲,龚雁(2012). 温度滴定法测定复合肥中钾离子浓度的研究. 中国土壤与肥料, (4): 95~98
- 田强,沈云峰,张洪波(2011). 动脉全血和静脉血浆中钾和钠比较分析. 江汉大学学报(自然科学版), 39 (2): 73~75
- 王琳,王长安(2012). 个体化钾浓度透析的临床观察与应用. 国际医药卫生导报, 18 (18): 2695~2697
- 张明菊,王红梅,王书珍,范佩,夏启忠(2015). 植物对维管束病原菌的防卫反应机制研究进展. 植物生理学报, 51 (5): 601~609
- 张晓海(2006). 烟草含钾量反射仪-钾离子试纸法快速测定研究初报. 中国农学通报, 22 (7): 142~145
- 郑炳松,程晓建,蒋德安,翁晓燕(2002). 钾元素对植物光合速率、Rubisco和RCA的影响. 浙江林学院学报, 19 (1): 104~108
- Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA (1997). Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. J Biol Chem, 272 (48): 30567~30576
- Kimura S, Asari S, Hayashi S, Yamaguchi Y, Fushimi R, Amino N, Miyai K (1992). New enzymatic method with tryptophanase for determining potassium in serum. Clin Chem, 38 (1): 44~47
- Libanati CM, Tandler CJ (1969). The distribution of the water-soluble inorganic orthophosphate ions within the cell: accumulation in the nucleus. Electron probe microanalysis. J Cell Biol, 42 (3): 754~765
- Macallum AB (1905). On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. J Physiol, 32 (2): 95~198
- Mumm P, Wolf T, Fromm J, Roelfsema MRG, Marten I (2011). Cell type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. Plant Cell Physiol, 52 (8): 1365~1375
- Shabala S, Newman I (1999). Light-induced changes in hydrogen, calcium, potassium, and chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. Understanding the ionic basis of light-induced bioelectrogenesis. Plant Physiol, 119 (3): 1115~1124
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucher HJ (2009). K^+ transport in plants: physiology and molecular biology. J Plant Physiol, 166 (5): 447~466
- Tandler CJ, Libanati CM, Sanchis CA (1970). The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. Electron microscope and microprobe analysis. J Cell Biol, 45 (2): 355~366
- Yu SP, Yeh CH, Strasser U, Tian M, Choi D (1999). NMDA receptor-mediated K^+ efflux and neuronal apoptosis. Science, 284 (5412): 336~339