

小麦天然钙调素抗体制备 及酶标免疫组化定位

程智慧^{1**} 白娟² 石大伟 孙大业^{2*}

(1.河北农业大学农学系,保定 071001; 2.河北师范大学生物系,石家庄 050010)

摘 要

以小麦不修饰的天然钙调素 (CaM) 制备抗体。免疫学特性分析表明,小麦 CaM 抗体不能与牛脑 CaM 发生交叉反应,而可与多种植物 CaM 发生良好的交叉反应,即所得抗体对多种植物 CaM 是专一的。酶标免疫组化法在烟草愈伤组织细胞定位表明,细胞质 CaM 含量较高;在细胞核中,特别是核仁中亦含有 CaM。

关键词 小麦 钙调素 钙调素抗体 酶标免疫组化定位

钙调素 (CaM) 是从低等到高等生物中普遍存在的一种分子量小 (16700D)、酸性、热稳定的单链蛋白质,参与众多的刺激—反应偶联和细胞生理过程的调节。CaM 抗体是用于 CaM 定性、定量及定位的重要工具。尽管动物 CaM 抗体已用于 CaM 免疫组化定位工作,但国外仍有实验室制备对植物 CaM 专一的抗体,做植物研究 [1,2]。孙大业曾用酶标二抗法在植物组织定位 CaM,获得初步成功 [3]。本文报道了小麦天然 CaM 抗体制备,抗体特性分析及在植物组织中采用酶标免疫组化方法定位 CaM 的研究新进展。

材料和方法

一、材料 从生长 4 至 5 天的黄化小麦胚芽鞘中提纯 CaM。烟草愈伤组织细胞取自河北师范大学生物系细胞室。雄性中国大白兔来自河北医学科学院实验兔场。

二、抗体的制备 小麦 CaM 按经 Biro 和孙大业 [4] 改进的 Gopalakrishna 法提纯。电泳纯的小麦 CaM 0.6~1 mg 与完全福氏佐剂混合制成油包水乳剂后免疫兔子。每隔 7 至 10 天加强注射。每次加强注射前从兔耳静脉放血,用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法监测抗体产生情况。

ELISA: 用纯小麦 CaM 或不同浓度的 CaM 粗提液包被微孔板。然后,每孔加入不同稀释度的抗血清或正常血清温育,再加入稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG。最后加入底物 TMB

显色。2 M 硫酸终止反应后, 测定475nm处的吸收值。

三、酶标免疫组化定位 按Lin [3] 等的方法进行, 即3%多聚甲醛固定烟草愈伤组织细胞, 经漂洗, 0.025M NH_4OH 、10% H_2O_2 和羊IgG (1:160稀释) 预处理后, 用1:80稀释的小麦CaM抗血清(一抗) 处理过夜。再用1:100稀释的HRP标记的羊抗兔IgG处理一小时, 用DAB (0.75mg/ml, 溶于PB中) 显色。此后于Olympus IMT-413 倒置显微镜上观察、照相记录。以(1) 用PB代替一抗; (2) 用正常血清代替一抗为对照。

结 果

一、CaM抗体的制备 按材料与方法中介绍的步骤, 我们用未经任何修饰的小麦胚芽鞘CaM免疫了两只兔子, 均产生了CaM抗体。图1表示第二只兔子抗血清产生的时间过程。由图可以看出, 第一次抗原注射约一个月后兔子才有明显反应。抗血清滴度在第35至第60天间迅速上升, 到第75天时达到最高。

二、抗血清的特性 用ELISA法检测两只兔子产生抗血清的交叉反应表明, 抗血清与牛脑CaM几乎没有交叉反应(图2), 但可与豌豆、小麦、花生、黄瓜、玉米、绿豆幼芽的CaM粗提液发生良好的交叉反应(资料未给出)。这些结果表明, 小麦CaM抗血清是对植物CaM专一的。

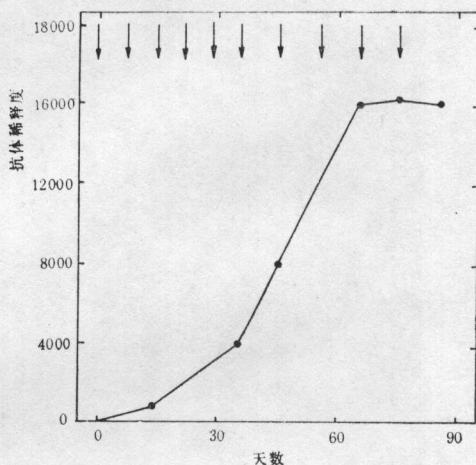


图1 抗体产生的时间过程

箭头表示抗原注射的时间。圆点表示放血时间, 所得血清用ELISA法测定滴度。

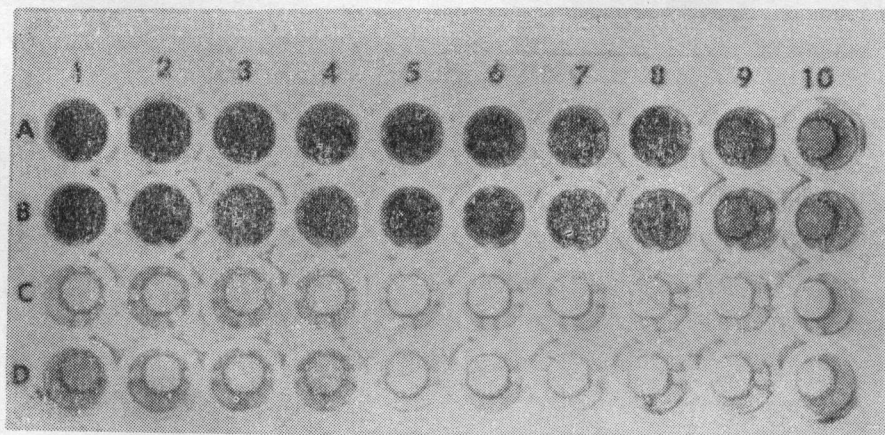


图2 第一只兔子抗血清与牛脑CaM交叉反应的情况

A·B和C·D分别用小麦和牛脑CaM包被。1~9号孔加入不同稀释度的小麦CaM抗血清 (1:4, 1:8, 1:32, 1:128, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8192)。第10号孔为对照。

三、烟草愈伤组织细胞免疫组化定位 在游离的愈伤组织细胞中,可以在光镜下看到比较完整的结构。酶标免疫定位表明,胞质为主要染色部分,它们往往集中于两个细胞之间连接的一侧,也有的形成于细胞中间的细胞质流沟。在许多液泡化细胞中,原生质被挤到一端,形成“帽状”染色模式(图3—A, B, C)。在这些细胞中较易看到核区染色,其中核质染色稍浅,而核仁染色很深(图3—A, C)。液泡染色很浅或未着色。(图3—D)为对照,染色极浅。

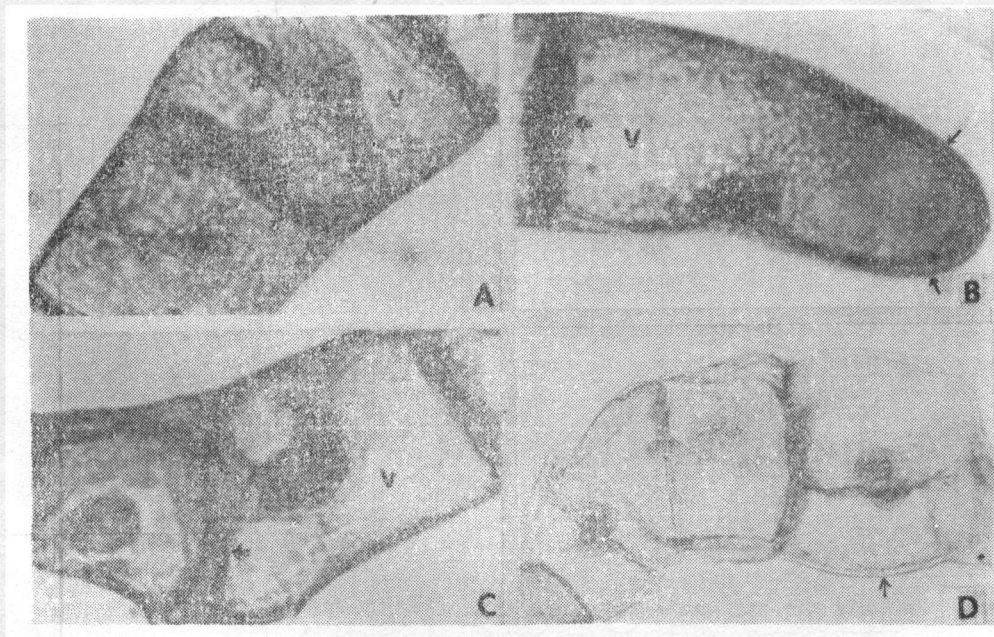


图3 烟草愈伤组织游离细胞CaM定位结果

- A 示两细胞相邻一侧(↓),环流沟(↓)处原生质及核与核仁(▽)染色 ×132
 B 示原生质“帽状”染色(↓);液泡(V)不染色 ×132
 C 示液泡(V)不染色;其它同A ×132
 D 对照,正常兔血液代替CaM抗体 ×132

讨 论

文献报道〔5, 6〕, CaM由于分子量小,保守性强,因而抗原性弱,难于诱导产生抗体。国内外大多数实验室采取DNB、过甲酸修饰,或用接上一个大分子量蛋白(如牛血清白蛋白)的方法来制备CaM抗体。我们用未经修饰过的小麦CaM,免疫了两只兔子,都于两个月左右产生较高滴度的抗体。这就证明利用天然植物CaM制备CaM抗体是可行的,且使得抗体制备简化。此外,我们获得的小麦CaM抗体,可以与多种植物产生交叉反应,而几乎不能与牛脑CaM产生交叉反应(或很弱)。这与Harper〔1〕的结果类似。这使我们设想植物天然CaM产生的抗体,对植物CaM专一性较强,可以更好地运用于植物CaM的定位及定量工作之中。

在植物方面, 蛋白质免疫组化定位的工作主要采取荧光标记二抗的方法〔7, 8〕。酶标二抗方法因为植物组织内源过氧化物酶活性较高, 常常难于在保存抗原性前提下加以完全抑制, 因此染色背景往往不易做到完全均一无色, 难度较大。但与荧光抗体法比较, 它有无需特殊设备(如荧光显微镜), 切片可以保存, 特别是可以将组织染色良好部位切取下来, 进一步做免疫电镜观察的优点。在我们的酶标法定位烟草愈伤组织细胞核的实验中, 显示植物细胞核含有CaM, 这与Dauwalder〔8〕用荧光抗体法做出的结果一致, 而且文献中也已报道过核内CaM的功能(Polya等, 1982; Chen和Roux等, 1987)。本研究证实愈伤组织细胞核仁中CaM含量很高, 属首次报道; 而且过去我们用三氟拉嗪(TFP)荧光法也曾得到同样结果(尚未发表)。核仁中CaM是否参与某些功能调节, 国内外未见报道, 值得作进一步研究。

参 考 文 献

- 〔1〕 Harper, J.F.: Antigenic structure of calmodulin: Production and characterization of antiserum specific for plant calmodulin or Ca^{2+} -replete vs Ca^{2+} -free calmodulins. *J. Cyclic Nucl. Prot. Phos. Res.*, 1983(9): 3—17
- 〔2〕 Muto, S and S. Miyachi: Production of antibody against spinach calmodulin and its application to TIA for plant calmodulin, *Z. Pflanzenphysiol. bd.*, 1981 (114): 421—431
- 〔3〕 Lin, C.T. et al: Calmodulin: Localization in plant tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1986 (34): 561—567
- 〔4〕 Biro, R.L. et al: Characterization of oat calmodulin and RIA of its subcellular distribution. *PL. Physiol.*, 1984 (75): 382—386
- 〔5〕 Muto, S.: Distribution of calmodulin within wheat leaf cells. *FEBS Lett.*, 1982(147): 161—165
- 〔6〕 Wallare, R.W. and W.Y. Cheung: Production of an antibody in rabbit and development of a radio-immunoassay. *J. Biol. Chem.*, 1979 (245): 6564—6571
- 〔7〕 Wick, S.M. et al: Double immunofluorescence labelling of calmodulin and tubulin in dividing plant cells. *Protoplasma*, 1985 (126): 198—206
- 〔8〕 Dauwalder, M.A. et al: Distribution of calmodulin in pea seedlings: Immunocytochemical localization in plumules and root apices. *Planta*, 1986 (168): 461—470

Production of Antibody against Wheat Native Calmodulin and Its Application to Enzyme Labelled Immunohisto-Chemistry

Cheng Zhihui¹ Bai Juan² Shi Dawei¹ Sun Daye²

(1. *Department of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding*)

(2. *Department of Life Sci., Hebei Normal University, Shijiazhuang*)

Abstract

Calmodulin (CaM) from wheat coleoptile was purified and unmodified. Native CaM was used to induce antibody against wheat CaM. Assay of immunological characteristics of the antibody obtained showed that the antibody against wheat CaM almost could not cross-react with bovine brain CaM, but could do with CaM from a number of kinds of plants. This showed that antibody obtained was specific for CaM from plants. Localization in cultured tobacco cells with enzymelabelled immunohistochemistry showed that there was more CaM in cytoplasm, but the nuclei, especially nucleoli, also contained CaM. The significance of localization was discussed in the paper.

Key words: Wheat; Calmodulin; Antibody against wheat CaM; Immunohistochemistry