

班级：整合科学综合实验课程 2

学号：2200017797

姓名：侯书洋

实验名称：拟南芥中的植物生殖发育探究

实验日期：2023 年 11 月 17 日

一. 实验目的与流程:

实验目的：掌握基本人工授粉操作，学习常用的对花粉管萌发过程中显微表征的方法。

实验流程：

1. 在显微操作台面上，以 LAT-GUS 植株为父本，对去雄的野生型母本进行人工授粉；
2. 分别取授粉后 6h、36h 的雌蕊进行 GUS 染色和苯胺蓝染色，显微观察花粉管形态。

二. 实验原理:

(一) GUS 染色:

GUS(β -glucuronidase, β -葡萄糖苷酶)基因存在于 E.coli 等一些细菌的基因组中，其表达产物 GUS 可以催化许多 β -葡萄糖苷酯类物质的水解。由于在绝大多数植物体中没有检测出 GUS 的内源活性，所以 GUS 基因常用作对植物基因调控研究中的报告基因(Reporter gene)。

将 GUS 基因与花粉特异性启动子 LAT52 构筑成的 LAT-GUS 基因表达元件转入拟南芥中，筛出具有纯合的(对二倍体而言)LAT-GUS 基因的植株，从而获得实验中父本。

5-溴-4-氯-3-吲哚- β -葡萄糖苷酸酯(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide, 缩写 X-Gluc.)在植物组织中不显色；GUS 可以将 X-Gluc.分解释放出基团 X，X 经过二聚化形成类似靛蓝的分子结构，由此在显微镜的亮场下显蓝色。

(二) 苯胺蓝染色:

苯胺蓝(Aniline Blue, 简称 AB)染色是植物组织学中常见的染色方法，对花粉管壁、胼胝质壁等结构有较好的亲和力，附着后苯胺蓝可以在 UV 激发光下产生黄绿色的荧光。由此，苯胺蓝染色可以较为清晰地表征花粉管等植物组织的结构。

三. 实验内容:

(一) 拟南芥的人工授粉与取材:

1. 在显微操作台上，利用解剖镊对野生型的拟南芥植株去雄(注意选择花苞尚未打开但已露出白花瓣的花朵)，将其作为母本；
2. 利用解剖镊摘取 LAT-GUS 拟南芥植株成花(注意选择刚刚开放、状态良好的花)中的雄蕊作为父本，对已去雄的野生型拟南芥母本进行人工足量授粉；
3. 分别在授粉后 6h、36h 对母本进行取材：在显微操作台上用解剖镊取出人工授粉花朵中的雌蕊，并分别将样品置于 90%丙酮中固定；冰上放置 30 min 或者 4℃下过夜；

(二) 授粉样品的 GUS 染色:

1. 取出保藏的样品，吸出样品中丙酮并加入磷酸缓冲液(PBS)，冰上放置 15 min 后再吸出；共重复该 PBS 换液操作 3 次；
2. 吸出样品中 PBS 并加入 GUS 染液(含有 X-Gluc.)，在 37℃恒温箱中避光染色；(Noted: 可以先抽真空促进 GUS 染液进入植物组织；染色过程中勤观察避免过染色)
3. 观察到大部分植物组织成功着色后停止染色，回收 GUS 染料并加入 70%乙醇。

(三) 授粉样品的苯胺蓝染色:

1. 对 GUS 染色后的样品进行梯度换液：吸出样品中的液体后，依次加入 50%乙醇、30%乙醇、蒸馏水，在每次换液后常温放置 15 min；
2. 吸出样品中的蒸馏水，加入 8 M 氢氧化钠溶液过夜软化；
3. 吸出样品中氢氧化钠溶液，加入蒸馏水后常温放置 10 min；共重复水洗操作 3 次；

4. 吸出样品中的蒸馏水，加入苯胺蓝溶液，避光染色半天以上后即可上镜观察；
(Noted: 染色样品可以在 4°C 冰箱中保藏)

(四) 样品的显微观察:

1. 分别取出授粉后 6h、36h 取材的样品，在载玻片上滴加蒸馏水后制片；

(Noted: 压片操作时让雌蕊心皮的腹缝线(ventral suture)朝上露出，便于心皮组织压向两侧)

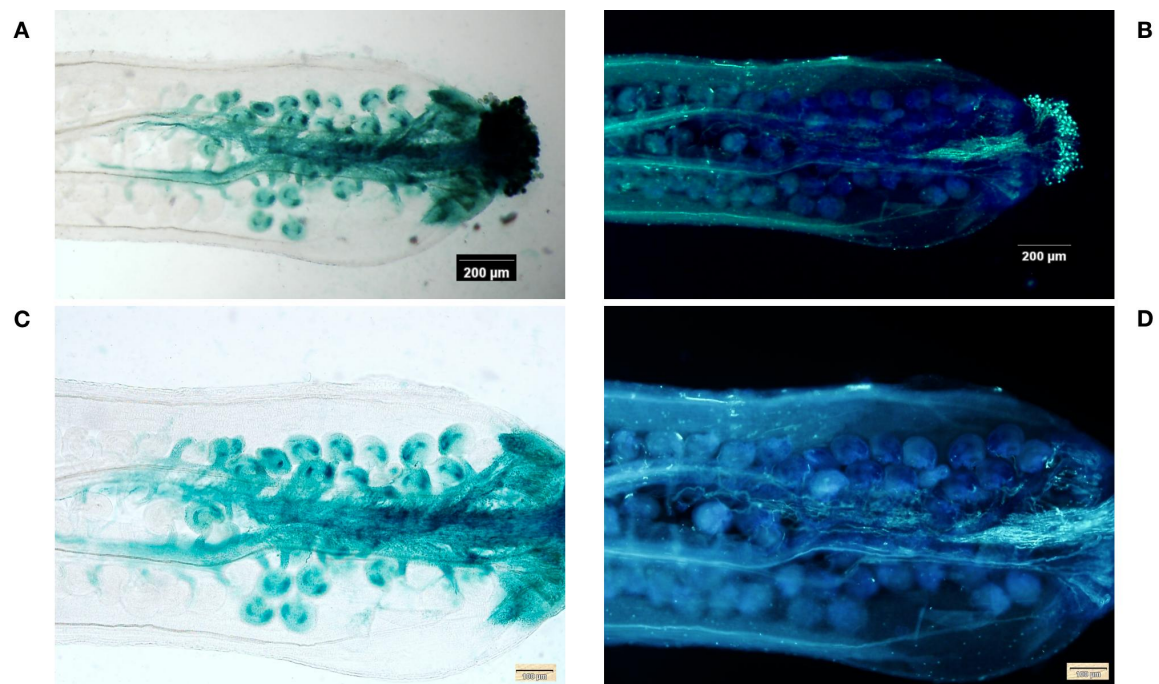
2. 制片后，在亮场下分别利用 x4、x10 物镜观察雌蕊组织的 GUS 染色结果并记录；

3. 再利用紫外光激发的荧光显微镜，分别在 x4、x10 物镜下观察雌蕊组织的苯胺蓝染色结果并记录；

4. 整理显微操作室实验桌面，做好相应实验记录。

四. 实验结果与讨论:

下图 (Pic. 1) 是对授粉后 6h (6-HAP)雌蕊组织分别在 x4、x10 物镜下观察亮场中 GUS、荧光场中 AB 的染色情况:



Pic. 1: 6-HAP 雌蕊组织 x4、x10 物镜下 GUS、AB 着色表征

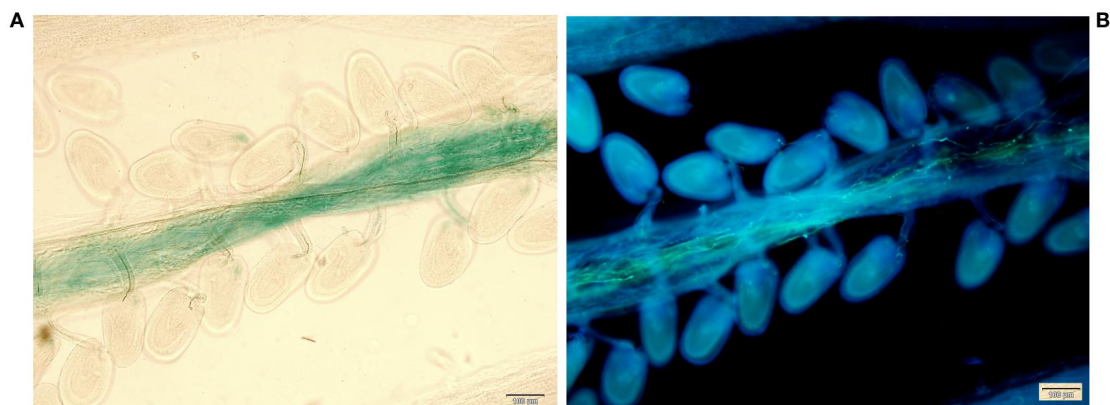
(A: x4 物镜下 6-HAP GUS 染色情况 B: x4 物镜下 6-HAP AB 染色情况

C: x10 物镜下 6-HAP GUS 染色情况 D: x10 物镜下 6-HAP AB 染色情况)

从 Pic.1 图 B 中, 可以清晰看到花粉粒在雌蕊柱头上着附以及后续花粉管的萌发情况(均被染成亮蓝色), 说明实验中所用过量授粉的花粉活性正常。对比 Pic. 1 图 C、D, 图 C 中被 GUS 着色的胚珠在图 D 原位有相应的花粉管进入。此外, 整体上观察, 授粉后 6h 的雌蕊组织中花粉管萌生长度大约为整个花柱长度的一半。

值得指出的是, Pic. 1 对雌蕊组织的制片操作不好, 可以看到图中花柱上腹缝线只是微微张裂, 心皮组织未向两边完全展开。制片的不标准也是观察染色时对结果表征困难的原因: x4 倍镜下柱头区域染色过深、细节不明显, 这可能是该区域样本厚度过大、组织间出现重叠; x10 倍镜下荧光场难以观察花粉管 AB 染色情况, 这可能是由于上方心皮组织的遮挡。

下图 (Pic. 2) 是对授粉后 36h (36-HAP)雌蕊组织在 x10 物镜下观察亮场中 GUS、荧光场中 AB 的染色情况:



Pic. 2: 36-HAP 雌蕊组织 x10 物镜下 GUS、AB 着色表征

(A: x10 物镜下 36-HAP GUS 染色情况 B: x10 物镜下 36-HAP AB 染色情况)

Pic. 2 图 A 中, 可以观察到胚珠的珠孔位置有点状的 GUS 着色, 同时在 Pic. 2 图 B 中也可以清晰地观察到有单个花粉管沿组织进入相应着色的胚珠内。

此外, 对比 Pic. 1 图 C、D 和 Pic. 2 图 A、B, 可以较明显观察 36-HAP 雌蕊组织中的受精胚珠比 6-HAP 雌蕊组织中的受精胚珠在形态上更为膨大饱满。从整体上观察, 授粉后 36h 的雌蕊组织中花粉管萌生长度大约与整个花柱长度相当。

五. 实验要点与总结:

1. 在植物组织 GUS 染色操作中, 磷酸缓冲液(PBS)通常需要加入亚铁盐(Fe^{2+}); 因为 Fe^{2+} 利于发色基团 X 二聚体的原位(in situ)沉淀, 减少因为扩散作用产生的背景噪音, 提高 GUS 染色的组织特异性;

2. 拟南芥可以进行自花、闭花授粉, 因此去雄时母本应选择花苞尚未开放的花朵: 就经验性而言, 一般自花顶起向下数第 2-3 个、露出白色花瓣的花苞符合去雄要求;

3. 显微镜相机记录时操作细节:

- 可以旋转显微镜上的相机, 从而让观测对象处于图像中合适的角度;
- 保存图像前注意核查是否正确印入对应物镜镜头的比例尺信息;
- 显微成像时亮场、荧光场的曝光时间一般都在 ms 量级;
- 记录 AB 染色情况时, 注意区分珠柄微观组织和花粉管的结构差别。

4. 关于 GUS 与 AB 双染色法:

亮场下观察 GUS 染色, 可以确定转入 LAT-GUS 基因的特定花粉(通常也是实验研究的对象)在授粉后花粉管在雌蕊组织中经历的位置以及是否进入某个特定的胚珠中。

荧光场下观察 AB 染色, 可以观察到所有授粉后萌发的花粉管的形态特征、花粉管是如何进入某个胚珠、某个特定胚珠中进入了几个花粉管等更细节的信息。

利用 GUS、AB 双染色, 采用定量授粉的方式, 可以较好地定量研究转入 LAT-GUS 基因的花粉 A 与未转入 LAT-GUS 的花粉 B 之间的竞争情况; 特别的, 如果已知花粉 B 的活性(如花粉 B 就是野生型), 则可以定量地衡量花粉 A 的活性。

5. 关于 GUS、AB 染色中的组织软化:

对雌蕊组织软化是保障之后显微镜下可以正常观察染色结果的必要操作。一般而言, 授粉后 6h 的雌蕊组织经 8 M 氢氧化钠溶液软化后呈半透明胶状, 授粉后 36h 的雌蕊组织经 8 M 氢氧化钠溶液软化后透明度略差。未成功软化的雌蕊组织难以在压片中分离心皮组织。