

# 焦锑酸钾沉淀法在百合花柱钙分布研究中的应用

闫京艳, 唐道城, 巨秀婷, 张永玉, 马巧玲

(青海大学 高原花卉研究中心, 青海 西宁 810016)

**摘 要:**以百合为试材,研究了焦锑酸钾沉淀法用于定位百合花柱钙分布的条件和效果及固定液的 pH 值对固定效果的影响。结果表明:焦锑酸钾沉淀法准确稳定,样品经含焦锑酸钾的固定液处理后钙沉淀颗粒非常明显,易于识别;而固定液中未添加焦锑酸钾的对照中则不存在黑色钙沉淀颗粒;固定液 pH 为 7.0~7.6 时细胞结构清晰度较 pH 为 6.8 好,该范围内不同的 pH 值对固定效果的影响不是很明显。

**关键词:**百合;钙分布;焦锑酸钾沉淀法

**中图分类号:**Q 949.71<sup>+</sup>8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0078-03

钙作为钙信使系统的重要组成部分,在生命活动的各个方面,如细胞分裂、分化、凋零等微观细胞水平<sup>[1-2]</sup>和植物生长发育、受精结实<sup>[3-4]</sup>等宏观现象中,都发挥着重要的调控功能。钙信号的发生是基于钙离子浓度在时空上的变化,研究其在特定生命活动中、特定组织内的动态分布,是了解其信号传递机制、揭示其生理生化调控功能和作用的基础。

授粉受精是植物生命活动的重要内容,也是常规杂交育种、制种成败的关键。自交不亲和、远缘杂交不亲和等受精障碍是杂交育种中普遍存在的问题,也是众多育种家研究工作的重要内容。钙在植物授粉受精过程中同样承担着重要的调控功能<sup>[3-4]</sup>,与受精障碍的形成必然有一定的联系,因此,研究植物授粉前后柱头和花柱中的钙分布变化,了解其在受精生理中的作用是揭示受精障碍的形成机理和探索新的受精障碍解决办法的基础和关键。近年来,Polito<sup>[5]</sup>、Reiss 等<sup>[6-7]</sup>、Yu 等<sup>[8]</sup>、Zhao 等<sup>[9]</sup>以及谢潮添等<sup>[10]</sup>很多国内外科学家运用荧光测定法和焦锑酸钾沉淀法等在这方面做了大量的工作,除尚忠林等<sup>[11]</sup>在百合花粉细胞上的研究外,钙在百合受精生理中的作用国内尚少有研究。百合作为园林植物育种的重要对象,受精障碍在其杂交育种中表现十分典型,研究钙在其授粉受精过程中在柱头和花柱中的分布变化具有重要意义。该研究旨在探索焦锑酸钾沉淀法用于定位百合花柱钙分布的条件和效果,为解决授精障

碍奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以刚开放的百合花朵为试材。供试仪器为透射电子显微镜、超薄切片机、恒温箱、强通风橱、电炉等。

前固定液:用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液( $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ )配制,含 2.5%戊二醛和 1%焦锑酸钾,pH 分别为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6。后固定液:用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制,含 1%锇酸和 1%焦锑酸钾,pH 分别为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6。冲洗液:用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制,含 1%焦锑酸钾,pH 分别为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6。脱水剂:分析纯丙酮。Spurr 低粘性包埋树脂:使用前按照 Spurr 低粘性包埋树脂的标准配方<sup>[12]</sup>进行配制,性能选择软即可。其中,VCD 10.0 g,增塑剂 DER-736 7.0 g,固化剂 NSA 26.0 g,催化剂 DMAE 0.4 g。以上 4 种成分各有其功能,使用时可根据需要适当调节。

### 1.2 试验方法

取百合花柱头和花柱,将花柱纵向分割为 2 mm 长的小段,每小段再纵切,使样品的体积尽量小,分割动作要迅速,并且保证样品浸没在前固定液中。分割好的样品立即投入盛有前固定液的青霉素小瓶中室温进行 4 h 的前固定,冲洗液冲洗 4 次,每次 30 min,之后加入后固定液 4℃冰箱中进行 3 h 的后固定,再次用冲洗液冲洗 4 次,每次 30 min。完成后进入丙酮梯度脱水,丙酮浓度为 30%、50%、70%、80%、90%、95%,处理时间为 20 min,100%丙酮处理 3 次,每次 15 min。渗透时,丙酮与树脂的比例和处理时间分别为:3:1×4 h、1:1×12 h、1:3×12 h、0:1×24 h。包埋时,处理温度和时间分别为 37℃×12 h、45℃×12 h、60℃×24 h。包埋块进行剖整后,用超薄切片机先粗切成 3 μm 厚的切片,用

**第一作者简介:**闫京艳(1988-),女,硕士研究生,现主要从事园林植物遗传育种等工作。E-mail:yanjingyan@163.com.

**责任作者:**唐道城(1954-),男,硕士,教授,博士生导师,现主要从事高原花卉研究等工作。E-mail:tangdaocheng6333@163.com.

**基金项目:**青海省科技厅科研资助项目(2011-H-806)。

**收稿日期:**2013-09-06

1%甲苯胺蓝染色,在光学显微镜下确认已到达所需观察的部位后再切成 70 nm 左右的超薄切片,经染色后置于透射电子显微镜下观察拍照。作为对照的样品在处理中,固定液和冲洗液 pH 定为 7.2,除用到的试剂均不含焦锑酸钾外,其它处理均与上述方法相同。

由于不同文献中在运用此方法时所用固定液和冲洗液的 pH 都有一定差别<sup>[13-15]</sup>,且百合材料的电镜试验文献中也没有相对一致的结论<sup>[16-17]</sup>,该试验为确定固定效果最好的试剂 pH 值,设定了 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6 共 5 个处理。试验过程中分别将样品固定在不同 pH 的前固定液中,并分别使用相应 pH 的后固定液和冲洗液。

## 2 结果与分析

### 2.1 钙离子的检测效果

将样品超薄切片置于透射电镜下进行观察,对比处理样与对照样,钙离子的检测效果十分明显。从图 1-1 和图 1-4 可以看出,在处理样的照片中,黑色的沉淀颗粒

清晰可辨,形状不规则,大小在 40 nm 左右,质感突兀,与细胞内其它结构和物质明显不同。而对照样在电镜下均观察不到这样的黑色突兀颗粒,整个视野中图像呈现均一自然的灰白色。这种因焦锑酸钾处理而产生的黑色沉淀颗粒通过能谱、EGTA 处理等手段已经被证明是焦锑酸钾中的钾离子被细胞内游离钙离子替换而产生的焦锑酸钙沉淀<sup>[15,18]</sup>。试验表明,焦锑酸钾沉淀法用于定位百合花柱中的游离钙离子,结果明显可靠,可以在后续的深入研究中采用。

### 2.2 固定液及冲洗液不同 pH 值对固定效果的影响

该试验中 5 组处理分别采用相应 pH 值试剂进行处理。包埋后,分别经超薄切片机切片并在透射电镜下进行对比观察。由图 1-2~1-6 可知,在试验所设 pH 范围内,不同的 pH 值对固定效果影响不是很大。但 7.0~7.6 范围内细胞结构的完整性和清晰度稍好于 6.8,而彼此差异不明显。

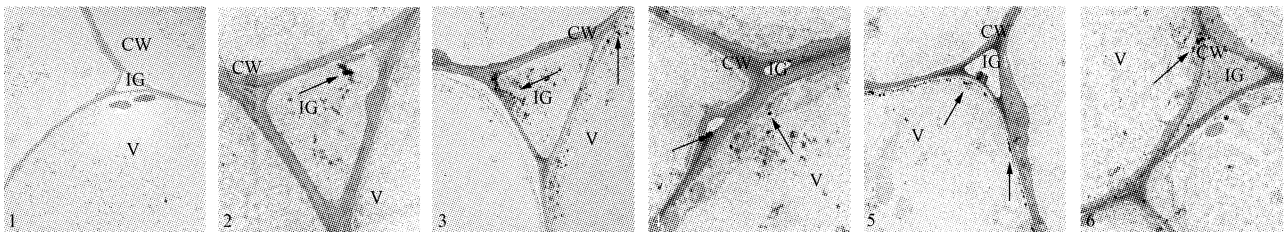


图 1 不同处理百合花柱细胞 TEM 观察结果

注:1. 制样过程中未使用焦锑酸钾进行处理,处理液 pH=7.2,×4 000;2. 制样过程中进行了焦锑酸钾处理,处理液 pH=6.8,×15 000;3. 同 2,处理液 pH=7.0,×10 000;4. 同 2,处理液 pH=7.2,×12 000;5. 同 2,处理液 pH=7.4,×8 000;6. 同 2,处理液 pH=7.6,×8 000。细胞壁: CW;细胞间隙: IG;液泡: V;钙沉淀颗粒: 如箭头所示。

Fig. 1 TEM observation results of cells of lily style under different treatments

Note: 1. Fixed in solutions without potassium pyroantimonate, pH 7.2, ×4000; 2. Fixed in solutions containing potassium pyroantimonate, pH 6.8, ×15 000; 3. The same as 2, pH 7.0, ×10 000; 4. The same as 2, pH 7.2, ×12 000; 5. The same as 2, pH 7.4, ×8 000; 6. The same as 2, pH 7.6, ×8 000. Cell Wall: CW; Intercellular Gap: IG; Vacuole: V; Calcium Granule: Showed by arrows.

## 3 讨论与结论

组织内钙的分布及其生理调控功能一直是众多科学家研究的重点,大量工作都集中在对花药和胚囊发育、花粉萌发和花粉管伸长、受精过程等的研究中,其中也涉及对授粉前后柱头和花柱中钙的动态分布情况的研究,但在百合上较少见过此类报道。柱头是花粉萌发的场所,花柱作为花粉管伸长生长的途径,与花粉识别及伸长过程中的信号传导有密不可分的联系,对于深入揭示钙在授粉受精生理中的调控功能和机制具有重要作用和意义,因此,这方面的研究也不容忽视。

目前,用于研究植物组织钙浓度的试验手段有很多,如原子吸收光谱法、离子选择性微电极法、X 射线微区分析法、同位素示踪法及核磁共振波谱法等<sup>[19]</sup>。但因检测精度和实现条件难易等的限制,应用于钙分布定位的主要有 2 种:荧光测定法和焦锑酸钾沉淀法。这 2 种

方法各有利弊,荧光测定法可以在同一时间对组织整体进行钙分布的荧光检测,可以方便的从宏观把握钙的分布变化和差异,例如,Reiss 等<sup>[6-7]</sup>在麝香百合花粉管生长的研究中利用荧光测定法清晰地看到从花粉管顶端至基部呈现逐渐减少的钙的分布趋势。但该方法只适用于较小体积组织的整体观察,不能实现亚细胞水平上的精确定位,且技术要求比较高,试验结果容易受到各种因素的干扰而很不稳定,如染料的区室化、光漂白、渗漏和对  $\text{Ca}^{2+}$  的缓冲,以及 AM 酯不完全水解、细胞的自发荧光、pH 变化、淬灭剂的干扰等<sup>[20]</sup>。而焦锑酸钾沉淀法恰好可以弥补其不足,其观察范围虽小,但可以清晰地检测出细胞内不同部位钙的分布和含量,而且结果稳定,不易受外界条件的干扰。因此,必要时将 2 种方法相结合,可以在很大程度上提高试验结果的可靠性。

该试验中,处理液的 pH 在 7.0~7.6 的范围内细胞结构的完整性和清晰度比 6.8 要好,但该范围内对试验

结果影响不是特别明显。这只是针对该试验的研究要求而言,如果要研究细胞内更加精细的结构和变化,还应该做更加细致的甄选。Yu 等<sup>[8]</sup>和杨淑娟等<sup>[13]</sup>在应用此法时也多选用碱性处理液,与该试验的研究结果相对一致。另外,焦锑酸钾沉淀法用于植物组织钙离子分布的定位虽结果稳定,但因钙沉淀颗粒体积小,体积变化大,形状不规则,分布无明显规律等,给试验结果的数据统计和分析带来很大困难。许多文献在报道中仅仅通过展示图片表现钙沉淀的含量,没有用具体的数字。彭抒昂<sup>[15]</sup>提出可计算所呈现的黑色钙颗粒在固定部位(如细胞核中)的单位面积( $1 \mu\text{m}^2$ )的个数,即可得出其密度变化,但事实上沉淀颗粒在细胞间和细胞内部分布极不均匀,颗粒大小变化大,部分可呈絮状或线状,难以通过计数准确地确定其含量。因此,如何更方便更合理的进行数据统计,是实现焦锑酸钾沉淀法用于钙离子动态分布研究的另一问题,需要尽快解决。

### 参考文献

- [1] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46: 95-122.
- [2] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium[J]. Plant Cell, 1999, 11: 691-706.
- [3] 吴志华, 郑伟文, 庄伟建. 钙、钙调蛋白与植物的有性生殖[J]. 福建农业学报, 2002, 17(4): 244-247.
- [4] 田惠桥, 远彤. 钙在被子植物受精过程中的作用[J]. 植物生理学报, 2000(26): 369-380.
- [5] Polito V S. Membrane-associated calcium during pollen grain germination: a microfluorometric analysis[J]. Protoplasma, 1983, 117: 226-232.
- [6] Reiss H D, Herth W. Visualization of  $\text{Ca}^{2+}$  gradient in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum* with chlorotetracycline fluorescence[J]. Protoplasma, 1978, 97: 373-377.
- [7] Reiss H D, Herth W, Nobiling R. Development of membrane and calcium gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum* [J]. Planta, 1985, 163: 84-90.
- [8] Yu F L, Zhao J, Liang S P, et al. Ultracytochemical localization of calcium in gynoecium and embryo sac of rice[J]. Acta Bot Sin, 1999, 41: 125-129.
- [9] Zhao J, Yu FL, Liang S P, et al. Changes of calcium distribution in egg cells, zygotes and two-celled proembryos of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Sex Plant Reprod, 2002, 14: 331-337.
- [10] 谢潮添, 杨延红, 邱义兰, 等. 白菜核雄性不育两用系可育和不育花药中  $\text{Ca}^{2+}$  的分布[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(6): 615-624.
- [11] 尚忠林, 马力耕, 王学臣, 等. 细胞外钙调素对百合花粉细胞内钙离子浓度的影响[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 12-17.
- [12] 张丰德, 王秀玲. 现代生物学技术[M]. 天津: 南开大学出版社, 2001: 52-76.
- [13] 杨淑娟, 宋玉霞, 田惠桥, 等. 枸杞花药发育过程中钙的分布[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(6): 516-526.
- [14] 邓芳, 史银连, 姚家玲. 光敏核不育水稻花药中  $\text{Ca}^{2+}$  分布及其与花粉育性的相关性研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 809-815.
- [15] 彭抒昂. 焦锑酸钾沉淀法定位  $\text{Ca}^{2+}$  在梨生理研究中的应用[J]. 果树学报, 2001, 18(3): 140-144.
- [16] 张彦妮, 钱灿. 12 种百合属植物花粉形态扫描电镜观察[J]. 草业学报, 2011, 20(5): 111-118.
- [17] 刘选明, 何立珍, 周朴华, 等. 百合鳞叶细胞形态发生中胚性细胞的电镜观察[J]. 湖南农业大学学报, 1997, 23(1): 30-35.
- [18] Wick S M, Hepler P K. Selective localization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with potassium antimonite[J]. J Histochem Cytochem, 1982, 30: 1190-1204.
- [19] 郭琼杰, 孙淑娟. 细胞内游离钙离子的测定方法[J]. 食品与药品, 2006, 8(12): 25-27.
- [20] 张国增, 李瑞玲, 王强. 荧光染料在植物细胞  $\text{Ca}^{2+}$  浓度测定中的应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 198-201.

## Application of Potassium Pyroantimonate Precipitation on Calcium Distribution in the Style of Lily

YAN Jing-yan, TANG Dao-cheng, JU Xiu-ting, ZHANG Yong-yu, MA Qiao-ling  
(Plateau Flower Research Center, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

**Abstract:** Using lily as material, the conditions and the effects of potassium pyroantimonate precipitation technique to be used to localize calcium in the style of lily, as well as the influences of fixative solutions with different pH were studied. The results showed that calcium precipitates were so obvious in sample sections dealt with in fixative solutions containing potassium pyroantimonate and could be recognized easily under TEM, while no such calcium precipitate particles could be found in the treatment without potassium pyroantimonate. And the cell structure clarity of samples fixed in solutions with pH differing from 7.0 to 7.6 was relatively better than that fixed in solutions with pH 6.8, although no significant differences were found among this range.

**Key words:** lily; calcium distribution; potassium pyroantimonate precipitation