



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108195801 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201711146160.7

(22)申请日 2017.11.17

(71)申请人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路35号

(72)发明人 李晓娟 崔亚宁 林金星

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

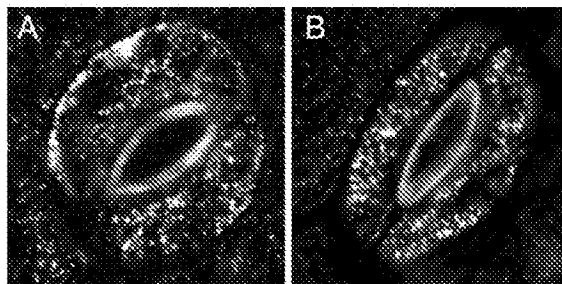
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

单分子水平观测气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法

### (57)摘要

单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,涉及生物技术领域。该方法包括以下步骤:A、获得荧光标记目的基因的转基因材料;B、以全内反射荧光显微镜获取保卫细胞膜蛋白的实时影像;C、通过Image J软件将所得时间序列图像进行处理;D、通过Matlab R2014a对目的蛋白进行单颗粒追踪分析,确定单个蛋白聚合体的动态;E、计算气孔保卫细胞膜蛋白在细胞质膜上的停留时间;F、对目的蛋白的停留时间参数进行高斯拟合,确定目的蛋白的停留时间及变化。此方法具有提高成像的信噪比,可进行高分辨率的观测,成像速度快,活体可视化及可重复性高的优点。本发明在植物基因功能研究中具有实际应用价值。



1. 一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,包括以下步骤:

A步骤、将目的蛋白的基因插入到表达载体中,与编码荧光标记蛋白的基因融合,通过农杆菌侵染得到转基因植株,在所述转基因植株中实现对目的蛋白的荧光标记;

B步骤、使用100X、数值孔径为1.45的镜头,滴加镜油,调节488nm激光入射角度数值为1.325,调节激光强度到物镜出口激光强度为1mW;在此物理条件下,曝光时间为100ms,电子增益为300,用20Hz频率对样品进行时间序列成像,每两帧图像之间时间间隔为0,获得连续的时间序列图像200帧;

C步骤、对所获得的时间序列图像进行Subtract Background处理;

D步骤、对所获得的时间序列图像进行单颗粒追踪,应用软件Matlab R2014a,获得每个时间点的图像中每个荧光点的坐标信息以及荧光强度信息,综合时间和荧光点坐标信息,计算目的蛋白的运动轨迹;

E步骤、综合时间和荧光强度信息,对目的蛋白的停留时间动态进行分析;

F步骤、对气孔保卫细胞膜蛋白停留时间进行高斯拟合。

2. 根据权利要求1所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述A步骤中以转基因植株拟南芥种子置于滤纸上,将85%乙醇和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>配比为3:1的消毒液洒到拟南芥种子上,待种子表面的消毒液干后,将所述种子播种于含1/2MS固体培养基上;将培养皿放于4℃冰箱进行春化,春化24h后拿出,置于智能光照培养箱中进行培养,培养温度为22℃,光照条件为16小时光照/8小时暗培养循环;在载玻片上滴加培养基溶液,将拟南芥幼苗置于载玻片上,然后加盖普通盖玻片;盖玻片与载玻片之间充满溶液但无气泡。

3. 根据权利要求1或2所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述A步骤中首先通过PCR扩增目的基因,通过双酶切、连接的手段将目的基因插入到表达载体pCM2300中,最后通过农杆菌侵染得到具有荧光标签的转基因材料。

4. 根据权利要求1或2所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述A步骤中目的蛋白为植物保卫细胞膜上表达的功能蛋白,所用载体为植物双元表达载体,种植转基因植株的培养皿需要直立放置,使植物根完全垂直地面生长,便于全内反射荧光显微镜观察。

5. 根据权利要求2所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述A步骤中在载玻片上滴加50μL 1/2Murashige-skoog培养基溶液,将生长3-5天的转基因材料幼苗置于载玻片上,将叶片远轴面贴近载玻片;所述载玻片的折射率为1.52。

6. 根据权利要求1或2所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述B步骤中,激发光的激发波长为488nm,收集波长为525nm;设定曝光时间100ms,EM Gain为300倍,频率20Hz对样品进行连续成像。

7. 根据权利要求1、2或5所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述C步骤中,对由所述B步骤所得到的图像运用小波变换算法处理进行背景去除,通过计算荧光点周围3×3个像素的局部极大值得到亚像素精确值,

计算出荧光点的权重重心而确定荧光点的位置;借助Image J 1.48进行蛋白分布的分析;在ImageJ软件中打开绿色通道图像,选择process→Subtract Background-设置“Rolling Ball Radius”设置为25Pixels;运行Image→Adjust→Brightness/Contrast,调整图像的亮度和对比度,设置JPEG Quality为100,然后将图像均另存为TIFF格式。

8. 根据权利要求1、2或5所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述D步骤中,在Matlab R2014a软件中,启动“fusion”插件,File→Open…打开完好无损的TIFF图片,在“Control panel”对话框中,设定wavelet为3, w2,点击“Select ROI”选择想要分析的区域,点击“Find particles”选中了所要追踪的对象;对目标蛋白追踪的参数设置为,点击“Track”,出现的“input for process”对话框,其中gap值输入6,运动范围根据蛋白的运动特征,最小半径输入1,最大半径输入3,点击确定按钮;Tracking finished完毕后,点击Matlab R2014a中“fusion”插件的“Tracking→View tracking result”;在“View tracking”进行“Edit track”,点击save,对追踪的结果进行保存。

9. 根据权利要求1、2或5所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述D步骤中通过连续追踪荧光信号,保卫细胞膜蛋白在膜上呈现高度动态,不断地出现和消失,取停留大于2帧的荧光点用于进行膜上停留时间分析;所述E步骤中,从荧光分子在焦平面上出现到完全消失,所持续的帧数,与曝光时间和拍摄时间间隔进行相应的换算,计算出荧光分子的停留时间。

10. 根据权利要求1、2或5所述的一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,其特征在于:所述F步骤中,追踪后的图像进行分析,点击Matlab R2014a中“fusion”插件的“Analysis→tracking based→lifetime”,然后点击“File→export→last analysis data”,导出数据;将导出的Excel数据在Origin进行高斯拟合,右击“Frequency count”,间隔为0.5,然后“Analysis→Fit Exponential”对其进行指数拟合,在拟合的过程中要求拟合系数 $R^2$ 大于0.99。

## 单分子水平观测气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种单分子水平实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法。

### 背景技术

[0002] 气孔是植物与外界环境进行气体和水分交换的门户,控制着光合作用吸收CO<sub>2</sub>、水分蒸发,在植物的生命活动中具有重要作用。形成气孔的保卫细胞通过感知环境刺激,调控气孔的关闭与开合。特别是在气孔保卫细胞膜上定位的蛋白,在感受外界环境以及调控气孔应答生物和非生物胁迫中具有重要功能。然而,以往对保卫细胞中蛋白的研究,主要是利用光学显微镜在突变体等遗传材料中对植物气孔开度进行测量。这种方法仅是把气孔作为一个整体进行研究,不能对保卫细胞膜蛋白进行直接分析。特别是,不能对感受刺激后保卫细胞膜蛋白的动态特征进行实时检测分析。

[0003] 已有研究报道,细胞膜是一个非均相的高度动态的生物学体系,因此质膜蛋白的时空动态必然与很多基础细胞学过程密切相关。但是,植物的保卫细胞存在细胞壁厚、自发荧光强,容易对最终数据产生干扰,以及长时间照射造成的细胞光损害和光漂白等都可能对分子动力学的测量产生影响。特别是保卫细胞与叶表皮细胞不在同一平面,导致成像困难。

[0004] 现有技术中缺少一种实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布的方法,尤其缺少一种高分辨率并且能够快速对气孔保卫细胞膜蛋白分布进行动态观测的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布和动态的方法,尤其是提供一种高分辨率实时观测气孔保卫细胞膜上蛋白分布、运动和停留时间的方法。

[0006] 具体包括以下步骤:

- (1) 获得带有荧光标签的转基因植株;
- (2) 用全内反射荧光显微镜,选择标记荧光蛋白所对应波长的激发光对由步骤(1)所得转基因植株进行观察,调整激光入射角度,在细胞壁与细胞膜之间发生全内反射,并获得时间序列图像;
- (3) 应用Image J 1.48软件对步骤(2)获取的时间序列图像进行处理,获得影像信息,进行目的蛋白分布分析;
- (4) 应用Matlab 2014a(The Mathworks)对步骤(2)获取的时间序列图像中的荧光信号进行单颗粒追踪,分析蛋白运动轨迹;
- (5) 根据步骤(2)获取的时间序列图像,应用Image J 1.48分析荧光点的荧光强度,记录从荧光信号出现到完全消失所持续的帧数,与曝光时间和拍摄时间间隔进行相应的换算,计算出荧光分子在焦平面上的存在时长(lifetime),从而获得目的蛋白在细胞质膜上

的停留时间(dwelling time)的,以及从细胞质膜上解离的程度;

(6)对气孔保卫细胞膜蛋白停留时间进行高斯拟合。

[0007] 进一步,所述步骤(1)中,首先通过聚合酶连锁反应(Polymerase chain reaction,PCR)扩增待测蛋白的基因,通过双酶切、连接的手段将目的蛋白的基因插入到表达载体pCM2300中,与编码荧光标记蛋白的基因融合,最后通过农杆菌侵染得到转基因植株,从而在所述转基因植株中实现对目的蛋白的荧光标记。所述目的基因为植物气孔保卫细胞膜上表达的基因,所用载体为植物双元表达载体。

[0008] 进一步,所述步骤(1)中,种植目的基因的培养皿需要直立放置,使植物根完全垂直地面生长,便于全内反射荧光显微镜观察。

[0009] 进一步,所述步骤(1)中,获得转基因材料为在植物气孔中大量表达,融合绿色荧光蛋白GFP标记且具有重要功能的膜蛋白。

[0010] 进一步,所述步骤(2)中观察转基因植株为生长3-5天的转基因拟南芥幼苗。

[0011] 进一步,所述步骤(2)中,在载玻片上滴加50 $\mu$ L 1/2Murashige-skoog溶液,将生长3-5天的转基因材料幼苗置于载玻片上,将叶片远轴面贴近载玻片,然后加盖普通盖玻片;所述载玻片的折射率为1.52。

[0012] 进一步,所述步骤(2)中,绿色荧光蛋白GFP的激发波长为488nm,收集波长为525nm。设定曝光时间100ms,EM Gain(电子增益)为300倍,频率20Hz对样品进行连续成像。曝光时间和电子增益的设置是本技术领域一般技术人员所遇到的难题,不合理的设置会造成较弱的GFP信号丢失,即丢失单个蛋白聚合体的荧光信号;或使背景信号增加,即图像中会混合入过多植物细胞壁自发荧光等噪音信号。采用本发明中的设置可以实现在涵盖单个蛋白聚合体同时避免混入过多背景噪音信号,能够取得意想不到的技术效果。

[0013] 进一步,所述步骤(2)中,使用100X、数值孔径(numerical aperture)为1.45的镜头,滴加镜油,调节488nm激光入射角度数值为1.325,调节激光强度到物镜出口激光强度为1mW;对样品进行时间序列成像,每两帧图像之间时间间隔为0,获得连续图像200帧。激光入射角度和物镜出口强度是实现保卫细胞膜蛋白进行单分子分辨率成像的关键,不合理的设置会导致保卫细胞膜蛋白不能清晰成像而无法进行动态分析,或者细胞受到光损伤。采用本发明中的设置可以对保卫细胞膜蛋白的单个荧光颗粒清晰成像同时避免细胞因光损伤失去活性,能够实现在生活的细胞中进行单分子分辨率成像和分析的效果。

[0014] 进一步,所述步骤(3)中,借助Image J 1.48进行蛋白分布的分析,获得影像信息。

[0015] 进一步,所述步骤(3)中,对由步骤(2)所得到的图像选取合适阈值运用小波变换算法处理进行背景去除,荧光点的位置可以通过计算其周围3 $\times$ 3个像素的局部极大值得到亚像素精确值,计算出荧光点的权重重心(weighted-centroid)而确定。

[0016] 进一步,所述步骤(3)中,在Image J软件中打开绿色通道图像(File->Open...->选择图片->打开),选择process->Subtract Background-设置“Rolling Ball Radius”设置为25Pixels;运行Image->Adjust->Brightness/Contrast,调整图像的亮度和对比度,设置JPEG Quality(1-100)为100,然后将图像均另存为TIFF格式。

[0017] 进一步,所述步骤(3)中,借助Matlab 2014a(The Mathworks)进行蛋白轨迹追踪的分析。

[0018] 进一步,所述步骤(3)中,图像追踪参数为,在Matlab R2014a软件中,启动

“fusion”插件,File->Open…打开完好无损的TIFF图片,在“Control panel”对话框中,设定wavelet为3,w2,点击“Select ROI”选择想要分析的区域,点击“Find particles”选中了所要追踪的对象,观看蛋白点的选择情况,如果参数合适,蛋白点会被选中,如果想要标记的蛋白没有被标记或者所做的标记的点并非蛋白点,需对“Control panel”中的参数进行调整。

[0019] 进一步,所述步骤(3)中,对目标蛋白追踪的参数设置为,点击“Track”,出现的“input for process”对话框,其中gap值输入6,运动范围根据蛋白的运动特征,最小半径输入1,最大半径输入3,点击确定按钮;Tracking finished完毕后,点击菜单栏的“Tracking->View tracking result”;在“View tracking”进行“Edit track”,点击save,对追踪的结果进行保存。

[0020] 进一步,所述步骤(4)中,通过连续追踪荧光信号,可见荧光信号在膜上呈现高度动态,不断地出现和消失,一些荧光点在膜上出现的时间较短,另一些荧光点则具有较长的停留时间(lifetime),取停留大于2帧的荧光点进行膜上停留时间分析。

[0021] 进一步,所述步骤(4)中,从荧光分子在焦平面上出现到完全消失,所持续的帧数,与曝光时间和拍摄时间间隔进行相应的换算,计算出荧光分子的停留时间(lifetime),其可以反映蛋白质在细胞质膜上停留的时间,以及从细胞质膜上解离的程度。

[0022] 进一步,所述步骤(5)中,将追踪后的图像进行分析,其中停留时间设定为:“Analysis->tracking based->lifetime”;对导出的Excel数据进行保存,即获得停留时间。

[0023] 进一步,所述步骤(6)中,对追踪后的图像进行分析,点击菜单“Analysis->tracking based->lifetime”,然后点击“File->export->last analysis data”,导出数据;将导出的Excel数据在Origin进行高斯拟合,右击“Frequency count”,间隔为0.5,然后“Analysis->Fit Exponential”对其进行指数拟合。

[0024] 进一步,所述步骤(6)中,在拟合的过程中要求拟合系数 $R^2$ 大于0.99。

[0025] 本发明提供了一种实时观测植物气孔保卫细胞膜蛋白分布的方法,尤其提供一种高分辨率实时观测气孔保卫细胞膜上蛋白分布、运动和停留时间的方法。本方法具有以下优点:1)通过本发明提高成像的信噪比,可以实现对保卫细胞膜上蛋白质的分布进行高分辨率的观测;2)对细胞损伤小,能够在活体状态下、原位观察气孔保卫细胞膜蛋白的分布、运动和停留时间等特征;3)本发明成像速度快,能够反映植物细胞保卫细胞感受外界信号后的早期响应动态,并在单分子水平上对膜蛋白的异质性动态进行分析;4)本发明可重复性高。

## 附图说明

[0026] 图1为气孔保卫细胞膜上水通道蛋白(PIP2;1)的分布状态图;图1A为在正常生长条件下,保卫细胞膜上水通道蛋白的分布图;图1B为用10 $\mu$ M脱落酸ABA模拟干旱处理拟南芥30min,保卫细胞膜上水通道蛋白的分布图。

[0027] 图2为保卫细胞膜上水通道蛋白(PIP2;1)在时间序列中追踪到的扩散轨迹示意图;图2A为第10帧时水通道蛋白的运动轨迹图,图2B为第20帧时水通道蛋白的运动轨迹图;

[0028] 图3为正常生长条件和脱落酸ABA模拟干旱生长条件下保卫细胞膜上水通道蛋白

(PIP2;1)在膜上的停留时间示意图;图3A为正常生长条件下保卫细胞膜上水通道蛋白(PIP2;1)在膜上的停留时间示意图;图3B为脱落酸ABA模拟干旱生长条件下保卫细胞膜上水通道蛋白(PIP2;1)在膜上的停留时间示意图。

### 具体实施方式

[0029] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面结合具体实施方式并参照附图,对本发明进一步详细说明。应该理解,这些描述只是示例性的,而并非要限制本发明的范围。此外,在以下说明中,省略了对公知方法、结构和其它技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。因此,在不偏离本发明的内容和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0030] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到,在本发明的实施例中以拟南芥植物水通道蛋白(PIP2;1)为例,进行详细说明。

[0031] 实施例1:拟南芥叶片气孔保卫细胞膜上水通道蛋白(PIP2;1)的分布、运动和停留时间:

1.首先通过聚合酶连锁反应(Polymerase chain reaction,PCR)扩增水通道蛋白基因,通过双酶切、连接的手段将目的水通道蛋白基因插入到pCAMBIA 2300表达载体中,与编码绿色荧光蛋白GFP的基因融合,最后通过农杆菌侵染野生型Columbia拟南芥得到转基因植株,从而在所述转基因植株中实现对水通道的绿色荧光标记;

2.将绿色荧光蛋白标记水通道蛋白转基因植株拟南芥种子置于滤纸上,将消毒液(85%乙醇:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=3:1)洒到拟南芥种子上,待种子干后,将其播种于含0.1%蔗糖、pH为5.8的1/2Murashige-skoog固体培养基上。将培养皿放于4℃冰箱进行春化,春化24h后拿出,置于智能光照培养箱中进行培养,培养温度为22℃,光照条件为16小时光照/8小时暗培养循环;

3.在载玻片上滴加50μL 1/2Murashige-skoog培养剂溶液,取生长4-5天的幼苗,使其在载玻片上完全展开,并将幼苗子叶远轴面贴近载玻片。加盖盖玻片,1/2Murashige-skoog完全充满盖玻片与载玻片之间的空隙,但无多余溶液溢出,并确保溶液中无气泡产生;

4.用TIREM显微镜对上述拟南芥幼苗叶片进行观测。首先,仪器参数设置:相机选择00,根据蛋白的表达量调整物镜出口激光强度为1mW,调整激光入射角度为1.325,100×物镜,数值孔径(numerical aperture)为1.45;其次,拍摄参数设置:曝光时间为100ms,成像速度为20MHz,EM Gain为300,拍摄的帧数为200;最后,对同一视野下的拟南芥幼苗保卫细胞进行连续拍摄,获得连续图像;

5.启动Image J软件,在Image J软件中打开上述所得时间序列图像(File->Open...->选择图片->打开),选择Process->Subtract Background-设置“Rolling Ball Radius”为25Pixels;运行Image->Adjust->Brightness/Contrast,调整图像的亮度和对比度,然后将图片另存为TIFF格式(File->Save As->Tiff...);

6.在Matlab R2014a软件中,利用多假设追踪算法撰写追踪插件。启动“fusion”插件,File->Open...->New file->选择图片->打开,在“Control panel”对话框中,设定“wavelet”为3,w2,点击“Select ROI”选择想要分析的区域,点击“Find particles”选中所要追踪的对象,点击“Process next frames”,弹出对话框“Enter the number of image

frames you want to process”，键入参数为200，点击确定，运行结束显示Detection finished后，点击“Track”，出现的“input for process”对话框，其中gap值输入6，运动最小半径输入1，最大半径输入3，点击确定。单颗粒追踪结束弹出Tacking finished，点击菜单栏的“Tacking->View tracking result”；在“View tracking”进行“Edit track”，点击save，结果如图2所示；

7.将追踪后的图像进行分析，点击菜单“Analysis->tracking based->lifetime”，然后点击“File->export->last analysis data”，导出数据；

将导出的数据在Origin进行高斯拟合，右击“Frequency count”，间隔为0.5，然后“Analysis->Fit Exponential”对其进行指数拟合，无论是否用10 $\mu$ M ABA处理，其拟合系数均大于0.99，高斯拟合图像结果如图3所示。



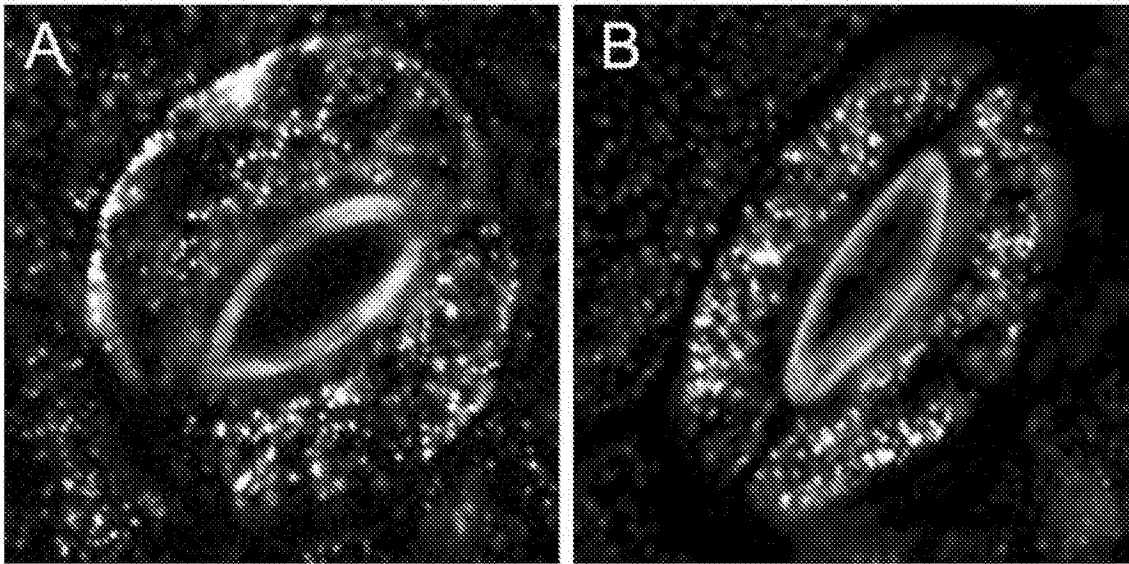


图1

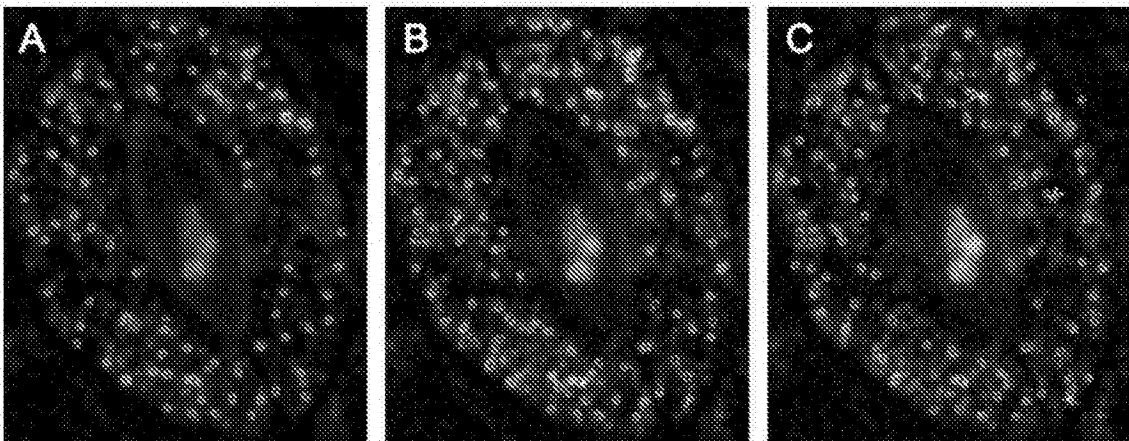


图2

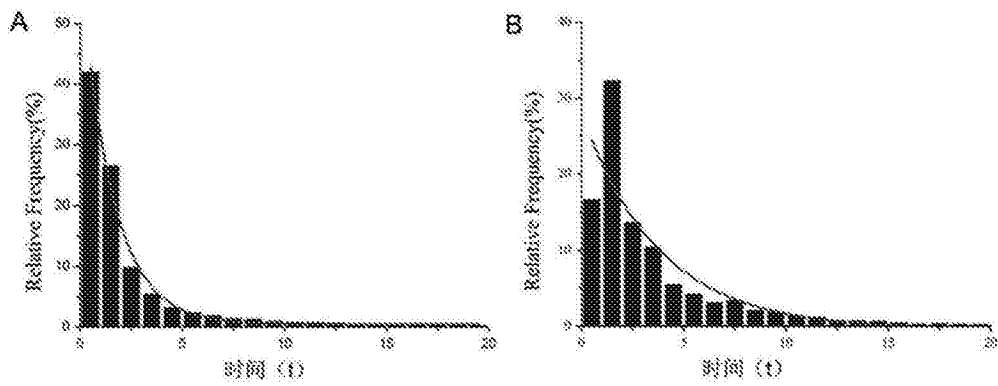


图3