

利用激光共聚焦扫描显微镜 的绿色荧光蛋白荧光成像

邢 达¹⁾ 周俊初²⁾ 于彦华¹⁾ 史巧娟²⁾ 谭石慈¹⁾

1), 华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631
2), 华中农业大学, 武汉 430074

摘 要 报道了利用基因标记技术将绿色荧光蛋白(GFP)基因与目标蛋白基因融合, 并利用激光共聚焦扫描显微镜通过探测绿色荧光蛋白的荧光来跟踪观测目标蛋白基因的表达。

关键词 激光共聚焦扫描显微镜, 绿色荧光蛋白, 根瘤菌。

从分子水平上阐明完整活细胞内进行的各种生命活动过程及其规律是细胞分子生物学研究的目标。传统的研究方法, 绝大部分均要求固定或破坏细胞。即使是生物大分子的荧光标记技术, 虽然在一定条件下也能用于研究活细胞内某些特定的分子过程, 但实验操作复杂, 而且仅能满足短时间的观察。本文报道一种新的标记技术: 绿色荧光蛋白基因标记技术^[1, 2]。它的独特之处在于采用脱氧核糖核酸(DNA)重组技术将绿色荧光蛋白基因与目标蛋白基因连结起来, 形成一个融合基因表达载体。如果目标蛋白基因得到表达, 绿色荧光蛋白基因将同时得到表达。那么就可以通过探测绿色荧光蛋白的发光来跟踪观测目标蛋白基因的表达及其时空特性, 而且绿色荧光蛋白荧光的产生无需任何辅助因子或底物, 因此绿色荧光蛋白标记系统使得人们能够在方便的正常生理条件下对活细胞或活的生物组织内进行的各种过程及其分子机理直接进行观察和研究。

本文报导以 Ar^+ 激光器为激光光源的 MRC-600 型激光共聚焦扫描显微镜(LCSM)系统与绿色荧光蛋白基因标记技术结合, 通过对绿色荧光蛋白的荧光的三维时空成像, 对根瘤菌的侵染过程及根瘤形成等植物固氮研究中的重要问题进行的形态学研究。实验中所用激光共聚焦扫描显微镜系统的分辨率比传统的显微镜得到了极大的提高, 还可以在不损伤细胞的情况下通过改变聚焦深度的方法获得不同层面的光学切片图像, 并利用计算机处理获得细胞的三维立体图像。

实验材料为紫云英。所用绿色荧光蛋白为突变型的 MUTGFP, 其激发峰在 395 nm 和 490 nm。利用酶切和基因重组技术^[3]将绿色荧光蛋白基因与根瘤菌蛋白基因融合, 然后用含绿色荧光蛋白基因的根瘤菌侵染紫云英, 利用激光共聚焦扫描显微镜系统通过探测绿色荧光蛋白的特征发光(522 nm)来跟踪观测根瘤菌的侵染过程。

实验中将紫云英与根瘤菌共培养,紫云英与根瘤菌的相互识别是通过根毛细胞表面的特殊蛋白质(一种外源凝集素)与根瘤菌相结合来实现的。根瘤菌可能通过分泌类生长素的激素刺激根毛细胞,使其发持奇异的弯曲变形,形成图 1 所示的牧羊拐。牧羊拐内部存在有侵染线(图 1 箭头 a 所示),一般认为根瘤菌是通过侵染线进入根部,但到目前为止尚未有实验清楚地观测到这一侵染过程。而本实验利用激光共焦扫描显微镜系统及绿色荧光蛋白基因标记技术结合,观察到了清晰的侵染过程影像,证明了根瘤菌的侵入就是通过根毛中的侵染线进入的。根瘤菌进入根部细胞后,开始分裂,分裂产生的后代形态发生变化成为类菌体。侵入的最终结果是诱发分生组织开始细胞分裂,导致根细胞的极端的过度生长,产生了称为根瘤的瘤状突起,如图 2 所示。瘤状突起逐渐生长发育,形成形态完整的根瘤,成熟根瘤的直径可达 2 mm。存在于根瘤中的根瘤菌开始进行着活跃的固氮作用。

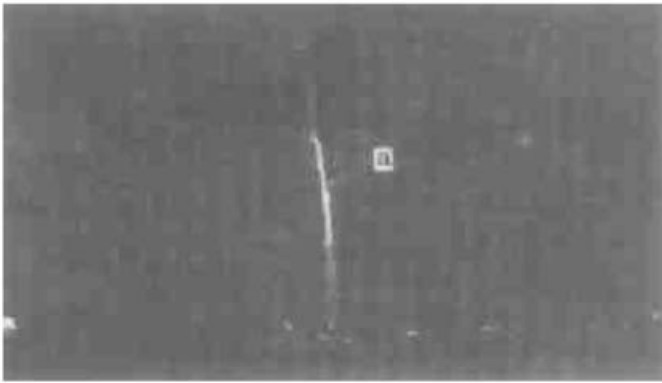


Fig. 1 The three-dimensional picture of the nodule bacteria invaded root hair. There is an invading line (arrow a in Fig. 1) through which the nodule bacteria go into the root tissue cells



Fig. 2 The three-dimensional image of the root nodule that just emerges a tumouric bump

从绿色荧光蛋白标记的根瘤菌侵染开始到形成根瘤,观察时间超过十天,在整个过程中绿色荧光蛋白荧光强度非常稳定,在毫瓦量级的激发光源下,即可观测到清晰的绿色特征荧光图像,证明了绿色荧光蛋白基因标记技术不仅稳定性好,而且产生荧光的量子效率非常高。激光共焦扫描显微镜与基因标记技术相结合必将开拓分子生物学新的研究领域和应用前景。

参 考 文 献

- [1] Atsushi M, Juan L, Roger H *et al.*. Fluorescent indicators for Ca based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388**(8) : 882~ 887
- [2] Kevin A E, Maddy D, Ruth A M *et al.*. GFP-moesin illuminates actin cytoskeleton dynamics in living and demonstrates cell shape changes during morphogenesis in drosophila. *Developmental Biology*, 1997, **191**(1) : 103~ 117
- [3] Swaminathan M, Hoang C P, Verkman A S. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-s65T in solution and cells: Cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translation and rotational diffusion. *Biophys. J.*, 1997, **72**(4) : 1900~ 1907