

流式细胞术在高等植物研究中的应用

焦旭雯¹, 赵树进^{2*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640; 2. 广州军区广州总医院药学部, 广州 510010)

摘要:流式细胞术(FCM)是根据所测定的各种细胞性质的不同组合,从细胞群体中把某个亚群分选出来,并对它的功能和形态学进行研究或进一步培养分析。流式细胞术具有快速、灵敏和同时进行多参数检测等优点,对其基本原理和在高等植物中的应用进行了介绍。

关键词:流式细胞术;细胞参数测定;细胞核;原生质体;染色体分拣;综述

中图分类号:Q94-331

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2006)04-0354-05

Applications of Flow Cytometry in Higher Plant Research

JIAO Xu-wen¹, ZHAO Shu-jin^{2*}

(1. College of Bioscience & Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: Flow cytometry (FCM) is a current technique for sorting certain cell subset from various cellular associations based on differences in cell's physical and chemical properties, by which the selected cell subset could be further studied in function and morphology. The advantages of this technique include rapidity, sensitivity and synchronization of multi-parameter detection. The principles of FCM are briefly described, and its applications in plant cytoplasm, protoplast and chromosome are reviewed.

Key words: Flow cytometry; Determination of cell parameters; Cell nuclei; Protoplast; Chromosome sorting; Review

流式细胞术(Flow cytometry, 简称 FCM)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种对细胞的物理性质及化学性质,如细胞大小、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测定并可分类收集的技术。该技术超越了传统显微分析技术,能在瞬间对大量细胞进行准确的分析。这种快速有效的细胞分析技术已广泛应用于细胞生物学、免疫学、发育生物学、细胞动力学、生理学、分子生物学等生物学的各个领域^[1],在其基础上建立的流式细胞仪系统,具有体积小、功能全和使用方便等特点。本文简要介绍 FCM 的原理,对其在高等植物研究中的应用作了综述。

1 流式细胞术的原理

流式细胞术是一种能够对液流中的细胞或其他微粒进行多参数快速分析和分选的技术。它的工作原理是:在一定压力下,细胞随鞘液从样品池通过喷嘴中心进入照明室,通过激光束时使激光发生散射和折射,由前向散射光(FSC, Forward scatter)和侧向散射光(SSC, Side scatter)检测器把散射光信号转换成电信号,同时细胞所携带的荧光素被激发后所发出的荧光由聚光器收集。不同颜色的荧光被双色反光镜转向不同的光电倍增管检测器,经放大后的荧光信号和散射光信号一起通过数据化处理,

收稿日期:2006-01-13 接受日期:2006-03-18

* 通讯作者 Corresponding author

再输入电脑储存并据此对细胞进行分析和分选^[2]。

流式细胞术的主要特点是:①测量速度快,可在1s内测定数万个细胞;②同时进行多参数测量,可以对同一个细胞做有关物理特性、化学特性的多参数测量,并具有明显的统计学意义;③是一门综合性的高科技方法,它综合了激光技术、计算机技术、流体力学、细胞化学、图像技术等领域的知识和成果;④既是细胞分析技术,又是精确的分选技术。总之,流式细胞术主要包括了样品的液流技术、细胞的分选和计数技术,以及数据的采集和分析技术等^[3]。

2 细胞的参量和荧光探针

FCM是通过测量细胞的多种参量来获取信息的,细胞参数分为结构参量和功能参量两大类。结构参量主要用于描述细胞的化学组分和形态特征,例如DNA、RNA的含量,总蛋白含量、胞内PH值和细胞大小等;功能参量主要是描述细胞整体的理化和生物特性,如:细胞周期动力学、特殊配体的鉴定、特殊细胞的生物活性等,这些参量有的需要经荧光标记才能被测定,有的并不需要荧光标记^[4]。

2.1 参数测量的原理

流式细胞计进行多参数测量时,信息主要来自特异性荧光信号及非荧光散射信号。测量是在测量区进行,所谓测量区就是照射激光束与喷出喷孔的液流束的垂直相交点。当液流中央的单个细胞通过测量区时,受到激光照射会向立体角为 2π 的整个空间散射光线,散射光的波长和入射光的波长相同。散射光的强度及其空间分布与细胞的大小、形态、质膜和细胞内部结构密切相关,未遭受任何损坏的细胞对光线都具有特征性的散射,因此可利用不同的散射光信号对未经染色的活细胞进行分析和分选。经过固定和染色处理的细胞由于其光学性质的改变,散射光信号不同于活细胞。散射光不仅与作为散射中心的细胞参数相关,还跟散射角及收集散射光线的立体角等非生物因素有关^[5]。

2.2 细胞参数的测定

2.2.1 DNA和RNA含量

对DNA和RNA的测定及其含量的分析可以用多种荧光探针标记后测出。常用的荧光探针有吖

啉橙(AO, Acridine-orange)、派洛宁Y(PY, Pyronine Y)、HO(Hoechst)系列和色霉素A₃(CA₃)等。利用HO/CA₃双染色还可分析DNA的碱基组成,另外还可以结合BrdU(Bromodeoxyuridine, 溴脱氧尿嘧啶核苷)单克隆抗体免疫荧光来测定细胞内DNA的合成^[6]。

2.2.2 蛋白质总量

用FCM可以测定细胞中蛋白的总含量,以检测一个细胞群体生长和代谢的状态,或区别具有不同蛋白含量的细胞亚群。检测总蛋白的常用荧光探针为异硫氰酸荧光素(FITC, Fluorescein isothiocyanate),FITC以共价键与蛋白上带正电的残基结合,经蓝光激发后发出明亮的绿色荧光。

2.2.3 特殊配体

配体是与不同的细胞结构特异性结合很强的各种大分子和小分子物质,通过对特异性荧光标记配体的测定可以获得不少有关结构参量和功能参量的信息。用于这方面工作的荧光探针主要有FITC、罗丹明系列(如四甲基异硫氰酸罗丹明TRITC、异硫氰酸罗丹明X-RITC和美国德州红等)、藻胆蛋白系列等。

2.2.4 生物活性

生物活性的测定主要包括两方面:①细胞本身的死活;②活细胞生物功能发挥的强弱。FCM用来判断细胞死活的常用荧光探针有两大类:一类是能透过活细胞膜进入细胞内而发出荧光的物质,例如二乙酸荧光素(FDA, Fluorescein diacetate),它可被活细胞滞留而发出黄绿色荧光。若细胞有损伤则会从细胞中流失,观察不到荧光。另一类不能透过活细胞膜,但能对固定的细胞及膜破损的细胞核进行染色,例如碘化丙啶(PI, Propidium iodide)和溴化乙锭(EB, Ethidium bromide)。

3 流式细胞术在高等植物中的应用

3.1 应用于植物中的特殊性

由于植物细胞与动物细胞在结构上的差异,例如植物细胞具有细胞壁、特殊细胞器以及中央液泡等,因此流式细胞术应用于植物细胞时,在样品制备、染色、仪器的改造等方面都应适应植物细胞的上述特点。

3.1.1 制备植物染色体悬液的材料

1984年De Laat和Blass^[7]用纤细单冠菊

(*Haplopappus gracilis*) 的悬液细胞第一次对植物染色体悬液进行流式计数分析,然而核型的不稳定性却成为流式细胞术应用于计数的最大障碍。随后 Conia^[8]等尝试着从幼叶原生质中分离出染色体进行分析,但由于细胞同步化程度较低,这种方法没有得到广泛的应用。直到 1992 年 Dolezel^[9]利用根尖分裂组织制备细胞悬液,由于大多数植物的根尖较易获得且其核型较稳定,因此利用根尖材料制备染色体悬液成为广泛使用的方法。

3.1.2 细胞周期同步化和中期染色体富集

为了富集足量同步化的中期染色体,秋水仙碱常被用于抑制有丝分裂过程中纺锤丝的形成。但由于其对植物微管蛋白亲和力较低,需要使用较高的浓度,对人体造成高毒性的危害以及在植物遗传上产生不稳定性。另外秋水仙碱也会导致染色体过于粘稠,不适用于染色体分选等后续操作。1992 年 Dolezel 等^[9]发现应用甲基氨基草磷 (APM, Apiprophosphomethyl)、安磺灵 (Oryzalin)、氟乐灵 (Trifluralin) 等人工除草剂代替秋水仙碱,在微摩级浓度时便可见显著的抗微管作用。

3.1.3 染色体悬液的制备

由于植物细胞存在细胞壁,对染色体的分离造成了一定困难,通常有两种方法从同步化的细胞中释放染色体。其一,利用果胶酶和纤维素酶酶解细胞壁,然后将所获得的原生质体置于低渗缓冲液中,使得染色体得以释放^[7];其二,将同步化根尖细胞经甲醛固定后进行机械分离从而释放染色体^[9]。相对而言,后者更加快速,并且避免了长时间的酶解,减轻了对染色体的伤害。

3.1.4 仪器的改造

由于植物细胞原生质体较大且脆弱,所以应使用 100–200 μm 孔径的喷嘴,还应降低鞘液的压力以保证通过喷孔的层流条件,并能够观察到液滴的形成,同时降低液滴形成的信号频率,以使直径大的液流能准确的形成液滴。此外还需降低液滴偏转系统,以便观察液滴^[9]。

3.2 在植物学研究中的应用

3.2.1 细胞核分析

FCM 在细胞核分析方面的应用范围涉及 DNA、RNA、蛋白质含量的分析、染色质结构分析、细胞周期分析、倍性分析等方面,是 FCM 在植物中

应用最广泛、最基本的领域。Van't Hof^[10]用 Hoechst 33258 荧光素对棉花 (*Gossypium hirsutum* cv. MD51ne) 纤维细胞进行染色后,以人类口腔上皮细胞的细胞核 DNA 含量作为标准对照,通过 FCM 分析,发现花期过后 2 d 的胚珠内 DNA 含量增加了 24%。由于在细胞周期的各时相中,染色质的凝集程度不同,经酸或碱处理后,变性程度也不同,Rayburn 等^[11]通过调整与 DNA 结合方式不同的两种染料的比例,经 FCM 分析后确定玉米 (*Zea mays*) 中异染色质的含量。通过流式细胞术对细胞周期变化情况进行分析,李涛等^[12]认为交变应力作用可直接影响烟草细胞或细胞分裂的同步化,促进 S 期的 DNA 合成,有助于细胞的有丝分裂。另外,Wan 等^[13]应用流式细胞术分别对经花粉培养和花药培养所获得的椰菜 (*Brassica oleracea*) 再生植株进行 DNA 含量分析,认为经花药培养所得到的植株更易发生染色体倍性变异。通过对野豌豆染色体倍性差异的分析,Kathleen 等^[14]应用 FCM 与根尖染色体压片法,对美国农业部国家种子保藏实验室的 45 个标记为长柔毛野豌豆 (*Vicia villosa*) 的标本进行鉴定,发现其中的两个标本应为褐毛野豌豆 (*V. pannonica*),充分说明流式细胞术在植物种质资源鉴定中快速而有效。由于 FCM 分析检测速度快,工作周期短,获得的信息量大,数据结果客观准确,统计学精度高,并且不使用放射性污染物质,现已成为细胞动力学研究和细胞周期分析的主要手段。

3.2.2 原生质体分析

FCM 在原生质体分析方面的应用主要测定原生质体大小、细胞壁生物合成、原生质体与微生物的相互作用、原生质体融合产物分选、被膜抗原的表达等。在植物细胞研究中主要应用于分选出活的原生质体,并通过分选出来的原生质体再生出植株,其中最有意义的就是选出由原生质体融合所产生的异核体^[4]。刘继红^[15]采用流式细胞术,对酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 叶肉原生质体和甜橙 (*C. sinensis* cv. Shamouti) 胚性愈伤组织原生质体电融合后再生的体细胞杂种进行分析,结果表明,所有的体细胞杂种植株荧光强度是二倍体对照的两倍,这说明两者的原生质体已经融合。通过使用 FCM 分析 *enod40* 转染的拟南芥属野生植物原生质体,Guzzo 等^[16]发现导致前向角散射及细胞大小减少的基因有所表达,说明 *enod40* 对原生质体具有直接作用。用

流式细胞术对荧光强度进行定量检测,还可以用来定位植物激素结合位点的空间分布,Yamazaki 等^[17]用生物素化脱落酸(bioABA)来定位蚕豆气孔保卫细胞质膜的脱落酸感应位点,将位点用荧光素标记后,在保卫细胞原生质体表面可以观测到荧光微粒斑点,通过成像系统成功定位脱落酸结合位点的空间分布情况。

3.3.3 染色体分析

1975年,Gray 等^[18]从中国仓鼠细胞中分离出染色体,用DNA荧光染料进行染色,根据染料含量的不同用流式细胞仪将单个染色体进行分拣,开创了流式细胞遗传学。由于在染色体悬液的准备与单条染色体辨别方面存在着困难,利用流式细胞术分析与分选植物染色体一直未能取得预期的效果,但人们发现使用转座系和缺失系可以将一些无法分离的染色体从复合峰中分离出来^[19]。1984年,De Laat 和 Blass^[7]第一次报道了用流式细胞术识别和分拣植物染色体。随后流式细胞术被证明是一个非常有用的工具,它能快速精确地检测染色体数目和结构的畸变,以及非整倍体和染色体缺失。目前已在17个物种中利用流式细胞术对染色体进行分析与分选,包括玉米(*Zea mays* cv. Seneca 60)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)、黑麦(*Secale cereale*)^[20-23]等。另外,Macas 等^[24]在1993年利用FCM对碗豆(*Vicia faba* L.)流式核型进行分拣,结合PCR技术对其DNA进行物理定位,成功实现了USP基因(unknown seed protein genes)、碗豆球蛋白基因(vicilin genes)和豆球蛋白 B_3 基因(legumin B_3 genes)、豆球蛋白 B_4 基因(legumin B_4 genes)、假基因 Ψ_1 (pseudogenes Ψ_1)在相应染色体区域上的定位。流式细胞术还可以分选出指定的染色体,用来建立染色体DNA文库,但目前在植物中仅有番茄(*Lycopersicon pennellii*)^[25]和蚕豆(*Vicia faba* L.)^[26]染色体DNA文库的报道。李立家等已将流式细胞术和PCR技术相结合,应用于类玉米中抗病基因类似物序列的研究。

4 展望

从1930年Caspersson和Thorell^[3]以细胞的计数开始,试图寻找研究细胞的新工具,到1973年BD公司与美国斯坦福大学合作,研制开发并生产

了世界上第一台商用流式细胞仪FACSL,流式细胞术进入了一个空前飞速发展的时代。进入九十年代后,流式细胞术作为一门生物检测技术已经日臻完善,仪器的硬件平台也已达到稳定的技术状态。科学家和仪器制造商又纷纷将研究的焦点转向荧光染料开发、单克隆抗体技术、细胞的制备方法以及提高电子信号的处理能力上来,以拓展日趋广泛的应用领域。

流式细胞术的强大生命力植根于生物学、医学的各个领域,正是这些日新月异、变化多样的应用项目在全球范围内推动了流式细胞术的发展。目前,利用流式细胞术不但可以对植物细胞进行计数、测量基因组大小、还能分析细胞周期、进行流式核型(染色体的DNA含量)分析、分拣染色体以及构建染色体文库等。由于FCM分选系统可提供纯度较高的特异性细胞群,因此利用流式细胞术分选纯化出的染色体在分子生物学后续研究领域有着广阔的应用前景,例如利用PCR技术进行物理图谱的绘制、FISH与PRINS遗传图谱的绘制、植物基因组的分析、染色体蛋白的免疫定位^[27-30]等。

近年来,FCM作为一种日渐成熟的技术,已经深入到植物研究的诸多领域,给工农业生产和科学研究提供了一个强有力的工具。但是,这种技术还有一些自身的缺点,如价格昂贵、对操作人员要求高以及样品需要复杂的前处理等,这都限制了流式细胞术在植物领域中的应用。然而,随着新型多功能流式细胞仪的研制、多参数分析技术的建立以及各种分析软件的开发,我们相信流式细胞术作为一种不断完善的技术在植物学研究中将有更加广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Nunez R. Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and Applications [M]. London:Horizon Scientific Press, 2001. 1-3.
- [2] Geng H X(耿慧霞), Wang L(王来), Wang Q(王强). The usage of flow cytometry in the biology [J]. J Biol(生物学杂志), 2005, 22(4): 44-51. (in Chinese)
- [3] Zhao X F(赵现方), Chen L H(陈林海), Li Z Y(李宗义), et al. Flow cytometry and its application in the microorganisms [J]. J Henan Agri Sci(河南农业科学), 2005, 6:5-9. (in Chinese)
- [4] Song P G(宋平根), Li S W(李素文). Flow Cytometry Principles and Applications[M]. Beijing: Beijing Normal University Press, 1992. 52-87. (in Chinese)
- [5] <http://www.51qe.cn/pic/30/11/19/045.html> [EB/OL]

- [6] Cai W Q (蔡文琴), Wang B Y (王伯澹). Practical Immuno-Cytochemistry and Nucleic Acid Hybridization Techniques [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Press, 1994. 202-206. (in Chinese)
- [7] De Laat A M M, Blass J. Flow cytometric characterization and sorting of plant chromosomes [J]. Theor Appl Genet, 1984, 67: 463-467.
- [8] Conia J, Bergounioux C, Perennes C, et al. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts [J]. Cytometry, 1987, 8:500-508.
- [9] Dolezel J, Cihalikova J, Lucretti S. A high yield procedure for isolation of metaphase chromosome from root tips of *Vicia faba* L. [J]. Planta, 1992, 188:93-98.
- [10] Van't Hof J. Increased nuclear DNA content in developing cotton fiber cells [J]. Amer J Bot, 1999, 86:776-779.
- [11] Rayburn A L, Price H J, Smith J D, et al. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays* [J]. Amer J Bot, 1985, 72:1610-1617.
- [12] Li T (李涛), Hou Y X (侯月霞), Cai G Y (蔡国友), et al. Analysis of the effect of strong sound wave on plant cells cycles using flow cytometry [J]. Acta Biophys Sin (生物物理学报), 2001, 17(1): 195-198. (in Chinese)
- [13] Wan G M, Farnham M W, Nannes J S P. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture [J]. Plant Breed, 1999, 118:249-252.
- [14] Kathleen M Y, Germán A B, et al. Flow cytometric analysis for ploidy level differentiation of 45 hairy vetch accessions [J]. Ann Appl Biol, 2004, 145(1):123-127.
- [15] Liu J H (刘继红). Characterization of nuclear and cytoplasmic compositions of somatic hybrid plants between sweet orange and sour orange [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 2004, 46(10):1206-1211. (in Chinese)
- [16] Guzzo F, Portaluppi P, Grisi R, et al. Reduction of cell size induced by *enod40* in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exper Bot, 2005, 56(412):507-513.
- [17] Yamazaki D, Yoshida S, Asami T, et al. Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells [J]. Plant J, 2003, 35(1):129-139.
- [18] Gray J W, Carrano A V, Steinmetz L, et al. Chromosome measurement and sorting by flow systems [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1975, 72:1231-1234.
- [19] Li L J (李立家), Song Y C (宋运淳). Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes [J]. Hereditas (遗传), 2005, 27(3): 461-465. (in Chinese)
- [20] Li L J, Arumuganathan K, Gill K S, et al. Flow sorting and microcloning of maize chromosome 1 [J]. Hereditas, 2004, 141:55-60.
- [21] Vrána J, Kubaláková M, Simkova H et al. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Genetics, 2000, 156:2033-2041.
- [22] Lee J H, Arumuganathan K, Chung Y S, et al. Flow cytometric analysis and chromosome sorting of Barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Mol Cells, 2000, 10(6): 619-625.
- [23] Lee J H, Ma Y, Wako T, et al. Flow karyotypes and chromosomal DNA contents of genus *Triticum* species and rye (*Secale cereale*) [J]. Chrom Res, 2004, 12:93-102.
- [24] Macas J, Dolezel J, Lucretti S, et al. Localization of seed protein genes on flow sorted field bean chromosomes [J]. Chrom Res, 1993, 1:107-115.
- [25] Arumuganathan K, Martin G B, Telenius H, et al. Chromosome 2-specific DNA clones from flow sorted chromosomes of tomato [J]. Mol Gen Gen, 1994, 242:551-558.
- [26] Macas J, Gualberti G, Nouzova M, et al. Construction of chromosome specific DNA libraries covering the whole genome of field bean (*Vicia faba* L.) [J]. Chrom Res, 1996, 4:531-539.
- [27] Neumann P, Pozárková D, Vrána J, et al. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Chrom Res, 2002, 10:63-71.
- [28] Valarik M, Bartos J, Kovarova P, et al. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes [J]. Plant J, 2004, 37:940-950.
- [29] Pozarkova D, Koblizkova A, Roman B, et al. Development and characterization of microsatellite markers from chromosome 1-specific DNA libraries of *Vicia faba* [J]. Biol Plant, 2002, 45: 337-345.
- [30] Baranova P, Hause B, Dolezel J, et al. Association of γ -tubulin with kinetochore/ centromeric region of plant chromosomes [J]. Plant J, 1998, 14:751-757.