

· 技术方法 ·

## 3D-SIM结构照明超分辨率显微镜实现蛋白质在植物亚细胞器内的定位

刘玥<sup>1</sup>, 尹悦佳<sup>2</sup>, 梁重阳<sup>3</sup>, 黄殿帅<sup>3</sup>, 王阳<sup>4</sup>, 刘艳芝<sup>2</sup>, 窦瑶<sup>2</sup>, 冯树丹<sup>4\*</sup>, 郝东云<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; <sup>2</sup>吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033

<sup>3</sup>吉林大学再生医学科学研究所, 长春 130021; <sup>4</sup>哈尔滨师范大学生命科学学院, 哈尔滨 150080

**摘要** 基因表达产物蛋白质的亚细胞定位是解析基因生物学功能的重要证据之一。近年来出现的超分辨率光学成像技术已成功应用于人类和动物细胞中, 预示着显微成像技术继激光共聚焦技术后的又一重要进步。由于植物细胞的特殊性和成像技术的研发取向, 超分辨率光学成像技术在植物细胞蛋白质亚细胞定位的应用尚未见报道。该研究利用DeltaVision OMX显微镜技术, 克服了叶绿体基粒中叶绿素自发荧光与融合蛋白荧光不易区分的缺陷, 解决了受分辨率局限无法将植物细胞中蛋白质在亚细胞器内可视化精确定位的技术难题, 成功地将植物蔗糖合成酶ZmSUS-SH1定位在烟草表皮细胞叶绿体基粒周围。该研究同时建立了一套基于撕片制片法的简便OMX显微镜制片方法, 并针对OMX显微成像技术在植物细胞中蛋白质亚细胞定位的应用进行了讨论。

**关键词** 荧光蛋白, OMX, 植物亚细胞定位, 超分辨率显微镜

刘玥, 尹悦佳, 梁重阳, 黄殿帅, 王阳, 刘艳芝, 窦瑶, 冯树丹, 郝东云 (2015). 3D-SIM结构照明超分辨率显微镜实现蛋白质在植物亚细胞器内的定位. *植物学报* 50, 495–503.

融合报告基因定位法可应用于生物大分子活细胞实时定位(邢浩然等, 2006)。该方法催生了以分辨率为标志的生物成像技术的迅猛发展。活细胞成像要求系统迅速、精确、稳定、恒温(Dobbie et al., 2011)。20世纪初采用荧光显微镜观察植物组织(Masters, 2010); 20世纪80年代激光共聚焦显微镜实现了活细胞3D成像(李楠等, 1996; 赵启韬和苗俊英, 2003), 但其侧向分辨率低于250 nm, 轴向分辨率低于600 nm (Brown, 2011), 无法实现植物活细胞亚细胞器内精确定位。电子显微镜(electron microscopes, EM)受样本制备方法局限, 无法用于活细胞成像(Coltharp and Xiao, 2012)。近年来, 科研工作者更倾向于采用基因工程方法将荧光蛋白与目的蛋白融合, 利用显微成像技术观测蛋白质在细胞器中的定位(龚燕华和彭小忠, 2009), 激光共聚焦技术就是广泛使用的技术之一(赵启韬和苗俊英, 2003)。但由于激光共聚焦显微镜受分辨率限制, 开发研制一种新的能够在植物活细胞中精确定位蛋白质的显微镜对功能基因组

研究的发展至关重要。1989年, 加利福尼亚大学的John Sedat和David Agard研发出可用于活细胞细胞周期3D荧光成像的超分辨率显微镜OM1 (Minden et al., 1989), 随后API公司将其商业化, 形成了DeltaVision显微镜系列——OMX (Optical Microscope eXperimental) (Dobbie et al., 2011), 侧向分辨率提高到80–120 nm, 轴向分辨率达到105–165 nm (Gustafsson et al., 2008; Schermelleh et al., 2008; Dobbie et al., 2011), 空间分辨率提高到激光共聚焦显微镜观察极限的8倍(van de Corput et al., 2012)。由于该成像技术突破了显微镜的光学极限, 从根本上提升了时间和空间分辨率, 使生物成像进入到一个崭新的阶段。

目前应用的DeltaVision OMX有2种模式: 常规光学活细胞快速成像模式和基于3D结构照明成像显微术(three-dimensional structure illumination microscopy, 3D-SIM)的结构照明(structure illumination, SI)模式。DeltaVision OMX的SI模式可以用于观

收稿日期: 2015-02-16; 接受日期: 2015-03-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No.31200611)和国家自然科学基金(No.31170731)

\* 通讯作者。E-mail: sdf6616@163.com; dyhao@cjaas.com

测固定细胞样品(Dickerson, 2010), 并已成功应用于人类和动物细胞的蛋白质定位研究。Weil等(2010)采用DeltaVision OMX精确区别果蝇卵前部*bicoid* mRNA定位因子的直接和间接作用。Zheng等(2011)采用OMX在海马脊柱中将突触细胞骨架蛋白SAP102定位在突触和神经元胞质中, 将PSD-95定位在突触, 预测二者在突触结构中发挥不同的功能。Seabold等(2012)将DeltaVision OMX应用于海马神经元细胞成像。冷泉港实验室Tanos等(2013)将末端附体蛋白在中心粒中进行亚细胞定位, 证明中心粒末端附体促进膜对接, 导致纤毛生成。然而, 将DeltaVision OMX应用于观测植物活细胞内蛋白质亚细胞定位的研究报道较少, 这很大程度上归因于植物细胞壁、亚细胞器及其结构等的特殊性。植物细胞内尚存在许多未知精细定位的重要蛋白质, 探究其精细定位对揭示植物蛋白质如何参与代谢调控及解析基因功能尤为重要。

本实验旨在利用DeltaVision OMX实现蛋白质在植物细胞内的亚细胞定位, 并建立一种可应用于超分辨率显微成像技术的制片方法。基于实验室前期对淀粉代谢的研究背景, 本实验选取淀粉代谢关键酶——玉米蔗糖合成酶(*Zea mays* sucrose synthase, ZmSUS)的亚型ZmSUS-SH1进行研究。将编码ZmSUS-SH1的基因*ZmSH1* (*shrunk 1*)与编码绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的基因*GFP*重组, 形成融合蛋白ZmSUS-SH1-GFP, 导入模式植物烟草中, 采用DeltaVision Olympus激光扫描共聚焦显微镜对融合蛋白初定位, 随后采用DeltaVision OMX超分辨率显微镜进行精细定位, 实现蛋白质在植物亚细胞器内部定位的可视化; 同时建立了一套简便的OMX显微镜制片方法, 为植物亚细胞器中蛋白质的精细定位提供了一种新的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料及仪器设备

实验材料包括B73自交系玉米(*Zea mays* L.)籽粒、烟草(*Nicotiana glauca* Link et Otto cv. 'Grandiflora')。克隆载体为pEasy-Blunt (TransGene)。植物表达载体为pCAMBIA1302-35S-GFP。实验材料还包括大肠杆菌感受态细胞Trans1-T1 *E. coli* DH5 $\alpha$  (TransGene)、

农杆菌菌株EHA105、载玻片、盖玻片(规格1.5)(Fisherbrand)。

DeltaVision Olympus激光扫描共聚焦显微镜FV1000-IX81由吉林省农业科学院资源与环境检测中心提供。DeltaVision OMX超分辨率显微镜由吉林大学再生医学科学研究所提供。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 转化农杆菌的获得

在GenBank查得*ZmSH1*基因的cDNA序列长为2 746 bp, 其中72–2 480 bp为CDS编码区, 设计巢式PCR引物, 提取玉米自交系B73籽粒总mRNA, 反转录得到cDNA。将*ZmSH1*基因扩增, 连接到pEasyBlunt上获得pEasyBlunt-*ZmSH1*克隆载体。设计含有Spe I酶切位点的引物: 5'端引物为5'-GGACTAGT-ATGGCTGCCAAGCTGACTCG-3', 3'端引物为5'-GGACTAGTATCGAAGGACAGCGGAACCTG-3', 将*ZmSH1*从克隆载体上扩增, 用琼脂糖凝胶电泳, 产物胶回收, 同时用Spe I酶切回收产物和含有绿色荧光蛋白的植物表达载体pCAMBIA1302-35S-GFP, 采用连接酶连接, 转化大肠杆菌感受态细胞Trans1-T1 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 获得含有pCAMBIA1302-35S-*ZmSH1*-GFP重组质粒的大肠杆菌。采用三亲杂交方法将质粒导入农杆菌EHA105中, 获得转化农杆菌。

#### 1.2.2 阳性材料的获得

取1个月苗龄的烟草再生苗叶片, 去掉叶脉, 切割成0.5 cm $\times$ 0.5 cm小块, 置于摇匀的OD<sub>600</sub>值约为0.5–0.8的农杆菌菌液中, 摇动10分钟后接种于共培养培养基上。黑暗培养48小时后取出材料并用无菌水冲洗, 滤纸吸干水分, 接种于抑菌培养基上。光照培养3周至不定芽长满切块边缘, 将整个外植体切成小块, 每块上带有1–3个不定芽, 将这些切开的外植体接种于筛选培养基上。4周后将绿色的抗性植株转移至生根培养基上, 1周后获得完整的转基因植株, 即可用于移栽和分子检测。

分别将含重组质粒的农杆菌和含空载体的农杆菌活化, OD<sub>600</sub>值稀释到1.0–3.0, 用1 mL注射器针头轻轻点在成熟烟草叶片背面(注意不要刺穿), 用无针头注射器在针孔处注射菌液100  $\mu$ L左右(避开

叶脉), 菌液蔓延约3–4 cm<sup>2</sup>, 每个叶片选取2–4个点注射, 用记号笔圈出注射位置, 叶片用透明的塑料袋包住。将植物放置在22°C、16小时光照下生长24–48小时。

### 1.2.3 转化植株的分子检测

采用CTAB法小量提取烟草叶片基因组。以该基因组为模板, 分别设计*GFP*和*ZmSH1*引物进行PCR, 引物序列见表1。将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 筛选得到阳性植株。

### 1.2.4 制片与观察

对于瞬时转化烟草, 剪下叶片, 在载玻片上滴一滴去离子水, 用镊子由外向内撕取烟草针孔周围被侵染组织近轴面(上表面)薄层组织, 将撕片在水中平铺展开, 切去较厚部分, 用盖玻片沿一侧缓缓盖住样本, 尽量保证无气泡且标本无褶皱。用滤纸覆盖盖玻片, 大拇指轻轻按压同时吸除多余水分, 此处选用Fisher的载玻片和盖玻片(规格1.5)。用指甲油封住盖玻片四周, 做标记, 晾干。分别采用激光共聚焦显微镜和超分辨率显微镜观察。对于稳定转化烟草, 将叶片背面直接撕片, 注意撕片时尽量避免叶脉, 其它步骤同上。

## 2 结果与讨论

### 2.1 含*ZmSH1*基因重组载体的转化农杆菌的获得

为制备含*ZmSH1*基因重组载体的转化农杆菌, 本实验设计了pCAMBIA1302-35S-*ZmSH1*-*GFP*架构(图1A)。利用*GFP*作为荧光报告基因, 采用基因工程方法, 将编码*ZmSUS-SH1*的基因*ZmSH1*连接到含有*GFP*编码基因*GFP*的载体上, 获得pCAMBIA1302-35S-*ZmSH1*-*GFP*重组质粒, 将其导入农杆菌EHA-105中。提取农杆菌质粒, 采用*SpeI*单酶切, 产物经琼

脂糖凝胶电泳检测, *SpeI*将质粒切割成*ZmSH1*和载体两部分, 表明*ZmSH1*基因存在于含有重组质粒的农杆菌中。将质粒送至公司测序, 结果提交至NCBI数据库中进行同源性比对, 结果与预期序列一致, 表明扩增片段为*ZmSH1*序列。

### 2.2 转重组质粒融合蛋白的阳性植株的获得

为了获得含pCAMBIA1302-35S-*ZmSH1*-*GFP*重组质粒融合蛋白的阳性植株, 本实验采用农杆菌侵染法进行转化。稳定转化采用烟草叶盘法进行侵染, 之后组织培养获得愈伤组织, 分化后得到植株, 将其移植到生根培养基。以叶片基因组为模板, 分别用*ZmSH1*引物和*GFP*引物(表1)进行PCR扩增, 琼脂糖凝胶电泳(图1B1, B2), PCR产物大小与预期一致, 表明融合载体成功转入植株。分别提取转基因和野生型植株叶片总mRNA, 反转录得到cDNA, 用*GFP*引物进行RT-PCR反应, 结果如图1C所示。实验结果表明已成功获得稳定转化含有目的基因的烟草阳性实验材料, 融合蛋白表达。

### 2.3 活细胞显微镜制片

为了保证观察到的视野为单层植物活细胞, 本实验采用撕片制片法(图2)制作标本。选取叶片长大于10 cm的成熟烟草植株叶片(图2A), 用镊子从靠近叶脉一侧向中心快速撕取叶表皮单层细胞(图2C)。将撕取的标本在洁净载玻片中央的水中平铺展开, 切去多余部分(图2B, D), 沿一侧缓缓盖上盖玻片(图2E)。为确保标本与盖玻片之间无气泡, 在盖玻片上铺滤纸并用拇指按压, 吸除多余水分(图2F)。用指甲油封住盖玻片四周(图2G)。制备好的撕片标本周围液体充足、不干燥, 透光性好, 可用于显微成像。

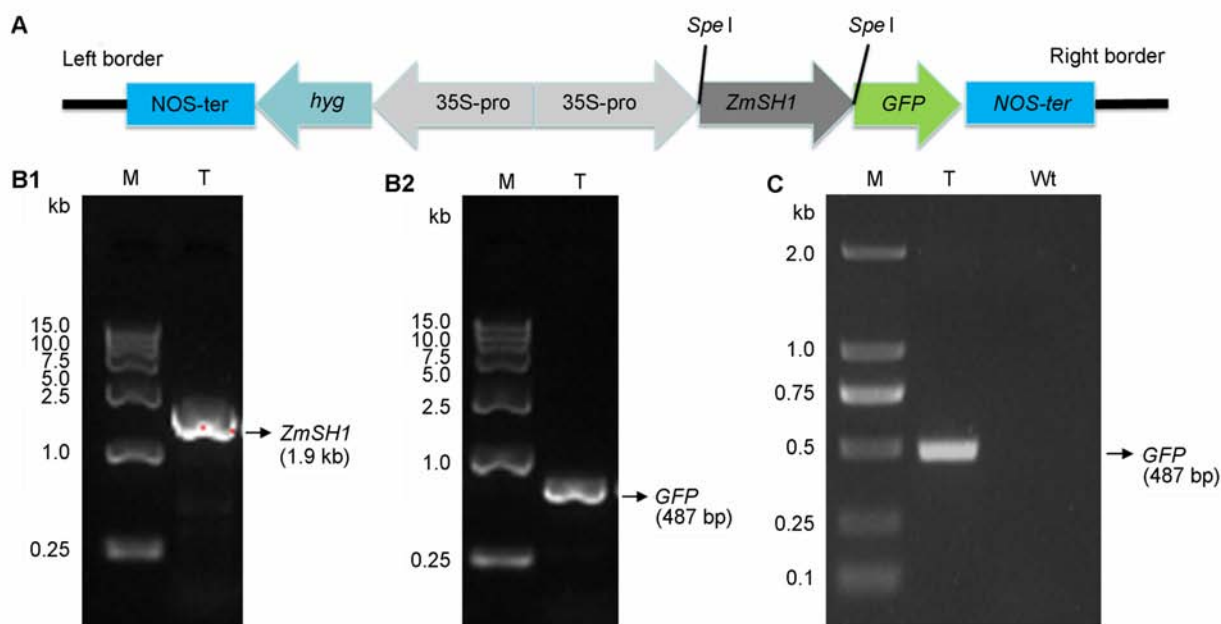
### 2.4 融合蛋白的亚细胞初级定位

为验证含*GFP*的融合荧光蛋白信号强度是否可用于

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene names	Application	Amplification length (bp)	Sequence (5'–3')	
<i>Zea mays</i> sucrose synthase ( <i>ZmSH1</i> )	PCR	1 900	SH1-L1	ATGCCTCCTTTTCCTCGTCCT
			SH1-R1	CTCACGTACTTCCAGAACCCG
Green fluorescence protein ( <i>GFP</i> )	PCR	487	GFP-L2	TTCGGTTATGGTGTTCATGCCTGTT
			GFP-R	ACAAACTCAAGAAGGACCA



**图1** 融合蛋白基因表达载体的构建和外源基因的表达

(A) 融合蛋白基因表达架构示意图; (B) 转融合蛋白基因烟草的PCR鉴定, 用*ZmSH1*引物(B1)和*GFP*引物(B2)进行PCR扩增的产物的琼脂糖凝胶电泳图谱; (C) 融合基因在烟草中表达的RT-PCR验证。M: Marker; T: 转基因植株; Wt: 野生型植株

**Figure 1** Construction and validation of fusion reporters

(A) Schematic representation of the fusion protein vector; (B) Electrophoretic assay of PCR products from the transgenic tobacco leaves with *ZmSH1* (B1) and *GFP* (B2) primers respectively; (C) RT-PCR validation of the fusion protein gene expression in the transgenic tobacco. M: Molecular weight size marker; T: Transgenic tobacco; Wt: The wild-type tobacco as a control

成像, 检测植物活细胞标本制片效果, 初步观察融合蛋白的亚细胞定位情况。本实验将活细胞标本置于DeltaVision Olympus激光扫描共聚焦显微镜下进行初级定位, 用488 nm激发光照射, 采用100X油镜在距离物镜8.582–8.594 mm处可观测到最佳效果, 如图3所示。

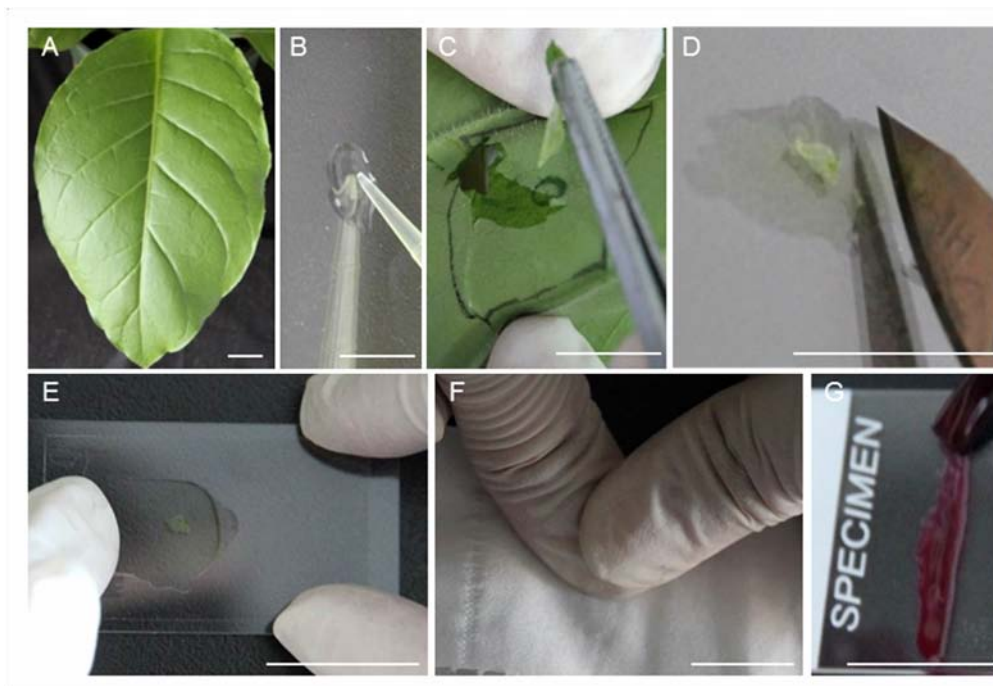
由图3可知, 植物活细胞撕片标本无褶皱无重叠, 为含有细胞壁的单层植物细胞(图3D1–D3), 叶绿体清晰可辨(图3B1–B3), 表明撕片制片法可用于植物活细胞成像; 稳定转化烟草实验中转基因植株融合蛋白绿色荧光较强, 能够清晰分辨荧光信号(图3A2), 绿色融合蛋白与叶绿体中叶绿素自发荧光叠加场中, 绿色与红色基本重叠(图3C2); 瞬时转化烟草实验中转入融合蛋白的实验结果与稳定转化结果一致(图3A3, C3)。瞬时转化*GFP*时绿色荧光呈弥散状(图3E); 在野生型植株中未观测到绿色荧光(图3A1, C1), 表明不含目的蛋白的空载体上没有细胞器定位基因, 重

组融合蛋白被初步定位在植物表皮细胞叶绿体中。

## 2.5 DeltaVision OMX对融合蛋白的精细定位

重组的融合荧光蛋白被初步定位在植物表皮细胞叶绿体中, 但在叶绿体内部的具体位置有待进一步证明。为探究融合蛋白在叶绿体内部的精细定位, 本实验采用超分辨率显微成像技术, 利用DeltaVision OMX超分辨率显微镜的SI模式进行固定细胞成像, 在488 nm激发光下, 用Resolve3D软件模拟荧光信号运算, 如图4所示。

图4中植物活细胞撕片标本叶绿体完整, 内部基粒结构清晰可辨, 呈有规律的堆叠状排布, 表明叶绿体完好(图4B1, B2), 融合荧光蛋白和叶绿素自发荧光信号均较强(图4A1, A2, B1, B2), 可以清晰区别叶绿体基粒和融合蛋白位置, 无光融合变色现象(图4C1, C2), 表明该撕片方法可以应用于OMX超分辨率成像; 融合蛋白的绿色荧光包裹在叶绿体基粒中叶



**图2** 撕片标本制作流程

(A) 选取成熟烟草叶片; (B) 在载玻片中央滴一滴水; (C) 用镊子由外向内撕取表皮, 将标本在水中展开; (D) 切去多余部分; (E) 沿一侧盖上盖玻片; (F) 拇指按压除去气泡; (G) 指甲油封片。Bar=1.5 cm

**Figure 2** Flow chart of specimen preparation

(A) Select mature tobacco leaves; (B) Place a drop of water onto a microscope slide; (C) Tear the leaf epidermis with a forceps in an orientation from the leaf edge inwards; (D) Take the thinnest part as the specimen by cutting off the excessive tissue; (E) Place the coverslip onto the specimen carefully to avoid trapping air; (F) Press the coverslip gently with the thumb to remove air bubbles; (G) Seal the coverslip with nail varnish. Bar=1.5 cm

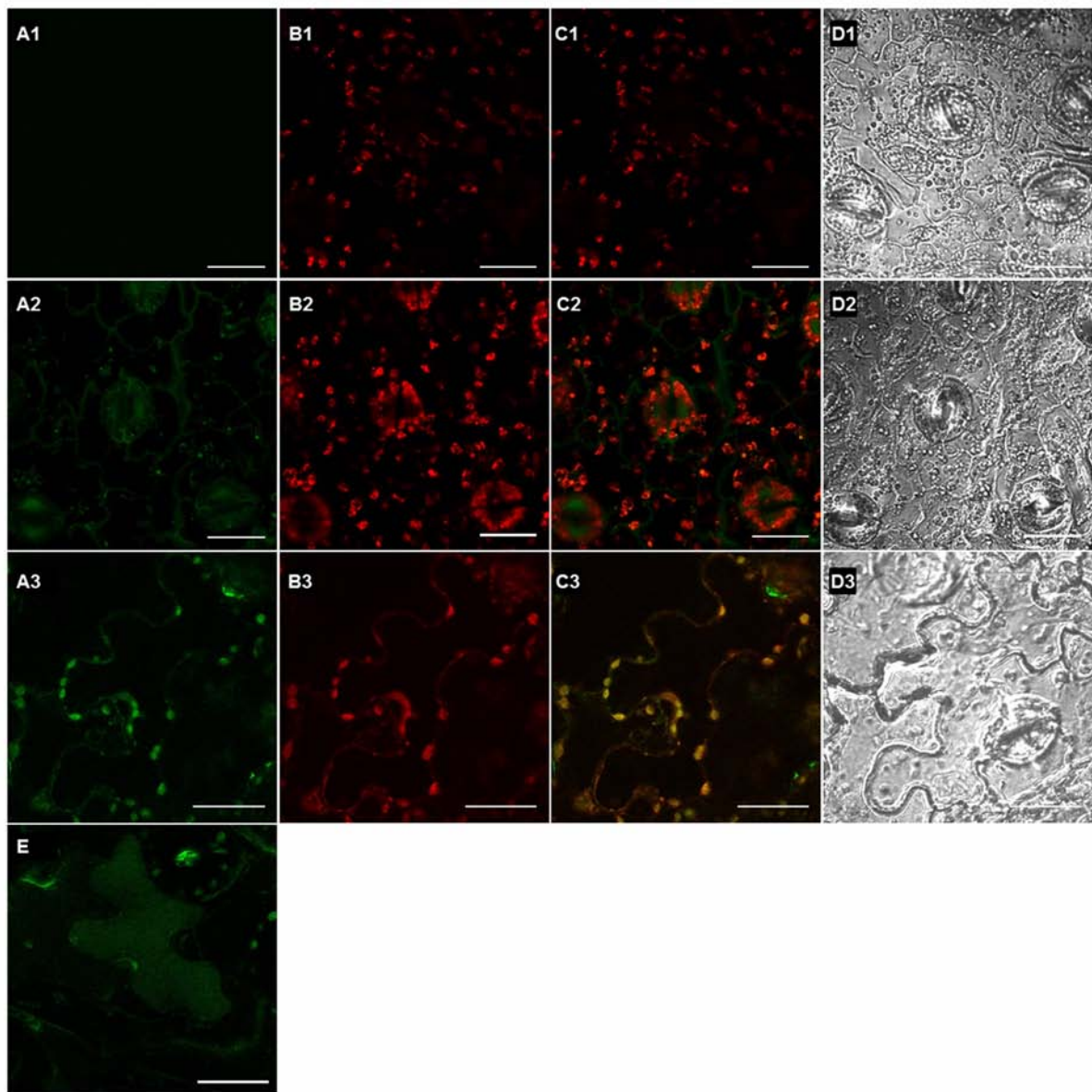
绿素自发荧光的外侧(图4), 表明融合蛋白定位在转化植株表皮细胞叶绿体基粒周围。该结果说明采用DeltaVision OMX的SI模式成像, 能够观测到叶绿体内部精细结构; 软件重构效果直观、清晰、生动, 可以根据要求在空间旋转、缩放(图4C1–C6)或进行自由切割(图4D1–D3, E), 甚至可以导出3D动画格式, 实现了将融合蛋白在植物活细胞亚细胞器中的精细定位。

## 2.6 讨论

计算自动化和光学元件的发展使显微镜成为现代生物学必不可少的研究仪器(Swedlow, 2012)。基于衍射的莫阿干涉效应原理的超分辨率3D-SIM显微成像技术, 克服了传统光学显微镜中存在的诸如衍射等瓶颈问题。DeltaVision OMX基于该技术, 加配温控系

统, 采用Linux工作站自动收集、处理数据, 集照明、成像、软件操控和定位标本于一体(Dobbie et al., 2011)。该技术具有以下优点: 时空分辨率高; 同时多通道成像且荧光干扰低(Swedlow, 2012); 3D重构效果清晰、直观生动; 可实现模型任意角度旋转、切割, 甚至导出3D动画格式。由于仪器造价较高, 其标本制作完成后建议在激光显微镜下观测到荧光信号后再利用DeltaVision OMX成像。目前在应用DeltaVision OMX方面处于国际前沿的有加利福尼亚大学、柏林洪堡大学、牛津大学生物化学实验室、伦敦帝国学院细胞和分子生物学部、邓迪大学、普林斯顿大学、冷泉港实验室、慕尼黑大学和剑桥大学等, 国内中国科学院和吉林大学药学院应用较多。

DeltaVision OMX对成像样本要求较宽泛, 在制片上除了要求盖玻片(Fisher)厚度规格为1.5(约0.17 mm)、

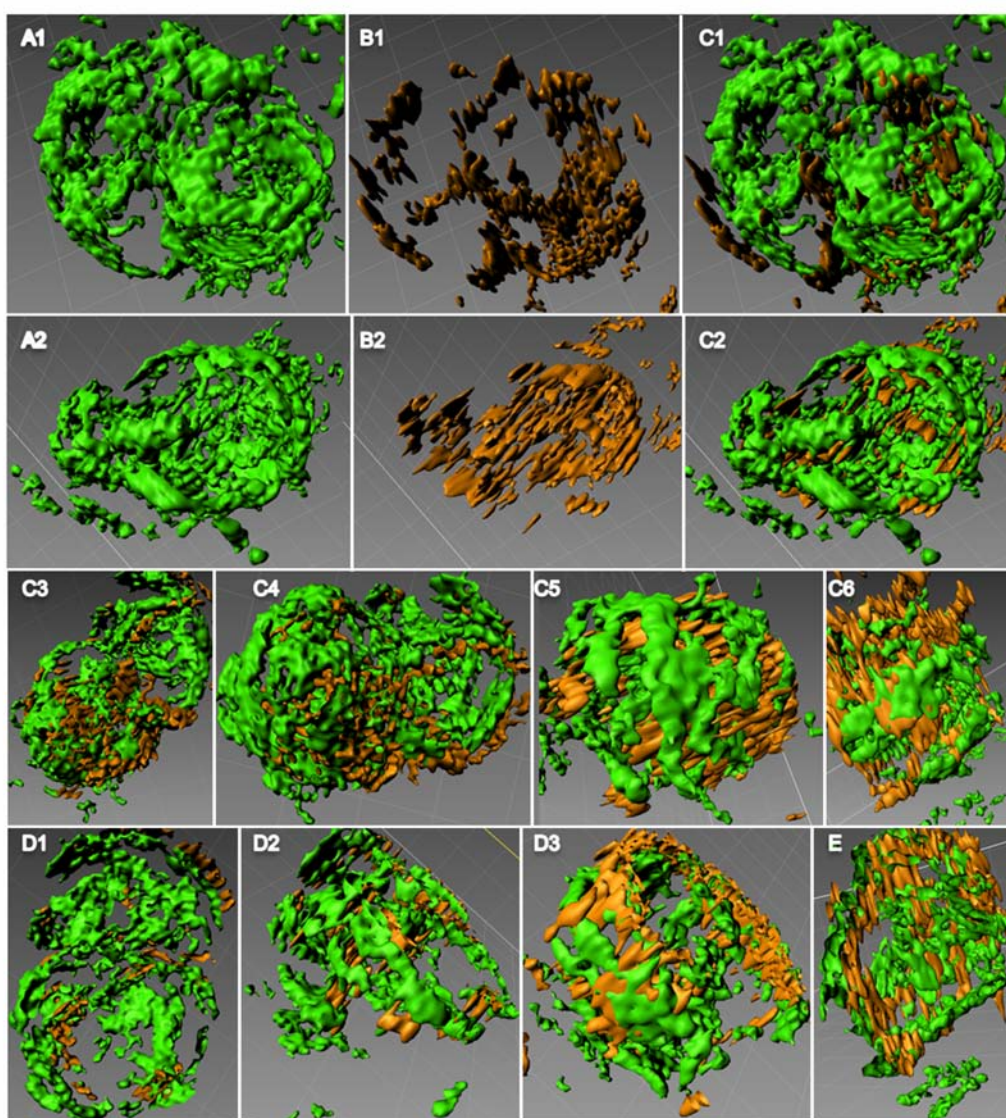


**图3** 烟草叶片表皮细胞激光共聚焦成像

采用DeltaVision Olympus激光扫描共聚焦显微镜488 nm激光, 100X油镜, 距离物镜8 582–8 594  $\mu\text{m}$ 处观察得到。(A1), (B1), (C1), (D1) 未转化烟草成像; (A2), (B2), (C2), (D2) 瞬时转化融合蛋白标本成像; (A3), (B3), (C3), (D3) 稳定转化融合蛋白标本成像; (E) 瞬时转化GFP标本成像。图A2和A3为激发光下融合蛋白的荧光成像; 图B1–B3为激发光下叶绿体自发荧光成像; 图C1–C3为激发光下绿色荧光蛋白和叶绿体自发荧光; 图D1–D3为可见光下表皮细胞成像。Bar=20  $\mu\text{m}$

**Figure 3** Confocal imaging of tobacco epidermal cells

Images were taken by DeltaVision Olympus scanning confocal microscope with the lens to sample distance between 8 582 and 8 594  $\mu\text{m}$  upon excitation with a 488 nm laser. (A1), (B1), (C1), (D1) Images of non-transgenic tobacco epidermal cells; (A2), (B2), (C2), (D2) Images of the *ZmSH1-GFP* transiently transformed tobacco epidermal cells; (A3), (B3), (C3), (D3) Images of the stably transformed tobacco epidermal cells; (E) Image of *GFP* transiently transformed tobacco epidermal cells. Figures A2 and A3 are the fusion protein images taken upon excitation; Figures B1–B3 are chlorophyll autofluorescence taken upon excitation; Figures C1–C3 are the overlapping images of the fusion protein fluorescence and the chlorophyll autofluorescence taken upon excitation; Figures D1–D3 are the tobacco epidermal cell images taken under the visible light. Bar=20  $\mu\text{m}$



**图4** 转融合蛋白基因烟草表皮细胞标本超分辨率显微镜成像

采用DeltaVision OMX超分辨率显微镜, 在488 nm激发光下, 经软件将荧光信号重构得到的图像。(A1), (A2) 不同角度成像的融合蛋白; (B1), (B2) 叶绿素自发荧光; (C1)–(C6) 相对应两者图像的叠加图像; (D1)–(D3) 上述叠加图像的横切图像; (E) 上述叠加图像的纵切图像。

**Figure 4** The super-resolution images of ZmSUS-SH1-GFP fusion protein in transgenic tobacco epidermal cells

Images were taken by DeltaVision OMX Super-resolution microscopes upon excitation with a 488 nm laser. (A1), (A2) Images of different viewing angles of the fusion protein fluorescence; (B1), (B2) Chlorophyll autofluorescence; (C1)–(C6) The corresponding overlapping images of the above two channels; (D1)–(D3) The latitudinal section of the images C; (E) The longitudinal one.

标本尽量薄(Dobbie et al., 2011)以外无其它特殊要求。由于植物细胞具有细胞壁, 无法像动物细胞一样贴壁生长而形成单层细胞, 因此本实验采用撕片法制片。该方法操作时应注意: (1) 烟草叶片长度应大于

10 cm, 撕取表皮细胞时要快, 减少细胞暴露在空气中的时间, 防止细胞失水萎蔫, 保证荧光蛋白活性以确保标本成像清晰、客观; (2) 撕片大小应适宜, 过大不易获取单层细胞, 过小不易于制片和观察; (3) 撕

片应避开叶脉,方向为从外侧向中心,由快到慢、由重到轻撕取,保证撕到最后为单层细胞;(4)展开标本时可用刀刃辅助轻轻将标本尽量铺平,注意不要将标本划伤;(5)加盖玻片(规格1.5)时沿一侧缓缓盖下,使标本尽量不移动、无褶皱,用镊子轻轻敲打或用拇指按压赶走气泡时注意控制力度,不要将盖玻片压碎;(6)封片选用的指甲油要求密封性好、速干。撕片标本制作完成后为单层细胞,无褶皱、无气泡,标本周围液体充足不干燥、透光性好,即可用于显微成像。撕片法比切片法能够更完整真实地反映活细胞形态、保证细胞活性,不会因机械损伤导致细胞内亚细胞器破裂使蛋白释放或失活,样本前期处理相对简单,省去了传统制片需要浸蜡、切片等过程,较为经济实用。图3中标本为单层细胞,无褶皱无重叠;图4中能够清晰看到叶绿体较完整,基粒呈有规律堆叠,表明上述撕片制片方法可应用于OMX成像。

综上,本研究首次采用DeltaVision OMX超分辨率显微镜成功将淀粉代谢关键酶ZmSUS-SH1定位在植物叶绿体基粒周围,建立了一套基于撕片制片法的简便OMX显微镜制片方法。由于植物细胞具有细胞壁,无法像动物和微生物细胞那样在DeltaVision OMX的CO<sub>2</sub>观察室内贴壁培养实现连续观测,今后的研究可以尝试使用植物细胞悬浮系培养或分离质体、细胞器等方法培养含有融合蛋白的细胞,进而制片观察。目前,DeltaVision OMX在植物中的应用方案,如亚细胞器标记方法、能否将植物细胞进行活体连续培养观察蛋白质运动情况等问题仍需继续探索。本研究为结构成像显微技术在植物细胞亚细胞中蛋白质的精细定位提供了新的思路,将超分辨率显微镜应用于植物蛋白质的亚细胞定位是未来的发展趋势。

## 参考文献

- 龚燕华, 彭小忠 (2010). 蛋白质相互作用及亚细胞定位原理与技术. 北京: 中国协和医科大学出版社. pp. 210–234.
- 李楠, 王黎明, 杨军 (1996). 激光共聚焦显微镜的原理和应用. 军医进修学院学报 17, 232–234.
- 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振 (2006). 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展. 华北农学报 21(增刊), 1–6.
- 赵启韬, 苗俊英 (2003). 激光共聚焦显微镜在生物医学研究中的应用. 北京生物医学工程 22, 52–54.

- Brown ACN, Oddos S, Dobbie IM, Alakoskela JM, Parton RM, Eissmann P, Neil MAA, Dunsby C, French PMW, Davis I, Davis DM (2011). Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super resolution microscopy. *PLoS Biol* 9, 1–18.
- Coltharp C, Xiao J (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cell Microbiol* 14, 1808–1818.
- Dickerson D (2010). A study of chromatin dynamics during transcription by fluorescence light microscopy. Doctoral Thesis. Dundee: University of Dundee.
- Dobbie IM, King E, Parton RM, Carlton PM, Sedat JW, Swedlow JR, Davis I (2011). OMX: a new platform for multimodal, multichannel wide-field imaging. In: Goldmam RD, ed. *Live Cell Imaging*, 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 898–909.
- Gustafsson MGL (2008). Super-resolution light microscopy goes live. *Nat Methods* 5, 385–387.
- Gustafsson MGL, Shao L, Carlton PM, Wang CJR, Golubovskaya IN, Cande WZ, Agard DA, Sedat JW (2008). Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* 94, 4957–4970.
- Masters BR (2010). The development of fluorescence microscopy. *eLS* 1–9, doi: 10.1002/9780470015902.a0022-093.
- Minden JS, Agard DA, Sedat JW, Alberts BM (1989). Direct cell lineage analysis in *Drosophila melanogaster* by time-lapse, three-dimensional optical microscopy of living embryos. *J Cell Biol* 109, 505–516.
- Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MGL, Leonhardt H, Sedat JW (2008). Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* 320, 1332–1336.
- Seabold GK, Wang PY, Petralia RS, Chang K, Zhou A, McDermott MI, Wang YX, Milgram SL, Wenthold RJ (2012). Dileucine and PDZ-binding motifs mediate synaptic adhesion-like molecule 1 (SALM1) trafficking in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287, 4470–4484.
- Swedlow JR (2012). Innovation in biological microscopy: current status and future directions. *BioEssays* 34, 333–340.
- Tanos BE, Yang HJ, Soni R, Wang WJ, Macaluso FP, Asara JM, Tsou MFB (2013). Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initia-

tion. *Genes Dev* **27**, 163–168.

**van de Corput MPC, de Boer E, Knoch TA, van Cappellen WA, Quintanilla A, Ferrand L, Grosveld FG** (2012).

Super-resolution imaging reveals three-dimensional folding dynamics of the  $\beta$ -globin locus upon gene activation. *J Cell Sci* **125**, 4630–4639.

**Weil TT, Xanthakis D, Parton R, Dobbie I, Rabouille C,**

**Gavis ER, Davis I** (2010). Distinguishing direct from indirect roles for *bicoid* mRNA localization factors. *Development* **137**, 169–176.

**Zheng CY, Wang YX, Kachar B, Petralia RS** (2011). Differential localization of SAP102 and PSD-95 is revealed in hippocampal spines using super-resolution light microscopy. *Commun Integr Biol* **4**, 104–105.

## Using 3D-SIM Structure Illumination Microscope to Localize Proteins in Plant Subcellular Compartments

Yue Liu<sup>1</sup>, Yuejia Yin<sup>2</sup>, Chongyang Liang<sup>3</sup>, Dianshuai Huang<sup>3</sup>, Yang Wang<sup>4</sup>, Yanzhi Liu<sup>2</sup>, Yao Dou<sup>2</sup>, Shudan Feng<sup>4</sup>, Dongyun Hao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; <sup>2</sup>Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; <sup>3</sup>Institute of Frontier Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; <sup>4</sup>College of Life Sciences, Harbin Normal University, Harbin 150080, China

**Abstract** The information on protein subcellular localization is important to elucidate protein function, and imaging technology is one of the important approaches to visualize protein localization. However, conventional microscopy techniques can barely resolve details of subcellular structures mainly because of the auto-fluorescence interference with their limited imaging resolution. In recent years, super-resolution optical imaging technologies have been successfully used in human and animal cell research for their 8-fold higher spacial resolution over laser confocal microscopy. Application of these technologies in plant cells has not been reported, probably due to the peculiarity of plant cells. Here, we report the successful use of DeltaVision OMX microscope technology for visualizing *Zea mays* sucrose synthase 1 (ZmSUS-SH1) around chloroplast grana in transgenic tobacco epidermal cells. OMX microscopy can overcome the cellular chlorophyll fluorescence interference in imaging fluorescent fusion proteins. We also developed an optimized sample preparation protocol for using DeltaVision OMX microscope technology with plant materials.

**Key words** fluorescent proteins, OMX, plant subcellular localization, super-resolution microscopy

**Liu Y, Yin YJ, Liang CY, Huang DS, Wang Y, Liu YZ, Dou Y, Feng SD, Hao DY** (2015). Using 3D-SIM structure illumination microscope to localize proteins in plant subcellular compartments. *Chin Bull Bot* **50**, 495–503.

---

\* Authors for correspondence. E-mail: sdf6616@163.com; dyhao@cjaas.com