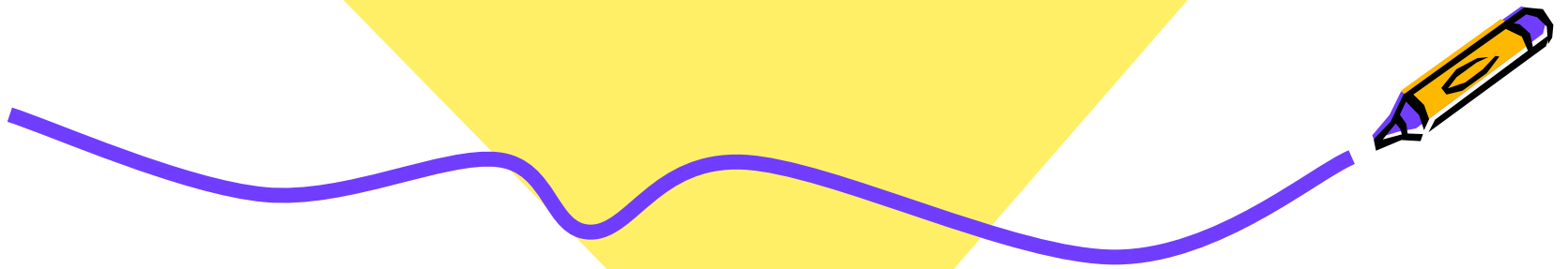


# XI. Observation on cytoskeleton



# A、dye by Coomassie blue



## 【Purpose】

掌握用考马斯亮蓝（Coomassie blue）  
R250染色法观察植物细胞骨架的方法。

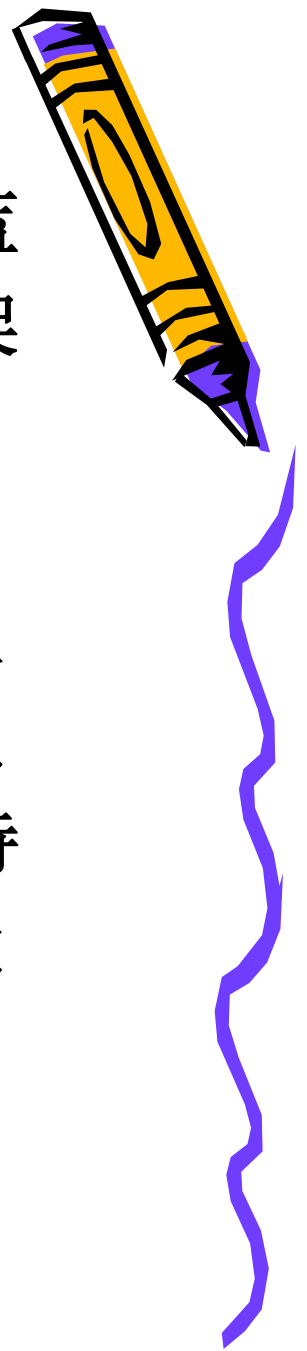


# 【Principle】

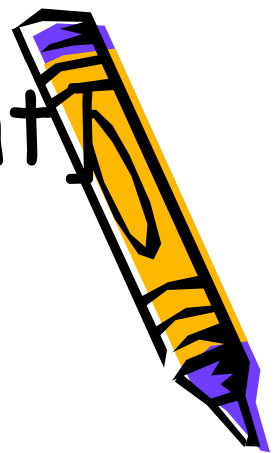
- **细胞骨架(Cytoskeleton) 组成**：主要包括微管、微丝和中间纤维以及核骨架-核纤层体系。微管主要分布在核周围，呈放射状向四周扩散，微丝主要分布于细胞质膜的内侧，而中间纤维则分布在整个细胞中。
- **细胞骨架作用**：具有维持细胞形态结构和内部结构的有序性、参与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递和细胞分裂等重要功能。
- **细胞骨架的研究方法**：**考马斯亮兰R250染色法、荧光素标记的鬼笔环肽染色法、间接免疫荧光法等。**



- **考马斯亮蓝R250染色法的原理：**考马斯亮蓝R250可以对各种蛋白质进行染色。细胞骨架有一个特性，即用非离子去垢剂（如Triton X-100）处理时，可以保持非溶解状态。当用这类试剂处理细胞时，细胞内其它可溶性的物质和膜成分都被抽提出来，只留下细胞骨架。考马斯亮蓝R250虽不能对微丝进行特异性染色，但当其它蛋白成分被抽提后，就能清晰地显示微丝束的形态。



# [Apparatus, material and reagent]



- 光学显微镜；烧杯、吸管、镊子、玻片染色缸、载玻片、盖玻片；
- 新鲜洋葱鳞茎；
- 6mM磷酸盐缓冲液（pH6.8）、M缓冲液、1%Triton X-100、0.2%考马斯亮蓝R250、3%戊二醛。

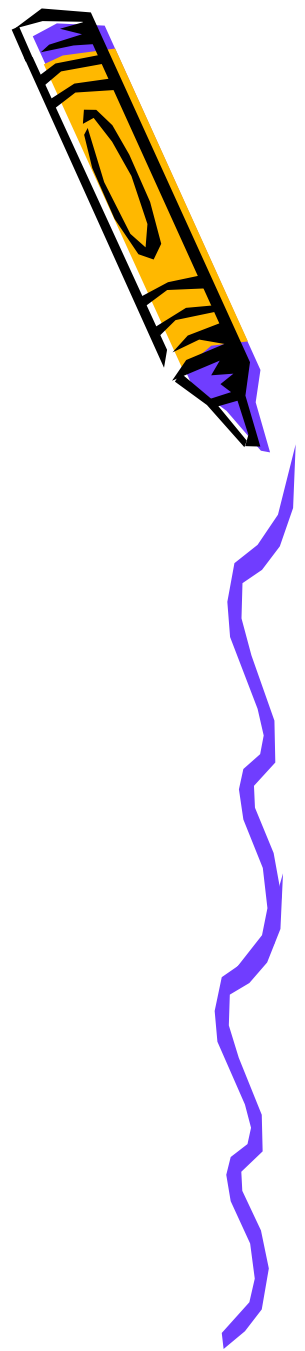
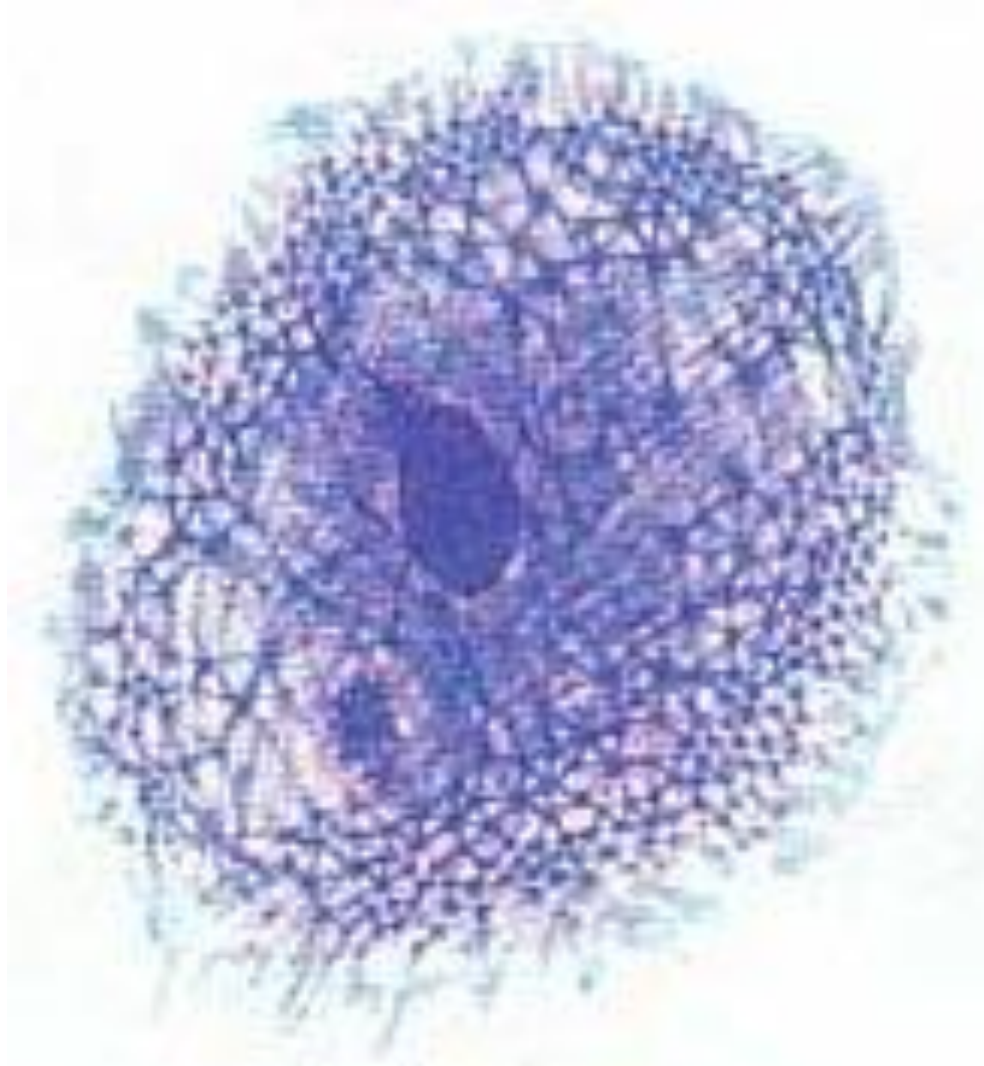


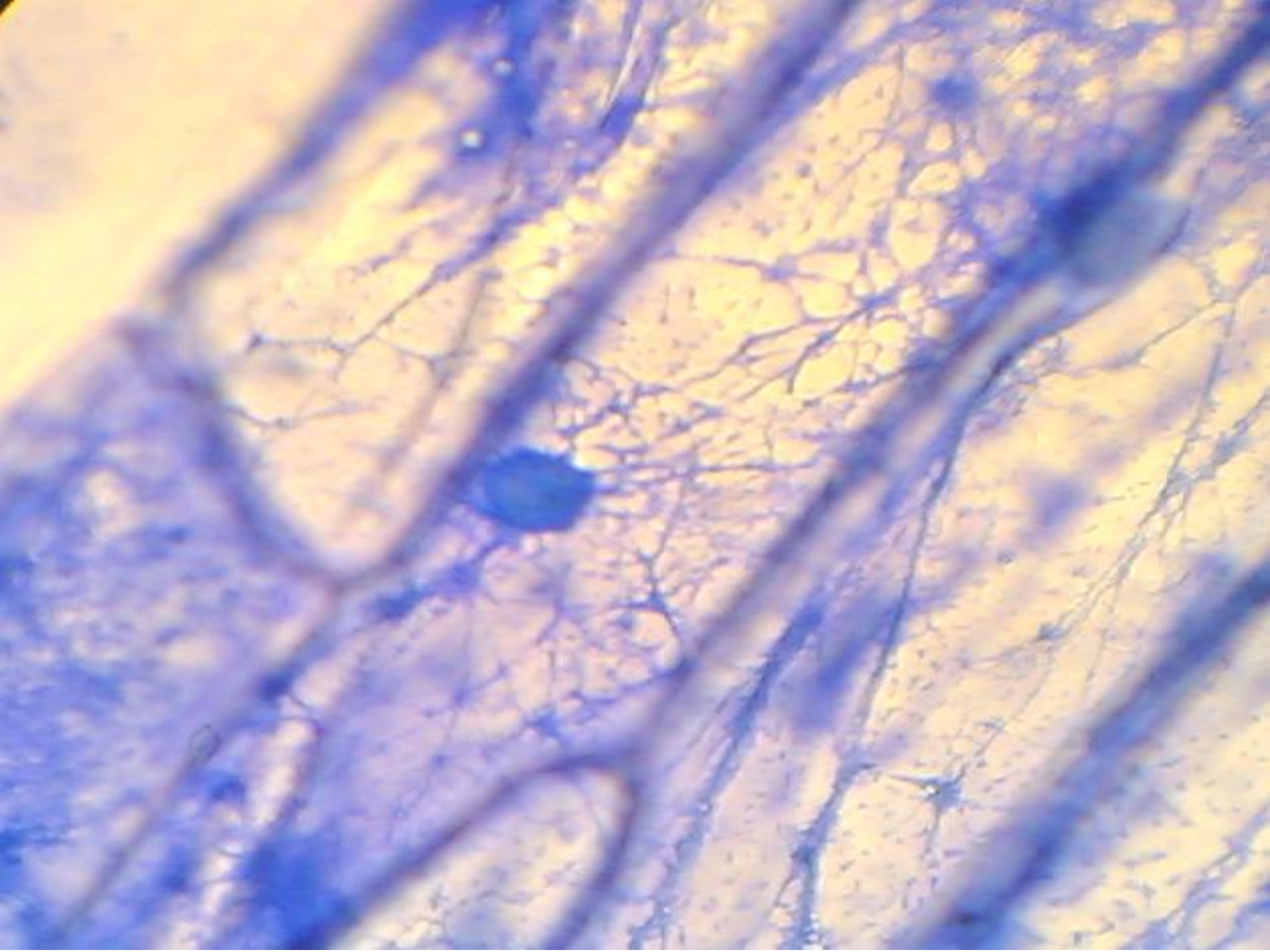
# [experiment protocol]

- 1、撕取洋葱鳞茎内表皮(约1平方厘米)置于2~3ml pH6.8 磷酸缓冲液中待其下沉(烧杯1)；
- 2、用2~3ml 1% Triton X-100处理20 min(烧杯1)；
- 3、吸去Triton X-100，用M缓冲液2~3ml洗2次，每次5 min (烧杯1)；
- 4、2~3ml 3%戊二醛固定40 min(烧杯2)；
- 5、pH6.8磷酸缓冲液2~3ml洗2次，每次5 min，滤纸吸去残液(烧杯1)；
- 6、2~3ml 0.2%考马斯亮蓝R250染色15分钟，然后用蒸馏水小心冲洗1~2次(烧杯1)；
- 7、将表皮铺放在载玻片上，加盖玻片，在高倍显微镜或者油镜下进行观察。



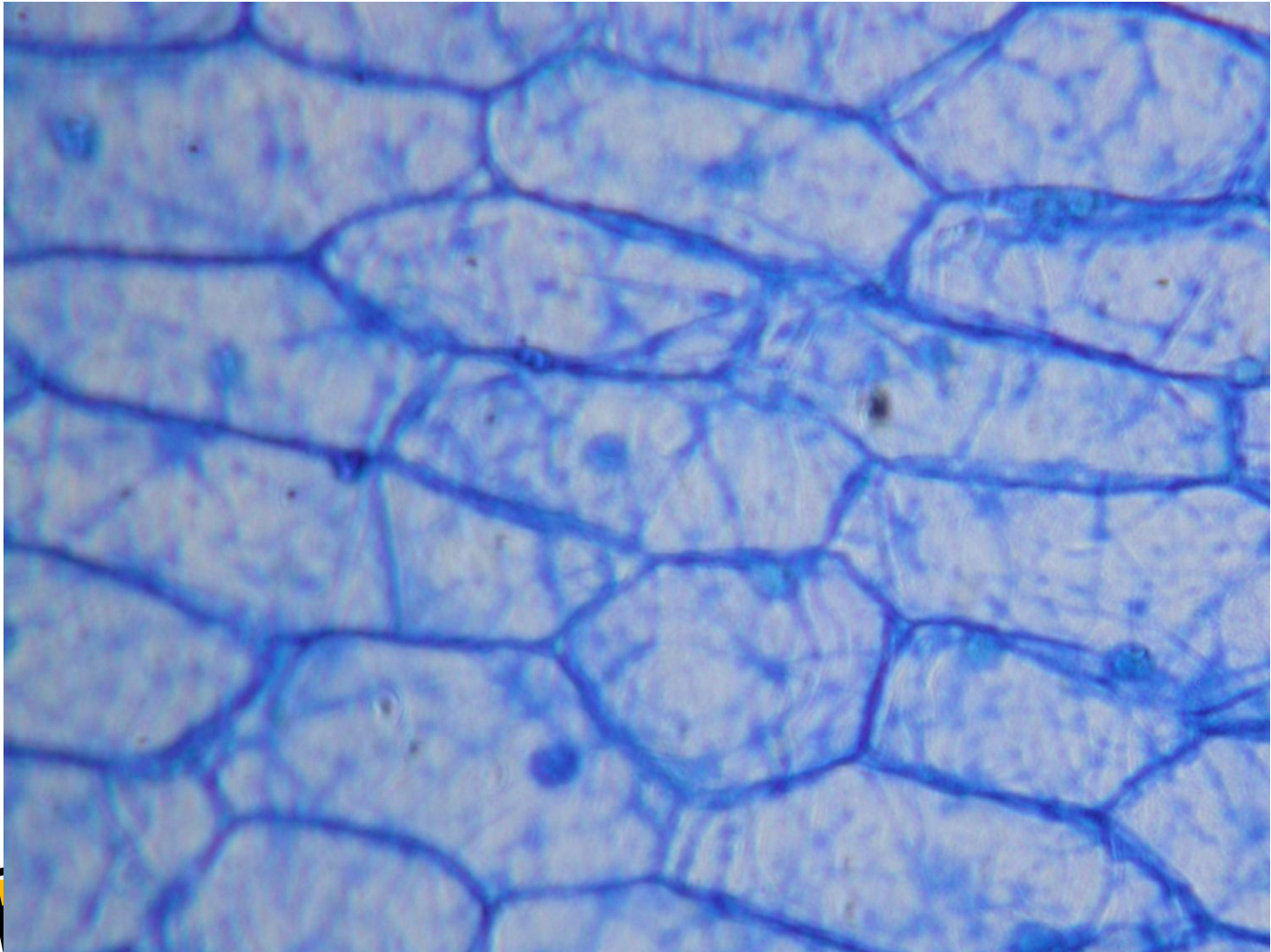
# cytoskeleton







# Cytoskeleton of onion cell



## B、 dye by Rhodamine-Phalloidin

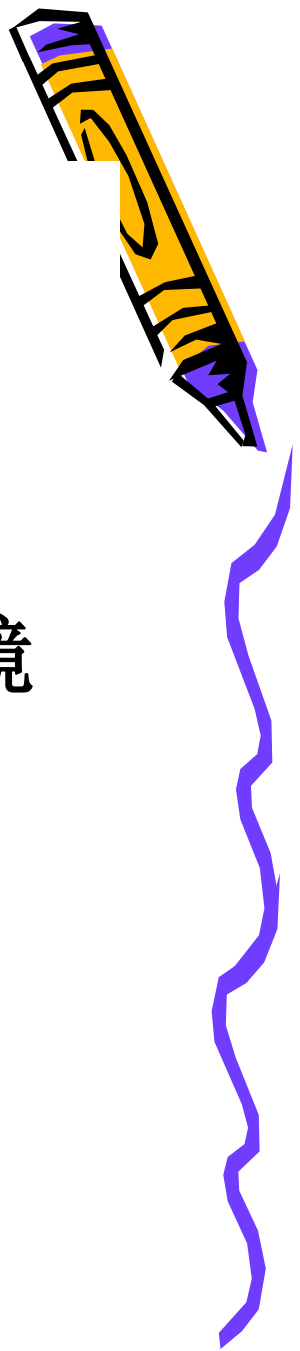
【purpose】

熟悉细胞骨架固定染色的方法，掌握用荧光标记的鬼笔环肽显示微丝的原理和方法。



# 【principle】

鬼笔环肽能够特异地与微丝紧密结合。  
荧光标记的鬼笔环肽能够在荧光显微镜  
下显示微丝的形态和结构。



# [apparatus, material and reagent]

- 光学显微镜；烧杯、吸管、镊子、玻片染色缸、载玻片、盖玻片；
- 新鲜洋葱鳞茎；
- 试剂
  1. **细胞骨架稳定液**(CSB , pH 6.1): 10 mM MES; 138 mM KCl; 3 mM MgCl; 2 mM EGTA; 0.4M 甘露醇
  2. **PBS**: 含0.1% 的TritonX-100
  3. **封闭液**: PBS; 0.1% Triton X-100; 2% BSA
  4. **微丝荧光染料**: 0.4  $\mu\text{g/ml}$ 罗丹明标记的鬼笔环肽 (Rhodamine-Phalloidin) (用封闭液配制; 贮存液为0.2mg/ml, 临用前稀释)
  5. **封片液**: PBS; 0.1% p-phenylenediamine(抗淬灭剂); 90% 甘油

# Experiment protocol

1. 撕取洋葱内表皮,用**5ml**含有**0.25%**戊二醛和**0.25%** Triton X-100的**CSB**处理**1-2分钟**(烧杯1);
2. .0
3. 用**5ml**含有**1%**戊二醛的**CSB**固定**20分钟**(烧杯2);
4. 用**5ml**含有**0.1%NaBH<sub>4</sub>** 和**0.1% Triton X-100**的**PBS**清洗**10分钟**(临用前配置)(烧杯3);
4. 用**5ml**含有**0.1% Triton X-100**的**PBS**清洗两遍, 每次**5分钟**(烧杯4);
5. 用**5ml**封闭液处理**10分钟**(烧杯4);
6. 用**0.3ml** 的**0.4 μg/ml**荧光染料**避光**染色**20分钟**(EP管);
7. 用**5ml**含有**0.1% Triton X-100**的**PBS**清洗两遍, 每次**5分钟**(烧杯4);
8. 在载玻片上滴加**1-2滴**封片液, 将洋葱表皮平铺其上, 盖上盖玻片。荧光显微镜下观察。

# 肌肉细胞微丝染色

