植物学报 *Chinese Bulletin of Botany* 2025, **60** (1): 90–100, www.chinbullbotany.com
doi: 10.11983/CBB24040 cstr: 32102.14.CBB24040

·技术方法·

植物细胞质膜有序性的活细胞定量分析

陈秀秀[1, 2, 3], 唐玲[1, 2, 3], 胡文佳[1, 2, 3], 杨照麟[1, 2, 3], 邓馨[1, 2], 王晓华[1, 2*]

[1]中国科学院植物研究所, 植物多样性与特色经济作物全国重点实验室, 北京 100093; [2]国家植物园, 北京 100093
[3]中国科学院大学, 北京 100049

摘要 质膜微区是细胞质膜上富含甾醇和鞘磷脂的微结构域, 参与信号转导、囊泡转运、胞吞和胞吐等众多生物学过程, 因此质膜微区动态过程是植物细胞生物学研究的重要领域之一。荧光探针结合荧光显微镜被广泛应用于检测植物活细胞状态。PA (push-pull pyrene)是一种基于芘的新型、高效且稳定的荧光探针, 但在植物活细胞成像研究中应用极少。该研究利用PA探针和激光共聚焦显微镜技术, 结合图像处理和极性归一化数值作图法对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根中活细胞质膜的有序度进行了定量分析, 发现PA探针在拟南芥根细胞质膜中的液态有序相的发射光谱为500–550 nm, 液态无序相的发射光谱为580–700 nm。使用甾醇抽提剂MβCD处理野生型拟南芥可使质膜的有序度降低。缺乏甾醇合成关键的甲基转移酶双突变体*smt2*/*smt3*质膜的有序度与经甾醇抽提剂MβCD处理的野生型株系质膜一致。*smt2*/*smt3*突变体根毛细胞质膜的有序度低于野生型, 表明甾醇作为膜微区的关键组分在调节质膜的有序度上发挥重要作用。该研究为检测植物活细胞质膜动力学特征和质膜微区变化提供了一种直观且快速的检测手段。

关键词 PA探针, 植物甾醇, 质膜微区, 活细胞荧光成像, 质膜有序性

陈秀秀, 唐玲, 胡文佳, 杨照麟, 邓馨, 王晓华 (2025). 植物细胞质膜有序性的活细胞定量分析. 植物学报 **60**, 90–100.

细胞是生命活动的基本单位, 通过一层薄膜结构将其内容物与外界环境分开, 这层薄膜被称为细胞质膜。细胞质膜(细胞膜)、内膜系统(核膜、内质网膜、溶酶体膜、高尔基体膜及液泡膜)和某些细胞器膜(线粒体膜、叶绿体膜及过氧化物酶体膜)统称为生物膜。除了水分, 生物膜主要由生物大分子脂类和蛋白质组成, 还有少量糖蛋白、糖脂和金属离子。细胞质膜是细胞内与外界环境间的关键界面, 在物质传送、信息传递、细胞识别、细胞免疫和代谢、保护细胞和维持细胞稳态等方面起重要作用(Zhang et al., 2019; Gerke et al., 2024)。细胞膜上存在各种受体蛋白, 它们能感知外界信号并将其转化为细胞内生化信号, 从而调节各种生理过程(Kusumi et al., 2012; Ivanov and Harrison, 2024)。脂质双分子层和膜蛋白起至关重要的作用。细胞质膜通过感知和响应环境变化, 触发细胞产生快速响应和适应性反应。此外, 细胞质膜是植物响应病原微生物侵染的第一道屏障, 定位于细胞膜的识别受体和膜蛋白能迅速辨识病原微生物, 并对其进一步定植和扩散起重要作用(Brown and London, 2000)。植物甾醇作为生物膜系统的关键成分, 不仅参与植物的生长发育, 还对生物和非生物胁迫(如病原体、盐碱和极端温度)做出响应。植物甾醇通过与膜脂组分互作, 提高脂双层的有序性和凝聚性, 改变膜的透性和流动性, 从而保证植物膜系统对环境的适应(罗鹏云等, 2023)。在生物膜结构研究中, Singer和Nicolson (1972)提出的流动镶嵌模型被广泛接受。该模型指出生物膜是由结构和功能不对称的脂双层构成, 蛋白质以镶嵌的形式分布在膜的表面与内部, 并能在膜内运动(Singer and Nicolson, 1972)。但该模型不能解释蛋白质分子对膜脂分子流动性的控制作用, 且忽视了细胞膜各部分脂质流动性的不均匀性等。1997年, 科学家提出了脂筏(lipid rafts)假说, 该假说指出脂筏是质膜上由磷脂、甾醇和蛋白质组成的高度动态的微结构域, 也称膜微区(membrane mi-

收稿日期: 2024-03-11; 接受日期: 2024-05-27
基金项目: 北京市自然科学基金(No.5222021)和国家自然科学基金(No.32170412)
* 通讯作者。E-mail: wangxh@ibcas.ac.cn

crodomain), 直径约10–100 nm (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000; Lingwood and Simons, 2010)。甾醇和鞘磷脂在质膜脂筏形成中起关键作用, 它们与饱和脂肪酸互作, 形成高度紧密的结构, 称为液态有序相(liquid ordered phase, Lo); 而与其它一些不饱和脂肪酸互作的磷脂形成比较松散的结构, 称为液态无序相(liquid disordered phase, Ld) (Munro, 2003)。甲基-β-环糊精(methyl-β-cyclodextrin, MβCD)是一种甾醇抽提剂, 施加MβCD后, 膜微区的流动性和无序性提高, 说明甾醇对膜微区的形成和维持具有重要作用(Roche et al., 2008; 左春山等, 2013; Mesmin et al., 2017)。当膜微区的流动性和无序度提高时, 固有无序蛋白(intrinsically disordered protein, IDP)通过相分离形成分子凝聚体, 进而使细胞质膜发生内陷形成无序度较高的内体(endosome), 这些蛋白在行使功能时具有类似液体的动态特性, 从而与周围环境进行快速的物质交换(Misteli, 2001; 赵晓玉, 2014; 黄鑫华等, 2023)。质膜微区富含受体和生物功能大分子, 在细胞生命活动中发挥多种重要的生物学功能, 如信号转导、囊泡转运、胞吞和胞吐平衡调节(Simons and Toomre, 2000; Zhang et al., 2019; 严旭等, 2022), 以及生物胁迫的防御反应(Hoppe et al., 2001; Carland et al., 2002; Lingwood and Simons, 2010; Kusumi et al., 2012; 董紫怡等, 2019)。近年来, 解析植物膜微区结构、功能和动态是植物细胞生物学研究的热点之一。

质膜微区的空间特征尺度大多在纳米量级, 而且结构高度动态变化, 已经远超出传统光学成像技术的空间分辨率(衍射)极限(~200 nm) (董紫怡等, 2019)。因此, 研究细胞膜原位各种微区的化学和物理性质仍是一项极具挑战性的任务。迄今为止, 研究人员已利用多种技术探索了膜微区的功能, 包括电子显微镜(Shaw et al., 2006; Chiantia et al., 2006; Goksu et al., 2009)、核磁共振(Filippov et al., 2003)、质谱(Brown, 1992)以及荧光显微成像技术(Niko et al., 2016)。虽然电子显微镜和原子力显微镜可达到亚纳米级分辨率, 但它们只能对非活体细胞进行观测的缺点限制了其在膜微区动态研究中的广泛应用(Shaw et al., 2006)。随着新型荧光探针的开发和荧光显微成像技术的不断发展, 检测植物活体细胞膜动态结构的工具开始不断涌现。目前, 可用于活细胞质膜的有序-无序相位观测的探针主要有Laurdan (Parasassi et al., 1997; Niko et al., 2013)及其衍生物di-4-ANEPPDHQ (Jin et al., 2005; Sezgin et al., 2014; 吕雪芹等, 2021)。尽管这些探针很好地弥补了活细胞中标记、光稳定性和发射波长等短板, 但却未能解决最根本的问题, 即无法有效区分膜微区液态有序相和液态无序相。即使人工囊泡中, 这些探针在有序和无序相中发射的光谱差——斯托克斯位移(Stokes shift)也仅约50 nm, 这直接导致Laurdan或者di-4-ANEPPDHQ在用于活细胞成像时, 会存在衬度不够(Jin et al., 2005), 不能清晰地区分两种微区。现阶段, 解决这一问题的可行性方案是开发对细胞膜特性极度敏感的探针并在此基础上进行修饰和改造。PA是一种基于四环芘(pyrene)类的新型push-pull荧光探针, 由供体和受体基团组成, 供体和受体基团之间存在电子的“推(push)”和“拉(pull)”效应, 故称为“push-pull”。供体基团通过提供电子来增强分子的共轭性, 从而增加荧光效率, 受体基团则通过吸引电子来限制供体基团的电子密度, 从而调节分子的荧光性质。两者通过发射光谱改变来特异性区分细胞质膜的液体有序域和无序域(Niko et al., 2016; Tang et al., 2021)。PA探针在质膜环境中显示出比Laurdan和di-4-ANEPPDHQ更高的亮度和光稳定性, 并且其工作浓度是上述2种探针的1/20, 有效提高了成像质量并避免了探针对细胞的毒性(Niko et al., 2016)。PA探针的光谱特性和相对较小的分子量赋予其较优异的性能, 使其具有成为检测质膜结构特征的替代膜探针潜力。此外, PA是一种亲脂性探针, 其疏水性使其具备细胞渗透性, 在检测细胞内膜系统时具有潜在优势。

我们分别以野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (WT)和甾醇合成双突变体(*smt2*/*smt3*)为研究材料, 使用新型的膜相敏感型PA探针, 检测了不同固醇含量的植物细胞膜的有序相和无序相, 为实时检测细胞质膜的有序度提供了一种简便、直观且快速的方法。此外, 我们利用激光扫描共聚焦显微镜, 对不同样品的细胞膜进行了成像, 并通过计算极性归一化数值(GP value)进行定量检测, 结合统计学分析对质膜的有序度进行了定量研究。该方法为揭示植物质膜动力学和膜区微环境变化提供了一种有效的检测手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.), 包括野生型拟南芥株系及甾醇合成缺失突变体*smt2*和*smt3*株系(Carland et al., 2010)。拟南芥甾醇合成缺失突变体*smt2*以及*smt3*购自ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center), *smt2*/*smt3*双突变体为本实验室杂交获得(Tang et al., 2021)。拟南芥种子先用75%乙醇消毒1分钟, 再用10%次氯酸钠溶液消毒10分钟, 之后用无菌水清洗3–5次, 将清洗后的种子播种于1/2 MS培养基。拟南芥植株种植于温度为(23±1)°C、光周期为16小时光照/8小时黑暗的人工温室中, 生长4天后在激光扫描共聚焦显微镜下观察。

1.2 试剂与耗材

PA探针由东京工业大学Konishi博士惠赠。预先将PA配制成浓度为100 μmol·L^{-1} DMSO的储存液, 保存于–20°C冰箱中备用。MS培养基购自Phytotech公司, 琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司, MβCD (Sigma-Aldrich, MO, USA)购自Sigma公司。

1.3 细胞膜标记与甾醇抽提处理

用1/2MS液体培养基稀释PA储存液至100 nmol·L^{-1}, 室温下将拟南芥植株与PA溶液共孵育标记5分钟, 之后用1/2 MS培养基漂洗2–3次。将漂洗后的拟南芥植株置于载玻片上, 在激光扫描共聚焦显微镜下成像观察。用去离子水溶解MβCD, 配制成浓度为200 mmol·L^{-1}的储存液。用终浓度为5 mmol·L^{-1} MβCD处理拟南芥幼苗30分钟, 再用100 nmol·L^{-1} PA标记5分钟, 1/2 MS培养基漂洗2–3次后, 制片并在共聚焦显微镜下成像观察。

1.4 激光扫描共聚焦显微镜图像采集

将PA标记后的拟南芥根细胞制片后, 使用OLYMPUS FLUOVIEW激光共聚焦显微镜FV1000进行图像采集。用488 nm波长激光激发样品, 进行λ扫描分析。扫描模式设置为xyλ, 图像尺寸为1024 × 1024 px; 扫描速度设定为200 Hz, 针孔大小设置为1 Airy, 扫描带宽为5 nm。进一步采用Leica LAS软件分析PA标记的根细胞的荧光光谱, 获取相应的荧光发射波长范围。物镜型号为UPLSAPO, 放大倍数为60X, 数值孔径为1.20, 分辨率为4.830 9 μm·pixel^{-1}。

1.5 拟南芥细胞膜有序度的定量分析

根据Jin等(2005)所述方法和Image J宏脚本计算均一化极性数值(GP值)。利用以下公式计算GP值:

$$GP = \frac{I_{500-550} - GI_{580-700}}{I_{500-550} + GI_{580-700}} \quad (1)$$

式中, $I_{500–550}$和$I_{580–700}$表示2个通道(500–550 nm和580–700 nm)图像中每个像素的荧光强度; G为校准因子, 利用以下公式计算:

$$G = \frac{GP_{ref} + GP_{ref}GP_{mes} - GP_{mes} - 1}{GP_{mes} + GP_{ref}GP_{mes} - GP_{ref} - 1} \quad (2)$$

式中, GP_{mes}为相同条件下DMSO溶液中PA的GP值; GP_{ref}为DMSO中PA的参考值, GP_{ref}的建议值为–0.85 (Jin et al., 2005)。使用Image J自定义宏将GP image的3个RGB通道分别乘以图像的intensity通道, 叠加3个通道, 得到色调-饱和度-亮度(Hue-Saturation-Brightness, HSB)图。

1.6 数据处理

利用Image J软件处理荧光图像, 统计每个区域的荧光强度。用SPSS和Origin软件对荧光强度和GP数据进行统计分析, 用Origin中的高斯函数拟合GP值的概率密度分布和计算特征峰。利用Origin软件对数据进行可视化。

2 结果与讨论

2.1 拟南芥根细胞膜微区有序性双通道成像分析

PA荧光探针可用于标记动物细胞膜, 且识别质膜有序域和无序域的效果较好(Niko et al., 2016)。基于此, 我们在植物细胞中进行了尝试。首先将PA荧光探针稀释成浓度为100 nmol·L^{-1}的工作液, 室温下将其与拟南芥根共孵育5分钟。随后将激光扫描共聚焦显微镜的激发光波长设置为488 nm, 采集发射光谱范围设置为500–550 nm和580–700 nm, 检测PA探针孵育后的拟南芥根细胞中双通道的荧光信号。我们使用共聚焦显微镜的光谱扫描功能对根细胞的荧光发射光谱图进行了扫描和分析, 以确定荧光探针的发射峰值。利用共聚焦xyλ模式成像, 发现PA标记的拟南芥

根细胞的发射光谱存在2个发射峰，分别位于510和580 nm处(图1A)。在此光谱中，液态有序相(Lo)的发射峰值为510 nm，液态无序相(Ld)的发射峰值为580 nm。发射波长为500–550 nm的绿色荧光通道检测的为液态有序相，绿色荧光基本定位于质膜，表明细胞质膜处于高度有序状态(图1B)。发射波长为580–700 nm的红色荧光通道检测的为液态无序相(图1C)，红色荧光不仅位于质膜，在胞内靠近质膜内侧的特定区域(被认定为内体(赵晓玉，2014))也显示较强的信号(图1C，白色箭头指示)。通过将指示液态有序相和指示液态无序相的图像叠加，得到部分重合的黄色区域，表明在这些质膜微域中，有序性和无序性之间存在动态变化(图1D)。值得注意的是，叠加图像中靠近质膜内侧的胞内体均处于低有序度状态(红色荧光，蓝色箭头指示)，可能是由于内体甾醇含量较低导致有序度降低(图1D)。通过非均匀图像编码处理，我们实现了质膜微域的色相-饱和度-亮度(HSB)三维色彩空间图像显示(图1E)。与仅依靠红色、绿色和蓝色数值的定义相比，以HSB为基础定义颜色的主要优势在于更加直观。特别是采用HSB模型的图像能更清晰地展示饱和度信息(有序和无序区域的细节)。HSB图像显示细胞质膜组分为红色，胞内体为绿色。红色代表有序度较高，绿色代表有序度较低，即质膜的有序度高于胞内体。与Laurdan和di-4-ANE-

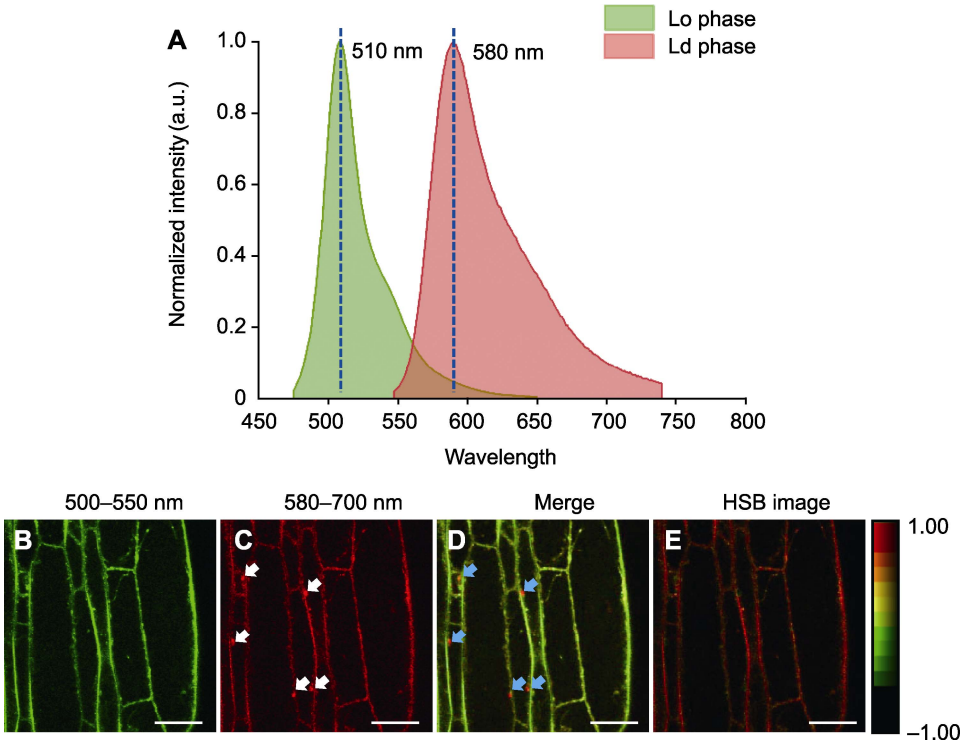


图1 PA探针标记拟南芥根细胞质膜的发射光谱分析

(A) 拟南芥根细胞中PA探针的发射光谱特征(Lo phase: 液态有序相; Ld phase: 液态无序相); **(B)** PA标记的拟南芥根细胞的绿色通道(500–550 nm)荧光成像(液态有序相，Lo); **(C)** PA标记的拟南芥根细胞的红色通道(580–700 nm)荧光成像(液态无序相，Ld)(白色箭头指示内体); **(D)** 绿色**(B)**通道与红色**(C)**通道的叠加图像(蓝色箭头指示内体); **(E)** 双通道图像对应的色相-饱和度-亮度(Hue-Saturation-Brightness, HSB)图像。Bars=10 μm

Figure 1 Emission spectrum analysis of the plasma membrane in *Arabidopsis* root cells labeled with PA

(A) Fluorescence spectra of PA in *Arabidopsis* root cells (Lo phase: Liquid ordered phase; Ld phase: Liquid disordered phase); **(B)** Green channel (500–550 nm) imaging of PA-labeled *Arabidopsis* root cells (liquid ordered phase, Lo); **(C)** Red channel (580–700 nm) imaging of PA-labeled *Arabidopsis* root cells (liquid disordered phase, Ld) (white arrows indicate the presence of endosomes); **(D)** The merged image of green **(B)** and red **(C)** channels (blue arrows indicate the presence of endosomes); **(E)** Hue-Saturation-Brightness (HSB) image corresponding to the two-channel image. Bars=10 μm

PPDHQ等探针不同，PA探针无须长时间冰浴进行细胞染色标记，可有效避免低温对细胞膜有序程度的干扰，从而获得更加精准的结果。

2.2 拟南芥细胞不同切面膜微区的有序度分析

我们使用PA探针，利用共聚焦显微镜检测拟南芥根细胞有序相的发射波长为500–550 nm，无序相的发射波长为580–700 nm。采用这种方法进一步研究拟南芥单个细胞不同切面(Z-stack)质膜有序度的变化。通过双通道图像处理得到HSB (色相-饱和度-亮度)图像，显示单个层面细胞质膜荧光信号的HSB值基本一致，而胞内荧光信号的HSB值较低(图2A)。根据GP算法得到8组不同层面荧光图像的GP值，均维持在0.19–0.28之间(图2B)。表明单个细胞不同层面细胞质膜的有序度基本一致，暗示细胞质膜微区处于稳定的动态平衡状态。

2.3 甾醇缺失后拟南芥根细胞膜微区有序性的定量分析

甾醇是广泛存在于生物体内的一种重要天然活性物质，对维持植物质膜结构的稳定性至关重要。用5 mmol·L^{-1} MβCD处理野生型拟南芥幼苗30分钟，得到低甾醇植物质膜材料。进一步筛选获得拟南芥甾醇合成缺失突变体*smt2*/*smt3*。使用PA探针对*smt2*/

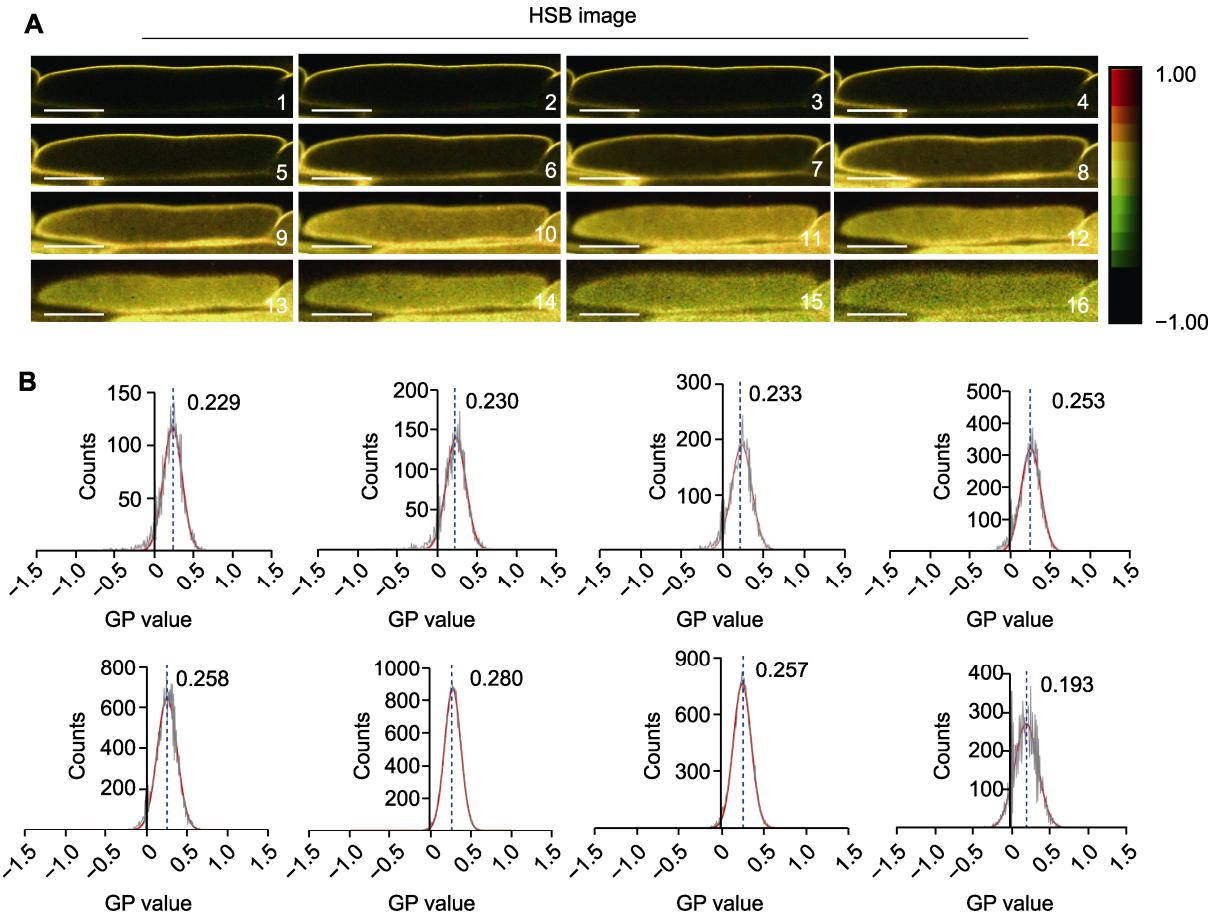


图2 拟南芥根中细胞不同切面(Z-stack)的有序度分析

(A) 拟南芥根中细胞不同切面的HSB荧光图像，1–16所示图像代表细胞单个层面的HSB荧光图像(bars=20 μm); **(B)** 拟南芥根中细胞不同切面的GP值分布，每组统计3000多个像素。

Figure 2 Analysis of membrane degree of different planes (Z-stack) in individual *Arabidopsis* root cells

(A) HSB image of different planes (Z-stack) within individual cells of *Arabidopsis* roots, the images shown in 1–16 represent HSB fluorescence images of individual cell layers (bars=20 μm); **(B)** Distribution of GP values of different planes (Z-stack) within individual cells of *Arabidopsis* roots, more than 3000 pixels were analyzed for each group.

*smt3*进行染色并置于共聚焦荧光显微镜下采集双通道图像，处理红绿通道的图像，获得HSB (色相-饱和度-亮度)图像，显示野生型拟南芥(WT)经PA染色后绿色荧光通道指示的液态有序相定位于质膜，而红色荧光通道指示的液态无序相定位于质膜和内体(图3A)，这与发射光谱的分析结果一致(图1A–C)。HSB图像中，野生型拟南芥根细胞的质膜呈现橘红色；用PA探针检测MβCD处理后的拟南芥(WT+MβCD)根细胞质膜时，发现液态有序相的绿色荧光强度低于未处理的野生型拟南芥根细胞质膜，而液态无序相的红色荧光强度高于未处理的野生型拟南芥根细胞质膜。此外，还观察到HSB图像中，质膜呈现红黄色，暗示质膜中绿色荧光指示的有序相显著降低(图3B)。这可能与质膜参与内吞过程中液态无序相进入胞内，导致胞内无序程度高的内体增多有关(赵晓玉，2014)。甾醇合成缺失突变体*smt2*/*smt3*根细胞经PA探针染色后，荧光检测结果与MβCD处理后的结果类似(图3C)。在*smt2*/*smt3*突变体，观察到580–700 nm采集通道中细胞内的点状信号明显增多，提示*smt2*/*smt3*突变引起胞内某些重要组分改变，可能与质膜中甾醇含量降低有关。甾醇含量降低导致细胞膜组分的无序性和流动性增强，促使更多的液态无序相内吞进入胞内，形成无序度较高的内体，导致细胞内点状信号明显增多。这进一步证明通过MβCD处理和*smt2*/*smt3*突变降低了质膜中的甾醇含量，导致质膜液态有序相信号减弱和液态无序相信号增强，及质膜的有序度降低，暗示植物细胞质膜中的甾醇具有维持质膜稳定的作用。

为进一步定量分析甾醇缺失对拟南芥根部膜微区有序度的影响，我们对野生型拟南芥进行了MβCD处理(方法同上)，以降低质膜中的甾醇含量。此外，我们也利用拟南芥甾醇合成缺失突变体*smt2*/*smt3*进行根部膜微区有序度比较分析。首先，采集绿色和红色双通道荧光信号；然后，对获取的图像进行均一化极性数值(GP value)分析并生成GP图像。经MβCD处理的野生型拟南芥根细胞图像与未处理的野生型拟南芥存在较大差异。未经MβCD处理的野生型拟南芥

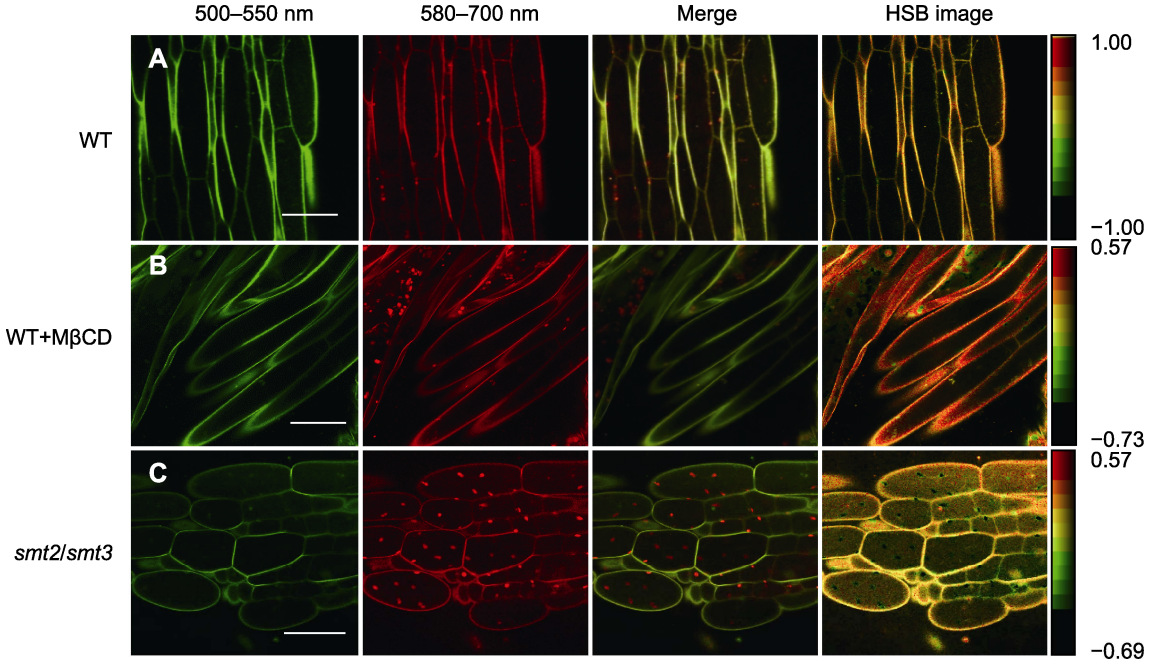


图3 PA探针标记MβCD处理及*smt2*/*smt3*双突变体拟南芥根细胞的荧光图像

(A) PA标记的野生型(WT)根细胞的荧光图像；**(B)** 经MβCD处理后的WT根细胞的PA标记荧光图像；**(C)** *smt2*/*smt3*突变体中根细胞的PA标记荧光图像。Bars=20 μm

Figure 3 Fluorescence images of *Arabidopsis* root cells labeled with the PA probe after MβCD treatment and in the *smt2*/*smt3* mutant

(A) Fluorescence image of wild type (WT) root cells labeled with PA; **(B)** Fluorescence image of WT root cells labeled with PA probe after treatment with MβCD; **(C)** Fluorescence image of root cells in the *smt2*/*smt3* mutant labeled with PA probe. Bars=20 μm

根细胞内体较少，而经MβCD处理的野生型拟南芥根细胞内出现大量的内体(图4A)。未经MβCD处理的野生型拟南芥根细胞GP峰值为0.344 (图4B)，而经MβCD处理的野生型拟南芥根细胞的GP峰值仅为0.172 (图4C)。拟南芥双突变体*smt2*/*smt3*的GP峰值与经MβCD处理的野生型的GP峰值(0.160)类似(图4D)。对不同株系的GP峰值进行统计分析，发现MβCD处理的野生型拟南芥和突变体*smt2*/*smt3*的GP峰值明显低于未处理野生型的GP峰值(图4E)。上述结果表明，甾醇含量降低显著降低了细胞质膜的有序性，进而证明甾醇具有维持植物细胞质膜稳定性的作用。

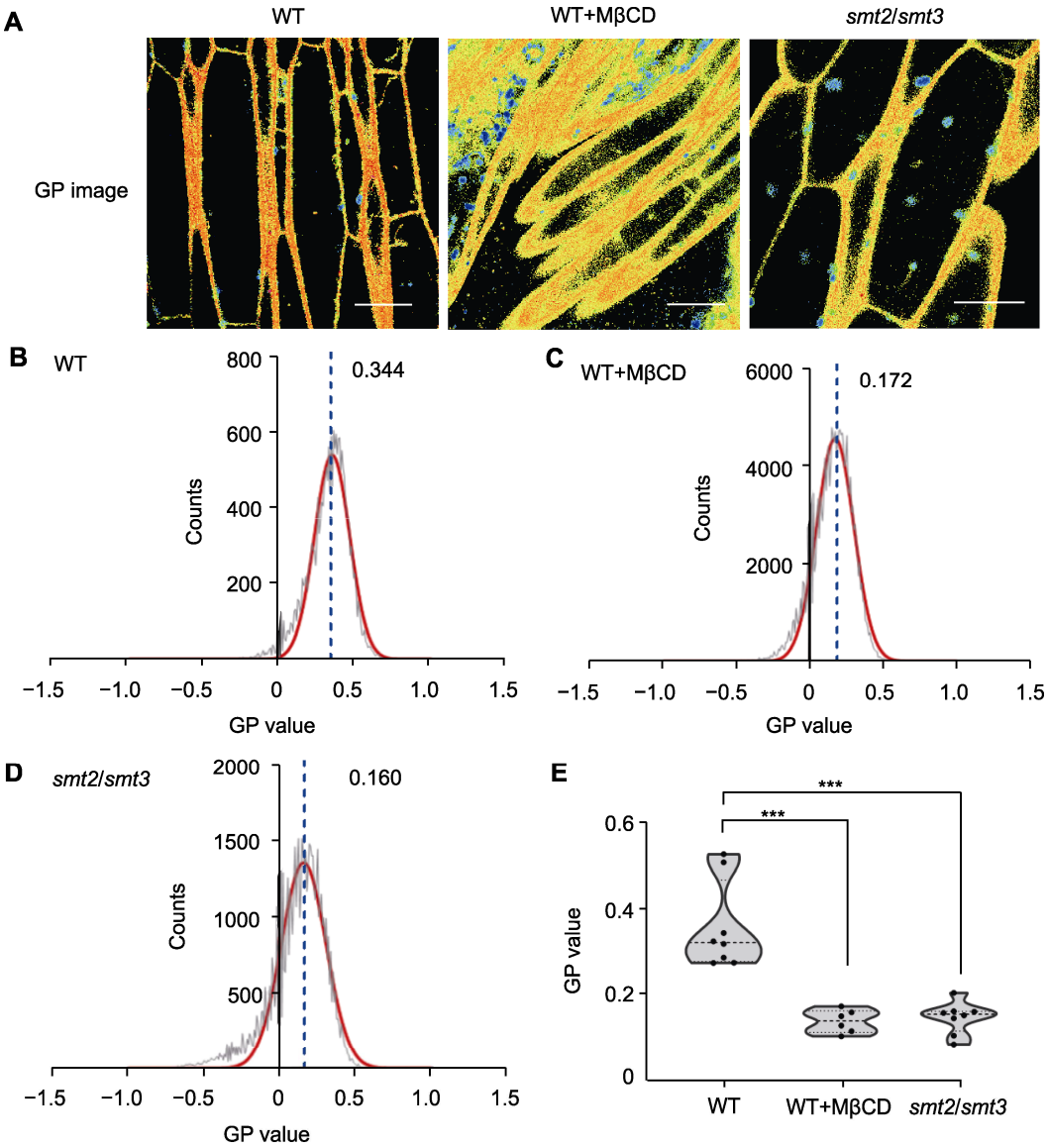


图4 甾醇缺失对拟南芥根细胞膜微区均一化极性数值定量分析和比较

(A) PA探针检测野生型(WT)、MβCD处理后的WT和*smt2*/*smt3*双突变体的GP图像(bars=10 μm); **(B)** 野生型拟南芥根细胞质膜有序度的GP分布曲线; **(C)** MβCD处理的WT根细胞质膜有序度的GP分布曲线; **(D)** *smt2*/*smt3*双突变体根细胞质膜有序度的GP分布曲线(**(B)–(D)**中红色曲线指示GP值分布的高斯拟合曲线；黑色曲线显示质膜的GP峰值分布；不同样品中质膜GP峰值标注于曲线顶部右侧；蓝色虚线指示GP峰值的位置); **(E)** WT、MβCD处理的WT和*smt2*/*smt3*双突变体的GP峰值(每组6次生物学重复; ***P<0.001, Student's t-test)。

Figure 4 Quantitative analysis and comparison of generalized polarization values of membrane microdomains in *Arabidopsis* root cells after sterol depletion

(A) GP image of the wild type (WT), WT treated with MβCD, and *smt2*/*smt3* double mutant using PA probe (bars=10 μm); **(B)** GP distribution curve for the WT membrane; **(C)** GP distribution curve for the WT membrane treated with MβCD; **(D)** GP distribution curve for the membrane of *smt2*/*smt3* double mutant (the red curves in **(B)** to **(D)** represent the Gaussian fitting curves for the distributions of the GP values; The black curves represent the distributions of the membrane GP values; The GP peak values are shown at the top right of each curve; The blue dotted lines indicate the locations of the GP peaks); **(E)** GP peak values for the WT, WT treated with MβCD, and *smt2*/*smt3* double mutant (each group was analyzed in 6 biological repetitions; *** P<0.001, Student's t-test).

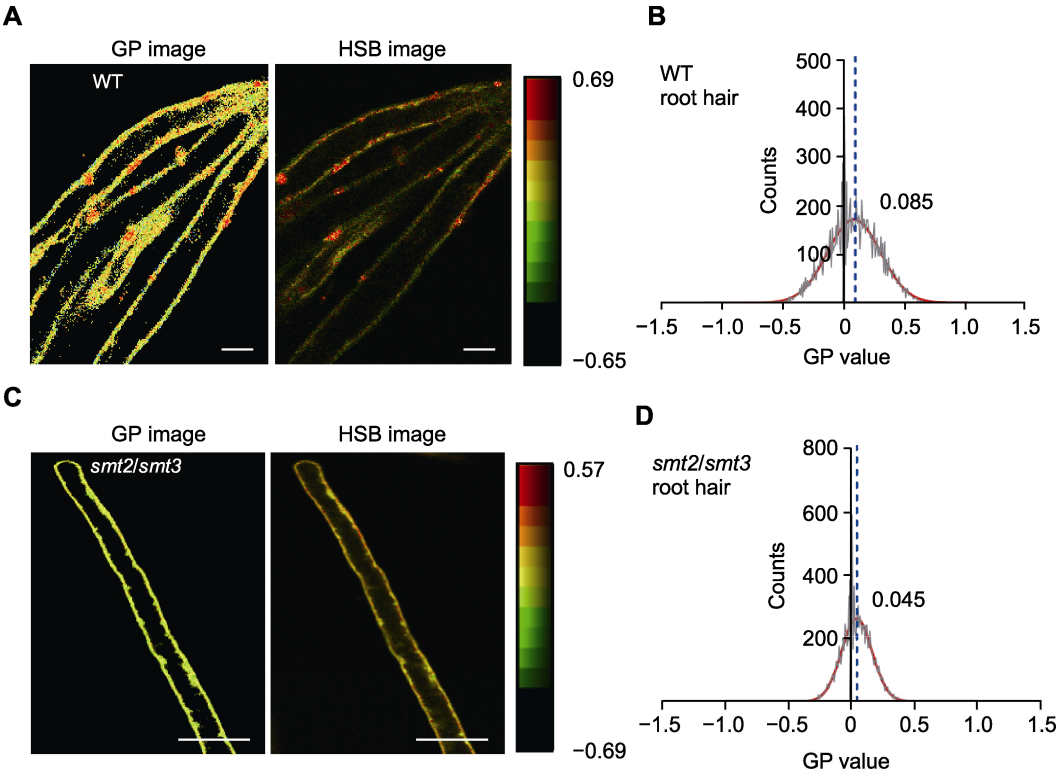


图5 野生型拟南芥和*smt2*/*smt3*双突变体根毛细胞质膜的有序度分析

(A) 野生型拟南芥根毛细胞GP和HSB荧光图像(bars=20 μm); **(B)** 野生型拟南芥根毛细胞质膜的GP值分布, 每组统计3000多个像素; **(C)** *smt2*/*smt3*突变体根毛细胞的GP和HSB荧光图像(bars=15 μm); **(D)** *smt2*/*smt3*突变体根毛细胞质膜的GP值分布。**(B)**和**(D)**中红色曲线为GP值分布的高斯拟合曲线; 黑色曲线代表质膜的GP值分布情况; 不同样品中质膜GP峰值标注于曲线顶部右侧; 蓝色虚线指示GP峰值的位置。

Figure 5 Quantitative analysis of the membrane order of root hair cells in wild type (WT) *Arabidopsis* and *smt2*/*smt3* double mutant

(A) The GP and HSB images of root hair cells in WT *Arabidopsis* (bars=20 μm); **(B)** Distribution of the GP values of the root hair cell membranes in WT *Arabidopsis*, more than 3000 pixels were counted for each group; **(C)** The GP and HSB images of root hair cells in the *smt2*/*smt3* double mutant (bars=15 μm); **(D)** Distribution of the GP values of the root hair cell membranes in the *smt2*/*smt3* double mutant. The red curves in **(B)** and **(D)** represent the Gaussian fitting curves for the distributions of the GP values; The black curves represent the distributions of the membrane GP values; The numbers indicate the GP peak values at the top right of each curve; The blue dotted lines indicate the locations of the GP peaks.

2.4 拟南芥根毛细胞膜微区的有序度定量分析

根毛的生长和发育涉及细胞质膜的高度动态变化, 因此是研究细胞极性和质膜异质性的理想材料。探究根毛细胞和其它组织中细胞质膜的有序度差异, 有助于深入理解细胞极性的调控机制, 及在细胞生长过程中质膜的动态调节功能。利用PA探针对野生型拟南芥(WT)及*smt2*/*smt3*突变体根毛细胞进行标记, 并使用激光共聚焦显微镜成像。通过对图像进行均一化极性数值分析和GP值统计, 发现与野生型拟南芥相比(图5A, B), 甾醇含量降低的*smt2*/*smt3*突变体根毛的质

膜显示出更强的无序相信号和更低的GP值(图5C, D)。根毛细胞中的GP值(0.085)约为根细胞中GP值(0.345)的1/4，而*smt2*/*smt3*突变体根毛细胞的GP值(0.045)约为野生型根毛细胞GP值的1/2，表明*smt2*/*smt3*突变体根毛质膜微区的有序性发生了显著变化，导致其GP值较低。这一发现不仅证明甾醇在细胞质膜微区有序-无序相动态变化中具有关键作用，也暗示根毛作为一种特殊的单细胞类型，其细胞质膜与其它类型细胞的质膜在甾醇组成及质膜有序度等方面存在显著差异。

2.5 讨论

细胞膜的有序度反映了细胞膜的组成和结构变化，但目前尚缺乏较为直观且高效的活细胞细胞膜有序度检测手段。本研究利用PA探针和激光扫描共聚焦显微镜相结合的技术，对拟南芥根中活细胞的有序度进行了检测和分析。通过均一化极性数值(GP)消除仪器本身荧光收集效率的不一致性，进而实现更为一致且准确的细胞质膜有序度分析。质膜大部分区域处于有序状态，少部分质膜微区呈现无序状态，而质膜内侧的内体呈现无序相状态。本研究对MβCD处理的野生型拟南芥以及甾醇合成缺失突变体*smt2*/*smt3*质膜的有序度进行了成像和定量分析。通过均一化极性数值(GP值)检测甾醇降低后拟南芥质膜的有序度变化，发现甾醇降低使细胞膜的有序度降低。进一步对不同株系的荧光强度、图像HSB信息和GP值进行测定，准确展示了细胞膜微区的有序度变化，为研究植物活细胞质膜动力学和质膜微结构域变化提供了直观且快速的检测手段。

甾醇是维持植物质膜稳定性的重要物质，当质膜中甾醇含量降低或者无法合成时，植物质膜的有序性降低，胞内体的无序性升高，说明甾醇缺失可导致质膜内化加剧，更多有序度较低的质膜成分随质膜循环进入胞内，形成内体。本研究结果(图3C，图4)显示甾醇被破坏后，胞内体的数量增多，表明质膜的有序度变化影响质膜循环。膜微区在植物细胞中行使许多重要的生物学功能，其中包括信号转导、防御反应、极性生长和胞吞作用等。在这些过程中，甾醇在膜微区功能行使中扮演重要角色，因此已成为近年来的研究热点之一。研究甾醇对深入理解细胞的微区结构和功能及细胞内信号传递和生理过程具有重要意义。本研究采用的PA探针在植物细胞中显示出比Laurdan和di-4-ANEPPDHQ等更高的亮度以及光稳定性，因此PA非常适合于植物活细胞质膜有序度的检测和分析。此外，PA与波长>800 nm的双光子激发相容，已成功在巨大单层人工囊泡中液体有序相和无序相的成像分析中应用(Niko et al., 2016)。我们使用PA探针检测了拟南芥根活细胞中甾醇被破坏后质膜有序度的定量变化，揭示了甾醇维持质膜有序性的重要作用。该方法在深入探究植物质膜的有序度变化、胞内物质运输和生物膜的稳态等方面均有巨大的应用潜力。

作者贡献声明

陈秀秀，唐玲：完成实验，分析数据并提供技术支持，撰写论文；胡文佳：完成实验，分析数据并提供技术支持；杨照麟：分析数据并提供技术支持；邓馨：构思并设计实验；王晓华：构思、设计并完成实验，撰写论文。

参考文献

Brown DA (1992). Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol* **2**, 338–343.

Brown DA, London E (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**, 17221–17224.

Carland F, Fujioka S, Nelson T (2010). The sterol methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 influence *Arabidopsis* development through nonbrassinosteroid products. *Plant Physiol* **153**, 741–756.

Carland FM, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Nelson T (2002). The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell* **14**, 2045–2058.

Chiantia S, Ries J, Kahya N, Schwille P (2006). Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes. *Chem Phys Chem* **7**, 2409–2418.

Dong ZY, Song CW, Cui YN, Yu M, Li RL, Lin JX (2019). Structural models of membrane microdomains and sterol imaging technology. *J Chin Electron Microsc Soc* **38**, 542–549. (in Chinese)

董紫怡，宋程威，崔亚宁，玉猛，李瑞丽，林金星 (2019). 膜微区相关结构模型及甾醇成像技术的研究进展. 电子显微学报 **38**, 542–549.

Filippov A, Orädd G, Lindblom G (2003). The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented

bilayers. *Biophys J* **84**, 3079–3086.

Gerke V, Gavins FNE, Geisow M, Grewal T, Jaiswal JK, Nylandsted J, Rescher U (2024). Annexins—a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics. *Nat Commun* **15**, 1574.

Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin WC, Longo ML (2009). AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta* (*BBA*) *Biomembr* **1788**, 254–266.

Hoppe T, Rape M, Jentsch S (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 344–348.

Huang XH, Liu W, Tian SP, Chen T (2023). Advances in the regulation of protein liquid-liquid phase separation on development and stress responses in plants. *Chin Bull Bot* **58**, 946–955. (in Chinese)
黄鑫华, 刘伟, 田世平, 陈彤 (2023). 蛋白液-液相分离调控植物发育及胁迫应答研究进展. 植物学报 **58**, 946–955.

Ivanov S, Harrison MJ (2024). Receptor-associated kinases control the lipid provisioning program in plant-fungal symbiosis. *Science* **383**, 443–448.

Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Clark HA, Loew LM (2005). Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. *Biophys J* **89**, L04–L06.

Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KGN (2012). Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of singer and nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 215–250.

Lingwood D, Simons K (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50.

Luo PY, Qian HP, Liu Y, Xu CW, Cui YN (2023). Regulation of plasma membrane protein dynamics and its research methods. *Chin Bull Bot* **58**, 590–601. (in Chinese)
罗鹏云, 钱虹萍, 刘艳, 徐昌文, 崔亚宁 (2023). 质膜蛋白动力学的调控及其研究方法. 植物学报 **58**, 590–601.

Lv XQ, Jin K, Liu JH, Cui SX, Li JH, Du GC, Liu L (2021). Quantitative analysis of membrane ordering of living industrial model microorganisms. *China Biotechnol* **41**, 20–29. (in Chinese)
吕雪芹, 金柯, 刘家恒, 崔世修, 李江华, 堵国成, 刘龙 (2021). 工业模式微生物膜有序性的活细胞定量分析. 中国生物工程杂志 **41**, 20–29.

Mesmin B, Bigay J, Polidori J, Jamecna D, Lacas-Gervais S, Antonny B (2017). Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *EMBO J* **36**, 3156–3174.

Misteli T (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**, 843–847.

Munro S (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377–388.

Niko Y, Didier P, Mely Y, Konishi GI, Klymchenko AS (2016). Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. *Sci Rep* **6**, 18870.

Niko Y, Kawauchi S, Konishi GI (2013). Solvatochromic pyrene analogues of prodan exhibiting extremely high fluorescence quantum yields in apolar and polar solvents. *Chem Eur J* **19**, 9760–9765.

Parasassi T, Gratton E, Yu WM, Wilson P, Levi M (1997). Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys J* **72**, 2413–2429.

Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J* **22**, 3980–3991.

Sezgin E, Sadowski T, Simons K (2014). Measuring lipid packing of model and cellular membranes with environment sensitive probes. *Langmuir* **30**, 8160–8166.

Shaw JE, Epand RF, Epand RM, Li ZG, Bittman R, Yip CM (2006). Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophys J* **90**, 2170–2178.

Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572.

Simons K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31–39.

Singer SJ, Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731.

Tang L, Li Y, Zhong C, Deng X, Wang XH (2021). Plant sterol clustering correlates with membrane microdomains as revealed by optical and computational microscopy. *Membranes* **11**, 747.

Yan X, Xu M, Wang YT, Pan WH, Pan JW, Shou JX, Wang C (2022). Coupling regulation of endocytosis and exocytosis in plants. *Chin Bull Bot* **57**, 375–387. (in Chinese)
严旭, 徐梅, 王玉同, 潘伟槐, 潘建伟, 寿建昕, 王超 (2022). 植物胞吞和胞吐的耦合调控. 植物学报 **57**, 375–387.

Zhang L, Xing JJ, Lin JX (2019). At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol* **224**, 1479–1489.

Zhao XY (2014). Application of di-4-ANEPPDHQ as a Novel Fluorescent Probe for Visualization and Detection of

Membrane Microdomains in Living Cells in *Arabidopsis thaliana*. Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. pp. 1–82. (in Chinese)

赵晓玉 (2014). 新型荧光探针di-4-ANEPPDHQ在拟南芥质膜微区显微成像和定量检测中的应用. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 1–82.

Zuo CS, Liu DY, Xu QJ, Shi WZ, Niu J, Chass GC (2013). Research progress on structure and function of phytosterols. *J Henan Sci Technol* **32**, 211–213. (in Chinese)

左春山，刘大勇，徐启杰，时文中，牛静，Chass GC (2013). 植物甾醇的结构与功能的研究进展. 河南科技 **32**, 211–213.

Quantitative Analysis of Plasma Membrane Order in Live Plant Cells

Xiuxiu Chen[1, 2, 3], Ling Tang[1, 2, 3], Wenjia Hu[1, 2, 3], Zhaolin Yang[1, 2, 3], Xin Deng[1, 2], Xiaohua Wang[1, 2*]

[1]State Key Laboratory of Plant Diversity and Special Crops, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; [2]China National Botanical Garden, Beijing 100093, China; [3]University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Membrane microdomains, which are highly dynamic structures rich in sterols and sphingolipids on the plasma membrane, play crucial roles in various biological processes such as signal transduction, vesicle transport, endocytosis, and exocytosis. Consequently, the investigation of membrane microdomain dynamics is an important area of research in plant cell biology. Fluorescence probes combined with fluorescence microscopy are widely used to monitor the status of living plant cells. The PA probe (push-pull pyrene) is a novel, highly efficient and stable fluorescence probe based on pyrene: however, its application in imaging studies of living plant cells is limited. In this study, we used PA probes and laser scanning confocal microscopy, combined with image processing and the polar normalized value mapping method, to quantitatively analyze the order of the plasma membrane in *Arabidopsis* root cells. The results revealed that the emission spectrum of the liquid-ordered phase in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells labeled with the PA probe ranged from 500–550 nm, whereas the emission spectrum of the liquid-disordered phase ranged from 580–700 nm. Treatment of wild-type plants with the sterol extraction agent MβCD resulted in a decrease in plasma membrane order. In the *smt2*/*smt3* double mutant lacking the key methyltransferase in sterol synthesis, the plasma membrane order was consistent with that of the wild-type plants after treatment with MβCD. In the *smt2*/*smt3* mutant, the plasma membrane order of the root hair cells was lower than the plasma membrane order of the wild-type root hair cells, indicating that sterols, as key components of membrane microdomains, play an important role in regulating the order of the plasma membrane. This study provides a straightforward and rapid detection method for monitoring the dynamic characteristics of living plant cell membranes and changes in membrane microdomains.

Key words PA probe, phytosterol, membrane microdomains, live-cell fluorescence imaging, membrane order

Chen XX, Tang L, Hu WJ, Yang ZL, Deng X, Wang XH (2025). Quantitative analysis of plasma membrane order in live plant cells. *Chin Bull Bot* **60**, 90–100.

* Author for correspondence. E-mail: wangxh@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)

通讯作者简介

王晓华, 副研究员, 硕士生导师。主要研究方向为植物活细胞和单分子成像技术, 致力于建立适合植物细胞膜和生物大分子的单分子研究方法, 实现生物大分子运动参数的精准分析, 从而为揭示植物细胞早期响应机制提供技术支持。