

铁皮石斛类原球茎空气干燥法超低温保存中的脱水蛋白分析

林伟强 边红武 王君晖* 朱睦元

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要: 用空气干燥法将铁皮石斛类原球茎脱水至不同含水量, 进行超低温保存和热稳定蛋白的 SDS-PAGE 分析, 并进行脱水蛋白的 Western blot 检测。结果表明: 在本试验条件下, 含水量以 g/g DM 表示时, 铁皮石斛类原球茎脱水时间 (x) 对含水量 (y) 的回归方程式为 $y = -0.1208x + 9.9636$ 。含水量下降为 0.1 ~ 0.5 g/g DM 时, 冻后存活率达到最大值。当含水量达 1.0 g/g DM 时, 热稳定蛋白的含量明显增加, 经免疫检测其中分子量分别为 28.7 和 34.3 kD 的两个热稳定蛋白为脱水蛋白。认为含水量是铁皮石斛超低温保存成功的关键因素, 也是引起脱水蛋白大量积累的重要条件。

关键词: 铁皮石斛; 类原球茎; 脱水蛋白; 含水量; 超低温保存

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 01-0064-05

Analysis of Dehydrins in Cryopreservation of Protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the Air-drying Method

Lin Weiqiang, Bian Hongwu, Wang Junhui*, and Zhu Muyuan

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Protocorm-like-bodies of (PLBs) *Dendrobium candidum* were desiccated to different water contents by an air-drying method. Samples at different water contents were cryopreserved, and the heat-stable proteins of samples were immunological detected by anti-dehydrin antibody. Water content was based on dry mass, its linear equation was expressed as $y = -0.1208x + 9.9636$. The optimal water content for cryopreservation seemed to be at the range of 0.1 g/g DM to 0.5 g/g DM. The amount of heat-stable proteins increased significantly when water content decreased to 1.0 g/g DM. Results from immunological detection showed that two bands of the heat-stable proteins with respective molecular masses of 28.7 and 34.3 kD were dehydrins, which appeared when water content dropped to 1.0 g/g DM. Our work revealed that water content might be a key factor for successful cryopreservation as well as for accumulation of dehydrins.

Key words: *Dendrobium candidum*; Protocorm-like-bodies; Dehydrin; Water content; Cryopreservation

超低温保存的基本策略是通过降低细胞含水量来避免胞内冰晶的损伤^[1]。空气干燥法无需冻前和冻后复杂的处理, 是避免细胞内结冰的有效途径。近年来, 空气干燥法常用于保存茎段^[2]、体细胞胚^[3]或合子胚^[4]等, 本实验室用该法已成功地冻存了水稻悬浮细胞和铁皮石斛的种子及初生原球茎^[5,6]。大量试验证明植物细胞如果能耐受超低温保存前的脱水处理, 就能在快速冷冻过程中存活。因此在超低温保存中, 植物细胞抗脱水性的研究显得十分重要。

在脱水胁迫下, 植物细胞发生了一系列的代谢变化和细胞生物学变化。许多研究发现, 可溶性糖和热稳定蛋白的积累在植物维持正常细胞功能和耐脱水胁迫方面具有重要作用^[7,8]。其中 LEA D- 族

收稿日期: 2003 - 05 - 06; 修回日期: 2003 - 07 - 14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39900012)

* 通讯作者: E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn

即脱水蛋白是研究较为深入的一类蛋白, 它富含极性氨基酸, 具有高度亲水性和热稳定性, 能在高温下保持分子构像不变。脱水蛋白都具有一个或几个两亲性的 α -螺旋区(K区), 这个区域在高等、低等植物的脱水蛋白中都是高度保守的, 为 15 个残基的共有序列(EKKGIMDKIKEKLPG), 以这段保守残基来制备单抗, 可用于检测植物脱水蛋白^[9]。目前, 许多研究者认为脱水蛋白的积累与植物细胞抗冻、抗脱水力的形成有密切关系, 并推测脱水蛋白的作用机理可能有 3 方面: 1, 稳定膜系统^[8]; 2, 作为冰冻保护剂^[10]; 3, 抑制大分子的团聚^[9]。

铁皮石斛为我国名贵珍稀中药材, 将脱水蛋白的知识运用于铁皮石斛类原球茎的超低温保存, 为种质资源保存提供新的研究内容。在近十几年内, 国外脱水蛋白的研究十分活跃, 国内傅家瑞教授等在种子脱水蛋白方面做了许多工作^[11,12]。目前对兰科植物的脱水蛋白研究很少^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 类原球茎是铁皮石斛种子体外诱导而得^[5]。在琼脂(0.8%)固化的 1/2 MS 培养基上(光照 2000 lx, 温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C)培养, 每两周继代 1 次。取继代后 1 周的类原球茎进行超低温保存试验。

1.2 方法

1.2.1 细胞脱水和超低温保存 将 0.6 g 左右的铁皮石斛类原球茎样品放入 50 mL 三角瓶中, 封上透气封口膜(北京振泰园艺设施公司), 放入 AD-126 电子干燥箱(台湾防潮科技股份有限公司)中脱水(相对湿度 25% \pm 5%, 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 光照 2000 lx)。当样品脱水至一定含水量时, 取一半的样品放到冷试管投入液氮中; 而另一半样品用来恢复培养, 计算冻前存活率。

1.2.2 含水量和存活率的测定 称取铁皮石斛类原球茎记为鲜样质量(FM), 样品在 80 $^{\circ}$ C 烘箱里烘 48 h 获得干样质量(DM)。在干燥过程中, 通过阶段性称量样品来计算含水量, 重复 3 次。含水量的计算方法有两种: $g/g\ DM = (FM - DM) / DM$; $\% = (FM - DM) / FM \times 100$ 。

冻前的样品和复温后的样品先接种在琼脂(0.8%)固化的含 20%可溶性淀粉的 1/2 MS 培养基上, 2 d 后转移到正常的 1/2 MS 固体培养基上, 培养条件均为 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 暗培养。恢复生长率是指恢复培养 4 周后样品(干样质量)的增长百分率。重复 3 次。

1.2.3 热稳定蛋白的提取 取 0.6 g 左右的样品, 在液氮中研磨成粉状, 置于 2 mL Eppendorf 管中, 然后加入 1 mL 样品提取液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 100 μ g/mL PMSF], 充分摇匀, 6726 g 离心 10 min, 将上清移入新的 Eppendorf 管, 于 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冰浴至室温, 6726 g 离心 5 min, 将上清液以每管 300 μ L 分装, 加入 4 倍体积预冷的丙酮, 摇匀后于 -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 再以 5381 g 离心 5 min, 去上清液获蛋白质沉淀, 用 80%丙酮洗涤沉淀 1 次, 敞开管口, 使残余的丙酮完全挥发。将沉淀溶于 40 μ L 样品提取液(不含 PMSF), 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用^[14]。

1.2.4 SDS-PAGE 及脱水蛋白的 Western-Blot 检测 热稳定蛋白在 Mini-PROTEAN cell (BioRad 公司生产)电泳。浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%。每加样孔蛋白质上样量约为 20 μ g, 上样前将一定量的样品与等体积 2 倍 SDS 凝胶上样缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2%溴酚蓝, 20%甘油]相混合。电泳后, 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

SDS-PAGE 结束后立刻转膜, 用 Mini-Protein II Electrophoresis (美国 BioRad 公司生产)将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF (德国 Roche 公司产品)上。脱水蛋白抗体(1:1000 稀释)由美国加州大学的 Timothy J. Close 教授赠送。用于蛋白质免疫检测的试剂盒购自晶美生物工程公司, 为美国 KPL 实验室的 Protein DetectorTM Western Blot Kit [HRP, Lumi-CL0 System, Anti-Rabbit IgG (H+L)]。用时 HRP 以 1:1000 倍稀释。

2 结果

2.1 铁皮石斛类原球茎的脱水处理

在正常继代条件下,铁皮石斛类原球茎的含水量为 10.4 g/g DM,占鲜样质量的 91.2%。图 1 为本试验体系中脱水时间与铁皮石斛类原球茎含水量的关系。随着脱水时间的延长,细胞含水量降低。图 1A 的含水量是以 g/g DM 来表示的,回归方程式为 $y = -0.1208x + 9.9636$, 其中 x 为脱水时间,而 y 为相对应的含水量,含水量变化呈线性关系,斜率为含水量下降速率,即每小时减少 0.1208 g/g DM。在相同条件的脱水试验中,可根据该含水量下降速率较精确地预测脱水时间与细胞含水量的关系,减少称量次数,从而保持干燥箱湿度的恒定,便于试验操作。图 1B 的含水量是以鲜样质量为分母来表示的,含水量变化呈曲线,在脱水 0~50 h 内含水量变化不大,较难根据脱水时间准确预测含水量的变化。因此本试验样品的含水量均以 g/g DM 来表示。

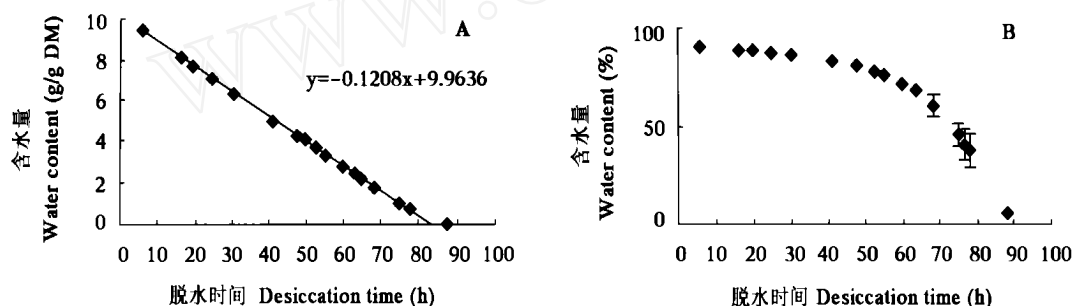


图 1 铁皮石斛类原球茎的含水量随着脱水时间的下降过程

Fig. 1 Relationship between the desiccation duration and water content of *D. candidum* PLBs

2.2 细胞冻前含水量对超低温保存的存活率影响

表 1 为不同含水量的铁皮石斛类原球茎在冻前和冻后的存活率(恢复生长率)。随着含水量降低,铁皮石斛类原球茎的冻前存活率也随着降低。含水量为 0.1 g/g DM 的样品冻前存活率显著低于 0.5 g/g DM 的细胞 ($P < 0.01$),可见 0.1 g/g DM 的含水量对样品产生明显的脱水损伤。然而经过液氮保存后,含水量大于或等于 1.0 g/g DM 的样品不能存活。含水量为 0.1 g/g DM 的样品冻后存活率显著高于 0.5 g/g DM 的样品 ($P < 0.01$)。因此,对于铁皮石斛类原球茎而言,超低温保存的最适含水量在 0.1~0.5 g/g DM 之间。

2.3 含水量对热稳定蛋白和脱水蛋白积累的影响

图 2A 是经考马斯亮蓝 R-250 染色的热稳定蛋白 SDS-PAGE 的结果。未脱水样品热稳定蛋白主要有两条条带,分子量分别为 28.7、19.2 kD。当含水量减少到 1.0 g/g DM 时,热稳定蛋白大量积累,可清楚看到明显的 5 条条带,分子量分别为 34.3、28.7、19.2、17.0、13.3 kD。随着含水量的进一步降低,没有观察到新的明显的条带出现,而且热稳定蛋白在量上并没有增加。经过脱水蛋白的 Western Blot 检测,发现只有当含水量等于或低于 1.0 g/g DM 时,铁皮石斛类原球茎的热稳定蛋白中有两条为脱水蛋白,它们的分子量分别为 34.3 和 28.7 kD(图 2B)。可见在含水量下降速率为 0.1208 g/g DM 时,铁皮石斛类原球茎热稳定蛋白和脱水蛋白大量积累的关键含水量为 1.0 g/g DM。

表 1 含水量对铁皮石斛类原球茎恢复生长率
(培养 4 周后干样质量增长倍数) 的影响

Table 1 Effect of water contents on the recovery rates
(multiple of dry mass after 4 weeks culture) of *D. candidum* PLBs

起始干 样质量 Initial dry mass (mg)	样品含水量 Water content (g/g DM)	脱水后(冻前)恢复 生长率 $\pm SE$ Recovery rates before freezing $\pm SE$	冻后恢复生长率 $\pm SE$ Recovery rates after freezing $\pm SE$
528 ± 5	10.4(对照 Control)	4.101 ± 0.361	0.501 ± 0.023
528 ± 5	1.5	3.641 ± 0.205	0.526 ± 0.036
528 ± 5	1.0	3.340 ± 0.206	0.529 ± 0.029
528 ± 5	0.5	2.865 ± 0.146	2.029 ± 0.163
528 ± 5	0.1	2.062 ± 0.301	2.758 ± 0.32

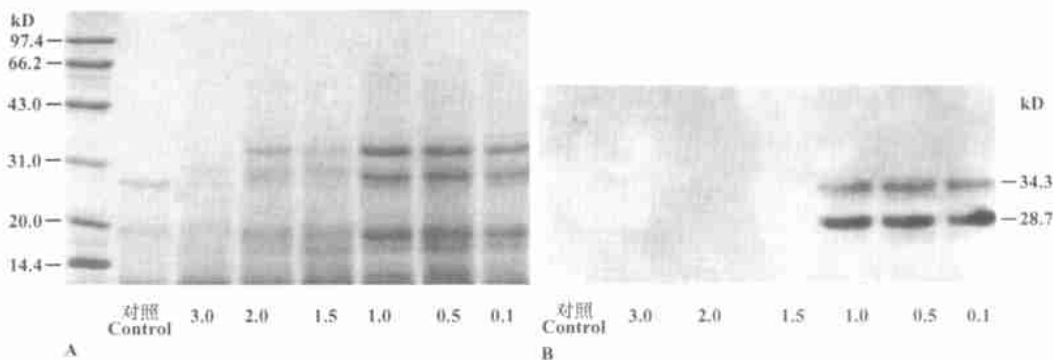


图2 铁皮石斛类原球茎的热稳定蛋白分析(SDS-PAGE检测,A)和脱水蛋白分析(Western Blot检测,B)

每一孔道样品的含水量从左到右分别是10.4(对照,Control),3.0,2.0,1.0,0.5,0.1 g/g DM。

Fig. 2 SDS-PAGE profiles of heat-stable proteins(graph A) and Western Blot detection of dehydrins(graph B) in *D. candidum* PLBs

In each plate, from the left lane to right lane, the samples were at water content of 10.4(control), 3.0, 2.0, 1.0, 0.5 and 0.1 g/g DM, respectively.

3 讨论

冻前植物样品含水量的控制是超低温保存成功的关键因素^[15]。如果样品脱水不充分时,就会因胞内冰晶的形成而导致冰冻损伤^[7];相反,如果样品脱水过度,则形成渗透胁迫的损伤^[16]。当含水量为0.1 g/g DM时,样品冻前存活率和冻后存活率差异不显著($P > 0.05$),这说明了0.1 g/g DM含水量的样品在超低温保存中的损害主要由脱水形成的,而液氮冻存没有对样品造成损伤。由此可见,只要铁皮石斛类原球茎能耐受如此严重的脱水,那么,也就能避免了胞内结冰并实现成功的超低温保存。因此,植物细胞的抗脱水能力是空气干燥法超低温保存的关键。对于铁皮石斛类原球茎空气干燥法超低温保存而言,样品最适的冻前含水量为0.1~0.5 g/g DM。

脱水蛋白是种子成熟脱水过程中或植物在脱水和低温等胁迫条件下,被高水平诱导表达^[8,17],是目前研究较多的一类与脱水胁迫相关的逆境蛋白质。本试验发现只有当含水量低于1.0 g/g DM时,脱水蛋白大量积累。在不同植物中,脱水蛋白开始被诱导合成的含水量各不相同。如北美野生稻(*Zizania palustris*)幼苗在含水量为3.0 g/g DM时脱水蛋白就开始表达^[18]。不同种类之间差别的原因尚不清楚,但有一点是明确的,在脱水胁迫下,含水量的降低是诱导脱水蛋白表达的关键因素。

大量试验发现脱水蛋白与植物细胞抗冻抗脱水力有一定的联系。本试验表明在铁皮石斛类原球茎受到严重脱水时,脱水蛋白大量积累。因此推测脱水蛋白对细胞耐受脱水胁迫可能起到保护作用。也有研究认为仅有脱水蛋白存在并不能有效起到抗脱水抗冻作用。早有报道,糖类对蛋白质的保护作用与抗冻有关。Walters等^[19]发现从小麦胚提取出的脱水蛋白与糖类物质紧密的结合在一起,且这一复合物相对于普通蛋白与糖类物质的混合物来说,具有更高的水结合能力。因此,脱水蛋白可能与糖类物质或其它渗透物质相互作用发挥更大的抗冻、抗脱水力。为了确切了解植物脱水蛋白在超低温保存过程中的作用,还需进行更深入的研究。

参考文献:

- 1 Sakai A. Development of cryopreservation techniques. In: Engellmann F, Takagi H, eds. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Italy: IPCRI, 2000. 1~7
- 2 Urugami A, Sakai A, Magai M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. Plant Cell Reports, 1990, 9: 328~331
- 3 Dumet D, Engellmann F, Chabrilange N, et al. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Reports, 1993, 12: 352~355
- 4 Asst-Bah B, Engellmann F. Cryopreservation of germplasm mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. Cryo. Lett., 1992, 13: 117~126

- 5 Wang J H, Ge J G, Liu F, et al. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo. Lett.*, 1998, 19: 123 ~ 128
- 6 Zhang Y X, Wang J H, Bian H W, et al. Pregrowth-desiccation: a simple and efficient procedure for the cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells. *Cryo. Lett.*, 2001, 22: 221 ~ 228
- 7 Crowe J H, Crowe L M, Carpenter J F, et al. Interaction of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 947: 367 ~ 384
- 8 Danyluk J, Perron A, Houde M. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during acclimation of wheat. *Plant Cell*, 1998, 10: 475 ~ 486
- 9 Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant*, 1997, 100: 291 ~ 296
- 10 Lin C, Thomas M F. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene cor15 and characterization of the COR15 polypeptide. *Plant Physiol.*, 1992, 15: 473 ~ 497
- 11 汤学军, 傅家瑞. 植物胚胎发展后期富集(LEA)蛋白的研究进展. *植物学通报*, 1997, 14: 13 ~ 18
- 12 杨晓泉, 姜效成, 傅家瑞. 花生种子耐脱水力的获得与热稳定蛋白的关系. *植物学报*, 1998, 40: 337 ~ 342
- 13 Wang Xingjun, Wendell Q S. Drying rate and dehydrin synthesis associated with abscisic acid-induced dehydration tolerance in *Spathoglottis plicata* orchidaceae protocorms. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(368): 551 ~ 558
- 14 Bian H W, Wang J H, Lin W Q, et al. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. *J. Plant Physiol.*, 2002, 159: 1139 ~ 1145
- 15 Dumet D, Benson E E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: Engellmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Italy: IPGRI, 2000. 43 ~ 56
- 16 Steponkus P L, Langis R, Fujikawa S. In: Steponkus P L. *Advances in Low-Temperature Biology*, Vol 1. London: JAI Press Ltd, 1992. 1 ~ 61
- 17 Close T J, Fenton R D, Mooney F. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxyl terminal peptide. *Plant Mol. Biol.*, 1993, 23: 279 ~ 286
- 18 Kent J B, Peter M C. Expression of "dehydrin-like" proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. *Plant Physiol.*, 1992, 99: 488 ~ 494
- 19 Walters C, Ried J L, Walker-Simmons M K. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. *Seed Science Research*, 1997, 7: 125 ~ 134

欢迎购阅《园艺学报》增刊

2000 年增刊目录:

苹果属植物区系地理学研究
应用同工酶技术鉴别同物异名柿
园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展
柑桔胞质杂种及其胞质遗传重组
类番茄茄 (*Solanum lycopersicoides*) 的研究进展
黄瓜基因及其连锁研究进展
黄瓜苦味研究概况
辣椒抗病基因工程研究中的主要问题与对策
辣(甜)椒根结线虫的危害、防治和抗病育种
温光处理调控观赏植物花期的研究进展
授粉对花衰老和乙烯生物合成的调节
彩叶植物多彩形成的研究进展
植物化学诱抗剂的研究现状与展望
拮抗菌控制果蔬采后病害研究进展
果蔬蜡液的种类及应用
桃果实水孔蛋白 cDNA 的分离
美国园艺研究简介
鲜菜供应系统的现代化

2001 年增刊目录:

果树转基因研究进展
柑桔果实有机酸代谢研究进展
果树根系对地上部的调控及其与水分利用效率的关系
阿月浑子 (*Pistacia vera* L.) 生殖生物学研究评述
蔬菜作物数量性状基因定位研究进展
蔬菜作物光合作用研究进展
胡萝卜雄性不育性研究及利用

分子标记在甘蓝类作物研究中的应用

番茄脐腐病发生机理研究综述
番茄青枯病的研究进展
番茄耐热育种研究进展
有关番茄果实中可溶性固形物和番茄红素的研究进展
芥子油苷研究进展及其在蔬菜育种上的应用前景
辣椒分子标记研究进展
我国辣椒杂交育种与杂交种子生产
昆明世界园艺博览园植物引种展示
比利时杜鹃研究进展
温室园艺作物生长发育模型研究现状与发展趋势
园艺植物的根系限制及其应用
绿色园艺——21 世纪中国园艺业的发展方向
十字花科蔬菜作物雄性不育的类型和遗传

2002 年增刊目录:

热激蛋白与园艺植物的耐冷性
园艺植物花器脱落研究进展
柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展
葡萄设施栽培生理基础研究进展
多年生果树植物分子遗传作图
我国极早熟杏育种研究进展
蔬菜抗虫育种研究进展
雄性不育基因工程及其在蔬菜育种中的应用
蕨类植物组织培养研究进展
我国甘蓝遗传育种研究概况
若干花卉转基因研究的现状和前景
中国观赏植物资源现状与展望

每册定价 10 元,编辑部自办发行,欢迎广大读者购阅。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。