

壳寡糖与草莓细胞结合过程的研究

赵小明^{1,2} 于炜婷¹ 白雪芳¹ 李伟¹ 杜昱光¹ 梁鑫淼¹

(¹中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023; ²西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要: 壳寡糖是一类能有效的诱导植物抗病性的重要激发子。本研究用 2-氨基吡啶酮 (2-AMAC) 标记壳寡糖, 应用激光共聚焦显微成像技术, 研究了壳寡糖与草莓细胞结合过程。结果表明壳寡糖能通过草莓细胞壁与细胞膜结合, 在细胞壁和细胞膜上有其结合位点, 与壳寡糖的结合具有专一性。

关键词: 壳寡糖; 草莓; 结合位点; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: Q 533; S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 01-0020-05

Binding Process of Oligochitosan to Strawberry Cells

Zhao Xiaoming^{1,2}, Yu Weiting¹, Bai Xuefang¹, Li Wei¹, Du Yuguang¹, and Liang Xinmiao¹

(¹ Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; ² College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Oligochitosan is an important elicitor that can induce resistance of plants against pathogens. The process and sites of oligochitosan binding to strawberry cells were investigated by the treatment of using labeled oligochitosan with fluorophore 2-aminoacidone and detecting the emission fluorescence by a laser scanning confocal microscopy (LSCM). Oligochitosan can bind to membrane of strawberry protoplasts and cell walls in few minutes. The results indicated that protoplasts membrane and cell walls are the main binding of oligochitosan. The binding of oligochitosan to binding sites is special.

Key words: Oligochitosan; Strawberry; Binding site; Laser scanning confocal microscopy

激发子能激发植物产生一系列防御反应, 从而减轻病原菌的危害。这种防御反应包括诱导产生植保素、蛋白酶抑制剂、水解酶 (如几丁质酶、 α -1,3-葡聚糖酶等), 胞壁糖蛋白和木质化^[1~3]。有研究表明, 激发子在植物细胞上的结合位点位于细胞膜上, 结合位点具有高亲和性、专一性及饱和性^[4~6]。研究最清楚的激发子是来源于植物病原真菌菌丝细胞壁的葡聚寡糖, Mithöfer等应用同位素标记及光亲和层析技术分析了几丁寡糖在大豆细胞膜上的结合位点。该位点是 75 kDa 的结合蛋白^[7,8]。

几丁质是除卵菌纲真菌以外其他真菌细胞壁的主要成分, 真菌细胞壁的几丁质可被植物细胞的几丁质酶酶解, 释放出可溶性的几丁寡糖激发子。几丁寡糖可以引起小麦叶片木质化^[9], 诱导水稻悬浮细胞产生植保素^[10]。Day等研究了几丁寡糖在大豆细胞膜上的结合位点是 85 kDa 的蛋白质, 并对其亲和性、专一性进行了研究^[11]。Shibuya等应用同位素标记研究了水稻细胞膜上几丁寡糖的结合位点具有受体的特性^[12]。

壳寡糖是脱乙酰基几丁质经酶解后制备的氨基葡萄糖。它可以诱导大豆、欧芹、番茄及豌豆等植物产生植保素、胍脂质及蛋白酶抑制剂^[12]。还有报道壳寡糖诱导棉花、草莓细胞活性氧的产生; 烟草几丁质酶、 α -1,3-葡聚糖酶、苯丙氨酸解氨酶的活性; 作物对病毒的抗性等^[13~16]。但有关壳寡糖激发子结合位点及细胞的整体结合情况的研究很少。本试验对壳寡糖进行荧光标记, 应用激光共聚焦显微技术研究了壳寡糖与草莓细胞的结合过程及在细胞上的结合位点。

收稿日期: 2004 - 03 - 36; 修回日期: 2004 - 05 - 25

基金项目: 国家 '863' 项目 (2003AA625010; 2002AA245131)

1 材料与方法

1 材料

草莓 (*Fragaria ananassa* 'shikinari') 组织培养细胞由本研究室提供。以 MS 固体培养基培养, 温度 25℃, 光照 12 h · d⁻¹, 光照强度 1500 lx, 每 20 d 继代培养 1 次。所用细胞继代培养 30 代以上。壳寡糖以张虎等报道的方法, 经酶降解过膜获得, 聚合度 (DP) 3 ~ 10^[17]。寡聚半乳糖醛酸由本实验室自制, 聚合度 2 ~ 10。2-氨基吡啶酮 (2-AMAC)、NaCNBH₃ 和半纤维素酶购自 Sigma 公司。果胶酶购自 Serva 公司, 纤维素酶 R_s、纤维素酶 R-10 及离析酶购自 Yakult Honsha 公司。其他试剂市购, 为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 2-AMAC 标记壳寡糖 参照 Okafo 等^[18]及 Jackson 等^[19]的方法, 并略有改进。10 mg 壳寡糖放入 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 1 mol · L⁻¹ 的 NaCNBH₃ 溶液, 震荡使壳寡糖溶解, 然后加入 3 μL 0.1 mol · L⁻¹ 2-AMAC 冰醋酸 DMSO (3 : 17, V : V) 溶液混匀, 黑暗条件下 90℃ 水浴反应 40 min 后, 放入冰中, -20℃ 中止反应。向中止反应后的离心管中加入四氢呋喃溶液萃取未反应游离的 2-AMAC, 10000 ×g, 4℃ 条件下离心 15 min, 收集沉淀物, 萃取 4 次, 沉淀物在室温下干燥后, 用 500 μL 二甲基亚砜 重蒸水 (1 : 1) 溶解, 遮光在 -20℃ 下保存。分光光度计 (JENWAY 6505 UV / Vis. U. K.) 扫描 (200 ~ 800 nm) 检测萃取效果。薄层层析法检测标记壳寡糖的纯度。

1.2.2 壳寡糖与草莓细胞结合检测 原生质体的制备及与壳寡糖结合观察参照王喆之等^[20]的方法。将 2 g 草莓愈伤组织细胞加入 10 mL 酶液中 (1% 果胶酶、0.7 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄、pH 5.8) 酶解 12 h, 再加入 3% 纤维素酶 R-10, 1% 果胶酶, 0.2% 离析酶, 0.5% 半纤维素酶, 1% 纤维素酶 R_s, 0.1% MES, 0.4 mol · L⁻¹ 甘露醇, 100 μg · L⁻¹ KH₂PO₄, CaCl₂ 1.320 g · L⁻¹ 的酶液, 在 30℃ 下酶解 8 ~ 10 h。酶解后的悬浮液用 400 目网筛过滤, 滤液经两次离心 (12 ×g, 5 min) 洗涤, 收集原生质体。用洗涤介质 (0.45 mol · L⁻¹ 甘露醇、0.7 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄、2.5 mmol · L⁻¹ Ca²⁺, 0.1% 2-N-吗啡啉乙磺酸) 将原生质体密度调到 10⁵ · mL⁻¹, 取 150 μL 原生质体液放入离心管, 加入 1 μL 标记壳寡糖溶液, 25℃ 黑暗下结合 5 ~ 30 min, 用洗涤介质 3 次洗涤, 取出原生质体液滴在载玻片上, 在激光共聚焦显微镜 (Leica SP2 型) 下观察, 激发光波长 450 nm, 发射光波长 520 nm 进行扫描。

取草莓愈伤组织细胞用洗涤介质搅拌分散, 用洗涤介质将细胞密度调到 10⁵ · mL⁻¹, 取 150 μL 细胞液放入离心管, 然后加入 1 μL 标记壳寡糖溶液混匀, 立即取出 50 μL 混合液滴在载玻片上, 在激光共聚焦显微镜下进行草莓细胞与壳寡糖结合观察并扫描。剩余液体在 25℃ 黑暗下结合 5 ~ 30 min, 用洗涤介质 3 次洗涤后, 观察扫描。

用 1.33 × 10⁻²、1.33 × 10⁻³ 和 1.33 × 10⁻⁴ mg · μL⁻¹ 未标记壳寡糖和寡聚半乳糖醛酸预处理草莓细胞及原生质体, 用洗涤液漂洗 3 次, 用标记的寡糖进行结合, 洗涤液漂洗后, 观察扫描标记寡糖与细胞及原生质体结合竞争性。

2 结果与分析

2.1 2-AMAC 标记壳寡糖

经分光光度计扫描, 寡糖与 2-AMAC 混合反应液经四氢呋喃溶液 4 次萃取后, 上清液在 295 ~ 305 nm 和 445 nm 处没有吸收峰, 而标记壳寡糖溶解后在 295 ~ 305 nm 及 445 nm 处有吸收率, 表明标记壳寡糖中没有游离的 2-AMAC, 壳寡糖已与 2-AMAC 结合。标记的壳寡糖黑暗下干燥后, 用 500 μL 二甲基亚砜 重蒸水 (1 : 1) 溶解后, 用高效薄层层析板 (TLC PLT SLICA GEL 60F-250274 RIGHT, 购于德国 E. Merck) 进行薄层层析 (TLC), 展开剂氯仿 甲醇 (1 : 1), 展开后在紫外反

射投影仪下观察照相。结果证实壳寡糖与 2-AMAC 结合, 且结合 2-AMAC 的壳寡糖中没有游离的 2-AMAC 存在。

2.2 壳寡糖与草莓细胞结合

2.2.1 壳寡糖与草莓细胞结合动态过程 洗涤介质使草莓细胞发生质壁分离, 容易观察壳寡糖与细胞膜的结合情况。壳寡糖处理不同时间的细胞扫描结果表明, 壳寡糖与草莓细胞结合开始时, 壳寡糖主要聚集在细胞壁上, 2 min 时在细胞壁上被标记的壳寡糖较多, 胞内较少, 原生质体膜上结合壳寡糖不明显。随着时间的延长, 寡糖进入细胞增多, 与细胞膜结合, 细胞膜上的荧光强度逐渐增强; 10 min 时围绕原生质体膜形成明亮的绿色荧光圈。结果 (图版, 1~3) 表明: 壳寡糖能在几分钟内穿过细胞壁进入细胞, 并与膜结合, 激发一系列防御反应。

2.2.2 壳寡糖结合草莓细胞竞争性 应用未标记的壳寡糖及寡聚半乳糖醛酸预处理草莓细胞, 然后加入标记的壳寡糖, 观察扫描。结果表明 (图版, 4~7), 未标记的壳寡糖对标记的壳寡糖结合草莓细胞有竞争作用。竞争力与未标记壳寡糖浓度有关, 未标记壳寡糖浓度为 1.33×10^{-2} 和 $1.33 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 处理后, 标记的壳寡糖与细胞没有结合, 即细胞上无荧光表现 (图版, 5)。 $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记壳寡糖处理后, 细胞能结合微量的标记壳寡糖 (图版, 6)。寡聚半乳糖醛酸对壳寡糖与细胞结合没有竞争性 (图版, 7), 试验所用上述 3 种浓度处理均未表现对壳寡糖结合细胞的影响。这表明壳寡糖与草莓细胞的结合是专一性的, 草莓的细胞壁和原生质体膜均能与壳寡糖结合, 表明细胞壁和原生质体膜有壳寡糖的结合位点。

2.3 壳寡糖结合草莓细胞原生质体及壳寡糖的竞争性

制备的原生质体与标记壳寡糖结合, 在试验中发现标记的壳寡糖 5 min 即可与原生质体结合, 试验结果进一步证明壳寡糖结合位点主要在原生质体膜上, 与壳寡糖的结合具有专一性 (图版, 8~11)。未标记壳寡糖能竞争标记壳寡糖与原生质体结合, 浓度大的竞争力大。 1.33×10^{-2} 、 1.33×10^{-3} 和 $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记的壳寡糖分别处理原生质体, 对标记壳寡糖 ($1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 结合原生质体有很大抑制作用。前两个处理加入标记壳寡糖, 看不到结合荧光物的原生质体, 而 $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记壳寡糖处理后, 能看到微弱的荧光 (图版, 9), 表明原生质体只结合少量的标记壳寡糖。寡聚半乳糖醛酸对壳寡糖与原生质体结合没有竞争作用 (图版, 10, 11), 其浓度大小不影响壳寡糖与原生质体结合。说明草莓原生质体对壳寡糖的结合具有专一性。

3 讨论

寡糖能激发植物一系列防御反应, 激发抗性表达的关键是植物能识别寡糖, 识别是通过细胞膜上与寡糖结合的受体或结合位点完成^[12]。对于壳寡糖在植物细胞上的结合位点还未见报道, 壳寡糖能否进入植物细胞没有直接证据。

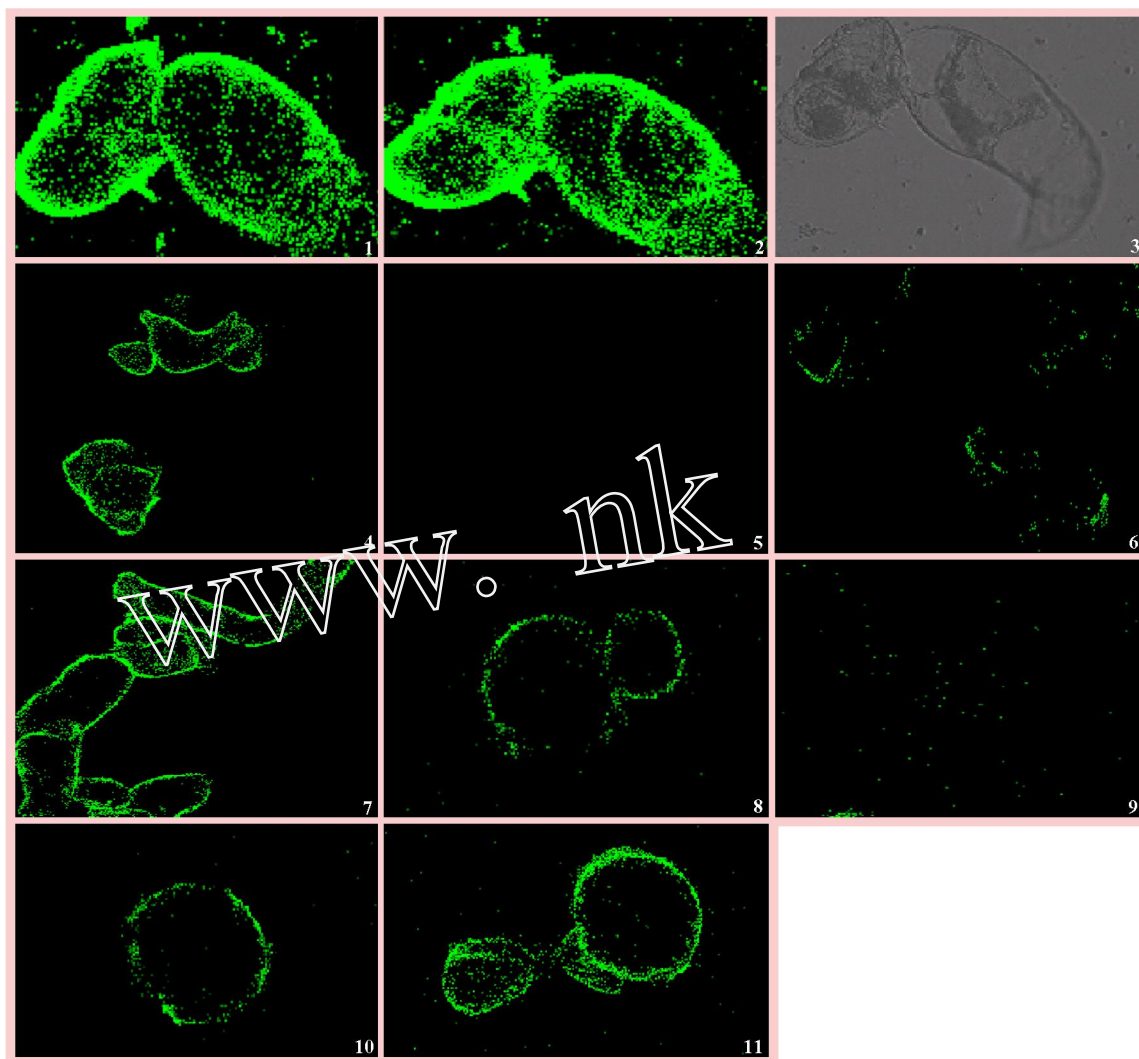
Mathieu 等^[21]报道了寡聚半乳糖醛酸 (oligogalacturonides) 是以离子键结合在烟草细胞壁上。几丁寡糖、壳聚糖及葡聚寡糖的结合位点是在植物细胞膜上^[5,12], 已有的报道是以研碎植物细胞, 提取细胞膜为材料进行研究, 没有对完整细胞进行结合试验。本文的结果表明, 壳寡糖能迅速进入草莓细胞与胞壁上及原生质膜结合, 这种结合具有专一性。

过去研究激发子结合位点都是用同位素标记, 存在一定不安全性, 试验需要在特殊条件下进行。本研究用荧光标记的壳寡糖为材料, 采用激光共聚焦显微技术进行, 安全、技术简便易行, 在细胞及原生质体水平显示了壳寡糖结合位点, 结果直观。

壳寡糖可与草莓细胞壁结合, 说明细胞壁不单纯是保护细胞的组织, 也可能参与激发子激发细胞防御反应的过程, 但具体参与那一环节及与细胞膜上结合位点的关系尚有待进一步研究。

参考文献:

- 1 Sticher L. Systemical acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35: 235 ~ 270
- 2 Ward E R, Uknes S J, Williams S C, Dincher S S, Wiedehold D L, Alexander D C, Ahl-Goy P, Metraux J P, Ryals J A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1991, 3: 1085 ~ 1094
- 3 Kuc J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Protection*, 2000, 19: 859 ~ 861
- 4 Wendehenne D, Binet M N, Blein J P, Ricci P, Pugin A. Evidence for specific, High affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Letter*, 1995, 374: 203 ~ 207
- 5 Schmidt W E, Ebel J. Specific binding of a glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*. *Botany*, 1987, 84: 4117 ~ 4121
- 6 Basse C W, Fath A, Boller T. High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (20): 14724 ~ 14731
- 7 Mithöfer A, Lottspeich F, Ebel J. One-step purification of the α -glucan elicitor binding protein from soybean (*Glycine max* L.) root and characterization of an anti-peptide antiserum. *FEBS Letters*, 1996, 381: 203 ~ 207
- 8 Cheong J J, Alba R, Cote F, Enkerli J, Hahn M G. Solubilization of functional plasma membrane-localized hepta- α -glucoside elicitor-binding proteins from soybean. *Plant Physiology*, 1993, 103: 1173 ~ 1182
- 9 Barber M S, Bertram R E, Ricle J R. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, 34: 3 ~ 12
- 10 Ren Y Y, West C A. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1169 ~ 1178
- 11 Day R B, Okada M, Ito Y, Tsukada K, Zaghouani H, Shibuya N, Stacey G. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1162 ~ 1173
- 12 Shibuya N, Minami E. Oligosaccharide signaling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, 59: 223 ~ 233
- 13 杜昱光, 白雪芳, 赵小明, 姜华. 壳寡糖对烟草防御酶活性及同工酶谱的影响. *中国生物防治*, 2002, 18 (2): 83 ~ 86
Du Y G, Bai X F, Zhao X M, Jiang H. The effect of oligochitosan on the activity of defensive enzyme and zymogram of isoenzyme in tobacco leaves. *Chinese Journal of Biological Control*, 2002, 18 (2): 83 ~ 86 (in Chinese)
- 14 赵小明, 李冬鸿, 杜昱光, 白雪芳. 2%氨基寡糖防治苹果花叶病. *植物保护*, 2002, 28 (5): 15 ~ 17
Zhao X M, Li D H, Du Y G, Bai X F. Field experiments on oligochitosan for controlling apple mosaic disease. *Plant Protection*, 2002, 28 (5): 15 ~ 17 (in Chinese)
- 15 郭红莲, 杜昱光, 白雪芳, 赵小明. 壳寡糖对棉花悬浮培养细胞活性氧的作用. *中国海洋药物*, 2003, 22 (1): 11 ~ 12
Guo H L, Du Y G, Bai X F, Zhao X M. Effects of active oxygen on suspended cotton cell culture by oligochitosan. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2003, 22 (1): 11 ~ 12 (in Chinese)
- 16 郭红莲, 白雪芳, 李曙光, 杜昱光. 壳寡糖诱导草莓细胞活性氧代谢的变化. *园艺学报*, 2003, 30 (5): 577 ~ 579
Guo H L, Bai X F, Du Y G, Li S G. The effect of oligochitosan on active oxygen metabolism of suspension strawberry cells. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30 (5): 577 ~ 579 (in Chinese)
- 17 Zhang H, Du Y G, Yu X J. Preparation of chito oligosaccharides from chitosan by an enzyme mixture. *Carbohydrate Research*, 1999, 320 (3 - 4): 257 ~ 260
- 18 Okafo G, James L, North S. High-performance liquid chromatographic analysis of complex N-linked glycans derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical Chemistry*, 1997, 69: 4985 ~ 4993
- 19 Jackson P. Polyacrylamide gel electrophoresis of reducing saccharides labeled with the fluorophore 2-Aminoacridone: subpicomolar detection using an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196: 238 ~ 244
- 20 王喆之, 张苏峰, 胡正海. 陆地棉胚性愈伤组织原生质体的制备、培养及植株再生. *植物学报*, 1998, 40 (3): 234 ~ 240
Wang Z Z, Zhang S F, Hu Z H. Isolation, culture and plant regeneration of protoplasts from an embryogenic callus tissue of *Gossypium hirsutum*. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40 (3): 234 ~ 240 (in Chinese)
- 21 Mathieu Y, Guem J, Spiro M D, O'Neill M A, Kates K, Darvill A G, Albersheim P. The transient nature of the oligogalacturonide-induced ion fluxes of tobacco cells is not correlated with fragmentation of the oligogalacturonides. *The Plant Journal*, 1998, 16 (3): 305 ~ 311



图版说明：1：2 min时壳寡糖与细胞的结合情况；2：10 min时壳寡糖与细胞的结合情况；3：可见光下草莓细胞；4： $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 标记壳寡糖结合细胞荧光照片；5： $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记壳寡糖竞争后细胞荧光照片；6： $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记壳寡糖竞争后细胞荧光；7： $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 寡聚半乳糖醛酸竞争后细胞荧光；8：结合标记壳寡糖的草莓原生质体；9： $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记壳寡糖竞争后原生质体荧光；10： $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记寡聚半乳糖醛酸竞争后原生质体荧光；11： $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记寡聚半乳糖醛酸竞争后原生质体荧光。

Explanation of plates: 1: The binding of 2-AMAC-oligochitosan to strawberry cells in 2 min; 2: The binding of 2-AMAC-oligochitosan to strawberry cells in 10 min; 3: Bright-field image of strawberry cells; 4: Binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 5: Pretreated with $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligochitosan before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 6: Pretreated with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligochitosan before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 7: Pretreated with $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligogalacturonide before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 8: Binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 9: pretreated with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligochitosan before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 10: Pretreated with $1.33 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligogalacturonide before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan; 11: Pretreated with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ unlabeled oligogalacturonide before binding with $1.33 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 2-AMAC-oligochitosan.