

干旱胁迫诱导苹果属植物细胞程序性死亡的研究

谭冬梅^{1,2}, 许雪峰¹, 李天忠¹, 韩振海^{1*}

(¹ 中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094; ² 潍坊学院生物工程学院, 山东潍坊 261061)

摘 要: 用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG6000) 对苹果属植物平邑甜茶 (*Malus hupehensis* pamp. Reld.) 和新疆野苹果 [*M. sieversii* (Ledeb.) Roem.] 幼苗进行水分胁迫处理, 通过 Southern 杂交和 Western 杂交的方法检测胁迫条件下幼苗体内 DNA Ladder 及 Caspase-3 蛋白酶。Southern 杂交结果表明, 干旱处理后, 两种苹果的根和叶片中都有 DNA Ladder 产生; Western 杂交结果显示, 在苹果的叶片中有杂交印迹, 而根中没有。这说明干旱胁迫可以诱导两种苹果属植物发生细胞程序性死亡, 并且在细胞程序性死亡过程中叶片中都有类 Caspase-3 蛋白酶的产生。

关键词: 苹果属; 干旱胁迫; 细胞程序性死亡; DNA Ladder; Caspase-3

中图分类号: S 661 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0275-04

The Physiology and Biochemistry Analyzing of Programmed Cell Death under Drought Stress in *Malus hupehensis* and *M. sieversii*

TAN Dong-mei^{1,2}, XU Xue-Feng¹, LI Tian-zhong¹, and HAN Zhen-hai^{1*}

(¹ Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² Department of Agriculture and Engineering, Weifang University, Weifang, Shandong 261061, China)

Abstract: Seedlings of *Malus sieversii* and *M. hupehensis* treated with polyethylene glycol (PEG6000) were used to study the characters of *Malus* species under drought stress. DNA Ladders were found in roots and leaves in these species after being subjected to drought stress. And the results of Western blotting showed that blots appeared in leaves but not in roots. These results indicated that drought stress could induce programmed cell death in *Malus* plants. And Caspase-3 was produced in leaves in these two *Malus* species during this process.

Key words: *Malus*; Drought stress; Programmed cell death; DNA Ladder; Caspase-3

细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 是由基因编程调控的细胞自主性自杀过程。细胞程序性死亡的主要生化特征是: 细胞被诱导产生核酸内切酶, 核 DNA 从核小体间降解断裂, 产生带有 3'-OH 端的、大小不同的寡聚核小体片段。这些片段在凝胶电泳上可以见到 140 bp 倍增的 DNA 梯形条带 (DNA Ladder) (王雅清和崔克明, 1998)。细胞程序性死亡过程一般分为诱导期、效应期和降解期。其中半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 的激活是细胞程序性死亡的关键步骤, 该步一旦实施, 细胞的死亡将不可避免 (史刚荣, 2002)。许多研究都将 DNA Ladder 的产生作为鉴定细胞程序性死亡的一个重要生化指标 (Douglas & Michale, 1996; Stein & Hansen, 1999)。也有学者对植物体中的 Caspase 蛋白酶进行了相关研究 (Orzaez & Graneli, 1997)。作者从苹果叶片及根系中提取 DNA 以及总蛋白, 期望通过 DNA Ladder 的产生情况来判断干旱处理是否能诱导苹果属植物发生细胞程序性死亡, 并通过蛋白免疫杂交来检测发生细胞程序性死亡过程中是否有 Caspase 蛋白酶的出现。

收稿日期: 2006 - 09 - 14; 修回日期: 2007 - 03 - 23

基金项目: 北京市重点实验室资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: rschan@cau.edu.cn)

1 材料与方法

1.1 材料与处理

选取均匀一致的平邑甜茶（抗旱性较弱）和新疆野苹果（抗旱性较强）种子，去除种壳，蒸馏水浸泡 12 h，沙布包好放在培养皿中置于 4℃ 冰箱中层积。层积过程中每隔 2 d 用清水冲洗 3 遍，尽量甩干水分以免发霉。选发芽一致的种子播入蛭石中室温下培养。幼苗长至 4 片真叶时移入 1/2 剂量的 Hoagland 营养液培养。7 d 后，改用全剂量 Hoagland 营养液培养。营养液用 KOH 调至 pH 6.0，每 7 d 更换 1 次，每天定时通气，人工恒定日光灯光源，14 h 光照，光照强度 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，温度为白天 25℃ ~ 28℃，夜间 22℃ ~ 25℃。

取 6 月龄幼苗，移入含有 20% 聚乙二醇（PEG6000）的营养液中进行水分胁迫处理，设 3 次重复；对照为正常营养液水培。从胁迫处理开始，第 1 次取样时间为早晨 8:00，以后平邑甜茶每 0.5 d 取样 1 次，新疆野苹果每天取样 1 次，选取生长一致的幼苗顶端相同节位叶片进行各项指标测定。

1.2 方法

1.2.1 叶片及根中总 DNA、总蛋白的提取及含量测定 用 CTAB 法（2% CTAB，100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，pH 8.0；60 mmol·L⁻¹ EDTA，pH 8.0；1.4 mol·L⁻¹ NaCl，1% PVP，1% BME）提取总 DNA，并用紫外分光光度计测定 DNA 的含量（萨姆布鲁克和拉塞尔，2005）。称取 1.0 g 叶片或根系，用液氮将样品快速研成粉末装管，每管加入 3 mL 蛋白提取液（100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，50 mmol·L⁻¹ EDTA，100 mmol·L⁻¹ KCl，2 mmol·L⁻¹ DTT，2 mmol·L⁻¹ PMSF，10% 甘油，pH 7.5），振荡混匀，置于 4℃ 冰箱抽提 2 h 以上，离心（4℃，12 000 r·min⁻¹）15 min。提取上清液，用紫外分光光度计测定蛋白含量，并进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白条带（汪家政和范明，2000）。

1.2.2 Southern 杂交 DNA 上样量为 10 μg。以模板 DNA（用 *EcoR* 酶切正常组织基因组 DNA 后的 DNA 片段总和）制作杂交探针（萨姆布鲁克和拉塞尔，2005）。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳及 Western 免疫印迹 取各样品蛋白 20 ng 用于 SDS-PAGE 电泳（浓缩胶 5%，分离胶 12%），然后将凝胶的 Marker 泳道切下放入考马斯亮蓝染色液中染色，用脱色液脱色后做蛋白分子量标记用；余下的样品胶进行电转后用于 Western 杂交并拍照（汪家政和范明，2000）。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫诱导叶片及根中产生 DNA Ladder

Southern 杂交结果显示，新疆野苹果和平邑甜茶的叶片及根，在正常营养液培养条件下总 DNA 为一条完整的带，没有降解现象（图 1 和图 2 的泳道 1）。用 20% PEG6000 处理后，平邑甜茶叶片 DNA 从 1 d 开始降解（图 1，A 中泳道 3），根从 0.5 d 开始降解（图 1，B 中泳道 2）；而新疆野苹果叶片和根 DNA 均从 1 d 开始降解（图 2，泳道 2）。降解表现为 DNA Ladder 的出现（在杂交图片下部的 DNA 片段），片段大小为 180 bp 左右。可见，两个试材在处理过程中都发生了细胞程序性死亡。有研究表明，在植物材料中常难检测到清晰的 DNA Ladder（Cohen et al，1992；Walker & Sikorska，1997），只在个别物种中有理想的 DNA Ladder（陈浩明等，1999；Maccarone et al，2000）。有学者认为：在细胞程序性死亡的过程中，如果 DNA 是单链断裂，在电泳图谱上就很难观察到 DNA 的梯形条带；而且在对一个生物组织的 DNA 进行凝胶电泳时，由于活细胞、程序化死亡细胞和坏死细胞并存，活细胞和坏死细胞会严重干扰程序化死亡细胞 DNA 凝胶电泳条带的出现，所以 DNA Ladder 常很难分辨（Cohen et al，1992；Walker & Sikorska，1997）。本试验中干旱胁迫条件下两种苹果属植物都有 DNA Ladder 出现，在新疆野苹果中条带比较清晰，而在平邑甜茶中比较模糊，可能也是出于这个原因。因此在进行细胞程序性死亡判定时，以多项生理生化指标综合判定能得出更为可靠的结果。

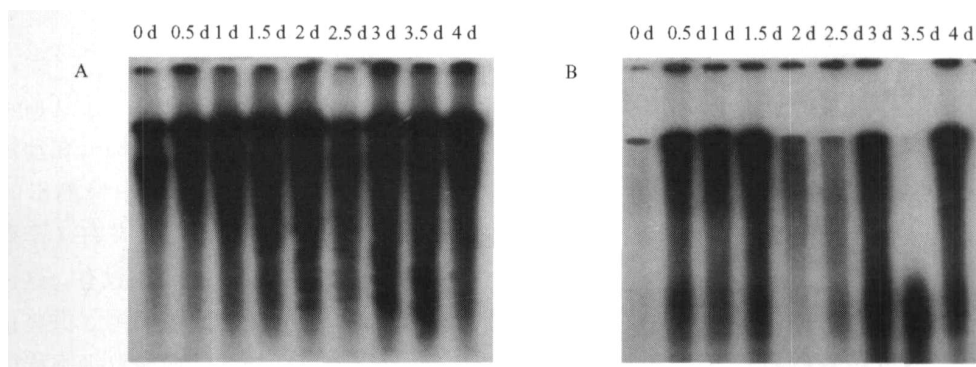


图 1 20% PEG6000处理后平邑甜茶叶片 (A) 和根 (B) 的 Southern blot结果

Fig 1 The results of Southern blot in leaves (A) and roots (B) of *M. hupehensis* treated with 20% PEG6000

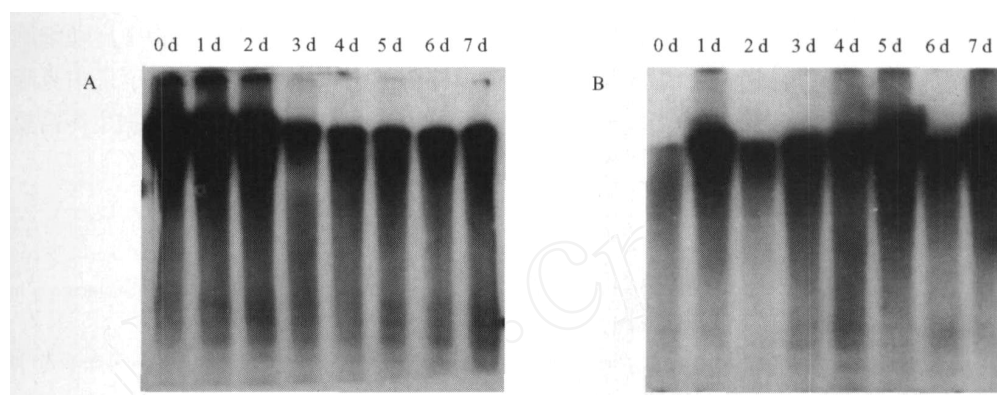


图 2 20% PEG6000处理后新疆野苹果叶片 (A) 和根 (B) 的 Southern blot结果

Fig 2 The results of Southern blot in leaves (A) and roots (B) of *M. sieversii* treated with 20% PEG6000

2.2 干旱胁迫诱导 PCD 产生时类半胱氨酸蛋白酶 (Caspase-3) 的表达

由于选用的抗体是针对动物的抗体，所以在试验中出现的蛋白印迹称之为类 Caspase-3 蛋白酶。图 3 和图 4 分别显示了干旱胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片及根中类 Caspase-3 的表达情况。无论是平邑甜茶还是新疆野苹果，叶片中均有类 Caspase-3 的印迹条带，分子量大约为 40 kD (图 3, A 和图 4, A)。而在两种苹果的根中都没有印迹产生 (图 3, B 和图 4, B)。

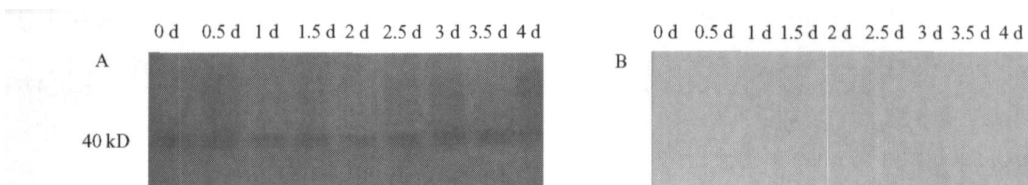


图 3 20% PEG6000处理后平邑甜茶叶片 (A) 及根 (B) 的 Western blot结果

Fig 3 The Western blot results in leaves (A) and roots (B) of *M. hupehensis* treated with 20% PEG6000

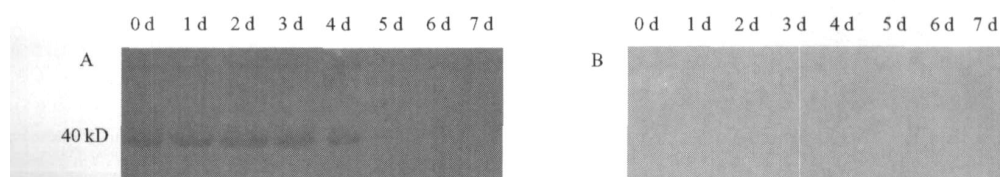


图 4 20% PEG6000处理后新疆野苹果叶片 (A) 及根 (B) 的 Western blot结果

Fig 4 The Western blot results in leaves (A) and roots (B) of *M. sieversii* treated with 20% PEG6000

3 讨论

在细胞程序性死亡过程中起关键性作用的蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶 (Caspases), 而且 Caspases 是一个半胱氨酸蛋白酶家族。其中的 Caspase-3 为凋亡效应子, 位于级联反应下游。Caspase 在动物体中以酶原的形式存在, 受信号刺激活化后才能诱导细胞程序性死亡发生。本研究中检测出的类 Caspase-3 的分子量大约为 40 kD, 比动物细胞中 Caspase-3 的分子量 (32 kD) 大 8 kD 左右 (李嘉琦和吴娟, 2003)。本研究结果表明, 干旱胁迫下苹果叶片中有类 Caspase-3 存在, 而根中没有。这说明在苹果叶片中本身就有半胱氨酸蛋白酶存在; 在受到干旱胁迫后, 根首先感受到胁迫信号, 并将信号传到叶片, 在叶片中启动类 Caspase 蛋白酶基因, 诱发类 Caspase 蛋白酶活性, 从而导致细胞程序性死亡发生。

既然在苹果细胞程序性死亡中证明有类 Caspase 存在, 今后应重点研究确定类 Caspase 是否也像动物细胞的 Caspase 一样, 具有启动细胞程序性死亡的作用, 进而研究它在苹果属植物中启动细胞程序性死亡的机制及调控机理; 找到上游凋亡始动子, 比如 Caspase-8、Caspase-9 等, 在苹果中克隆出凋亡始动子基因, 并将其转入苹果, 进一步验证它们在苹果中的表达及功能, 为今后根据生产需要培育抗凋亡及促凋亡的新种奠定理论基础。

References

- Cohen GM, Sun XM, Snowden R T, Dinsdale D, Skilleter D N. 1992. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochemical Journal*, 286 (2): 331 - 334.
- Chen Hao-ming, Yan Chang-hui, Jiang Xiao-fang, Xia Hui-li, Zhu Hai-zhen, Wu Yi, Dai Rao-ren. 1999. Heat shock induced apoptosis in tobacco suspension cells. *Chinese Science Bulletin*, 44 (2): 196 - 200. (in Chinese)
- 陈浩明, 颜长辉, 姜晓芳, 夏慧莉, 朱海珍, 吴逸, 戴尧仁. 1999. 热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡. *科学通报*, 44 (2): 196 - 200.
- Douglas E R, Michèle C H. 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell*, 8: 393 - 402.
- Li Jia-qi, Wu Juan. 2003. Caspases and apoptosis. *Progress in Veterinary Medicine*, 24 (1): 53 - 55. (in Chinese)
- 李嘉琦, 吴娟. 2003. Caspases 与细胞凋亡. *动物医学进展*, 24 (1): 53 - 55.
- Maccarone M, Zadelhoff G V, Veldink G A, Vliegthart J F G, Finazzi A A. 2000. Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry*, 267 (16): 5078 - 5084.
- Orzaez D, Granell A. 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during capel senescence in *Pisum sativum*. *the Plant Journal*, 11: 137 - 144.
- Sambrook J, Russell D W. 2005. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. Huang Pei-tang translation. Beijing: Science Press: 492 - 499. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 2005. *分子克隆实验指南*. 第 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社: 492 - 499.
- Shi Gang-rong. 2002. Programmed cell death in plants. *Biology Teaching*, 27 (1): 34 - 35. (in Chinese)
- 史刚荣. 2002. 植物细胞程序性死亡. *生物学教学*, 27 (1): 34 - 35.
- Stein J C, Hansen G. 1999. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiology*, 121: 71 - 79.
- Walker P R, Sikorska M. 1997. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochemistry Cell Biology*, 75 (4): 287 - 299.
- Wang Jia-zheng, Fan Ming. 2000. *Manual of protein technology*. Beijing: Science Press: 77 - 184. (in Chinese)
- 汪家政, 范明. 2000. *蛋白质技术手册*. 北京: 科学出版社: 77 - 184.
- Wang Ya-qing, Cui Ke-ming. 1998. Programmed cell death during the vessel element differentiation of the secondary xylem in *Eucalyptus urophylla* shoots. *Acta Botanica Sinica*, 40: 1102 - 1107. (in Chinese)
- 王雅清, 崔克明. 1998. 杜仲次生木质部导管分子分化中的程序性死亡. *植物学报*, 40: 1102 - 1107.