

研磨诱导法建立水稻细胞凋亡体系

杨华¹, 饶力群^{1*}, 郭纯², 李煌¹, 彭国平¹

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410007)

摘要: 为了建立一种便捷、经济、耗时短并能应用于水稻细胞凋亡研究的体系, 运用研磨法建立水稻细胞(团)体系, 该体系经过500 mg/L水杨酸、250 mmol/L CaCl₂、ZnCl₂和MgCl₂诱导, 应用琼脂糖凝胶电泳检测. 结果显示, 体系在水杨酸诱导6 h后, 便出现小于1 kb的小片段, 并随着时间的延长, 小片段显著增加. CaCl₂、ZnCl₂和MgCl₂诱导4 h后, 均能使DNA片段化, 并产生典型的DNA Ladder现象, 由此可以初步断定已建立起细胞凋亡体系.

关键词: 研磨; 水稻; 细胞凋亡; 体系

中图分类号: Q942 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0385-03

Establishment of cell apoptosis system in rice by grinding method

YANG Hua¹, RAO Li-qun^{1*}, GUO Chun², LI Huang¹, PENG Guo-ping¹

(1.College of Bioscience and Biotechnology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: In order to establish a convenient, economical and short time-consuming system which can be applied for the research of apoptosis in rice cell, rice cell (cell mass) system was established by the grinding method, and then was induced by 500 mg/L salicylic acid, 250 mmol/L CaCl₂, ZnCl₂ and MgCl₂ respectively. The results were determined by gel electrophoresis. This study showed that DNA fragments smaller than 1 kb appeared in the system induced by salicylic acid for 6 h, and the number of small fragments increased substantially with the treating time lasting, while the systems induced by CaCl₂, ZnCl₂ and MgCl₂ were all able to induce DNA fragmentation in 4 h, producing the typical DNA ladder. Therefore, it can be concluded preliminarily that cell apoptotic system has been established successfully.

Key words: grind; rice; cell apoptosis; system

植物细胞凋亡的研究逐步深入, 但植物细胞凋亡的同步性低, 凋亡时间短, 细胞内各种因子相互作用, 调控机制极其复杂, 使分子生物学技术应用用于细胞凋亡的研究仍存在很大困难^[1-3]. 近年来, 建立悬浮细胞体系和非细胞体系研究细胞凋亡的模式, 弥补了上述不足. 这2种体系都需要进行细胞培养, 建立悬浮系统所需时间长, 技术要求较高, 特别是对于禾本科植物, 如水稻, 建立悬浮系统非常困难. 非细胞体系更是需要制备原生质体, 周期长, 技术难度大. 笔者尝试运用研磨法建立水稻细胞(团)体系, 经过水杨酸、CaCl₂、MgCl₂、ZnCl₂

处理^[4-8], 试图建立一种便捷、经济、耗时短、能应用于水稻细胞凋亡研究的体系, 现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 水稻研磨细胞(团)体系的建立

水稻新香优80, 种子发芽, 27 °C、弱光条件下水培, 至苗长10 cm, 选取绿色健康的嫩苗, 剪碎, 加入液氮研磨成粉后, 转移至4%的蔗糖溶液, 在溶液中加入诱导剂, 110 r/min, 27 °C振荡培养.

1.2 水稻研磨细胞(团)的处理

(1) 用500 mg/L水杨酸蔗糖溶液处理液氮研磨

收稿日期: 2009-12-28

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(2009NK3096); 湖南农业大学青年基金项目(06QN14)

作者简介: 杨华(1977—), 男, 湖南株洲人, 博士研究生, 从事植物抗逆生物化学研究, yhua7710@126.com; *通讯作者, raoliquan@163.com

的细胞(团),以不加水杨酸的蔗糖溶液培养液氮研磨的细胞(团)为对照,12 h内每隔3 h分别取样提取DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 分别用含250 mmol/L CaCl_2 、250 mmol/L MgCl_2 、250 mmol/L ZnCl_2 的蔗糖溶液处理液氮研磨的细胞(团),以蔗糖溶液培养液氮研磨的细胞(团)为对照,分别于3、6 h后取样,提取DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

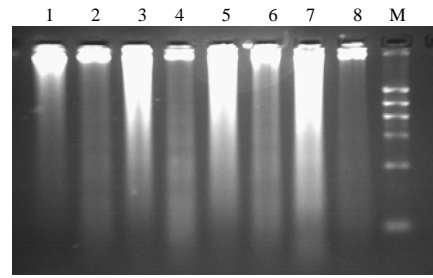
1.3 DNA的提取与检测

每隔3 h取1组处理与对照,分别用布氏漏斗抽漏干净,蒸馏水洗3次,然后分别再用液氮研磨。每0.5 g样品加入2 mL预热(60 °C)的DNA提取缓冲液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% β -巯基乙醇, 1% PVP)充分混匀;60 °C水浴60 min,其间摇匀几次;加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)轻摇混合,12 000 r/min 4 °C离心5 min,取上清;重复上述步骤2次;取上清,加入2倍体积的冷无水乙醇轻柔混匀,12 000 r/min 4 °C离心5 min;弃上清,沉淀用70%乙醇洗涤1次,12 000 r/min 4 °C离心1 min;DNA沉淀干燥,加入TE和RNase,37 °C水浴30 min;加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)混匀,12 000 r/min 4 °C离心5 min;取上清,加入2倍体积冷无水乙醇,12 000 r/min 4 °C离心5 min;弃上清,加入50 μL ddH₂O,离心,备用。1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的DNA质量。

2 结果与分析

2.1 水杨酸处理对水稻研磨细胞(团)DNA的影响

由图1可以看出,未经水杨酸处理的水稻研磨细胞(团)均无明显降解(2、4、6、8泳道)。而经500 mg/L水杨酸处理3 h后,水稻研磨细胞(团)的DNA出现了降解,只是此时DNA片段较大(3~5 kb)(1泳道)。随着处理时间的延长,DNA降解加剧。6 h后出现少量1 kb以下的小片段(3泳道),9 h以后,小片段显著增加(5、7泳道)。但水杨酸处理并没有诱导水稻产生典型的DNA Ladder现象。



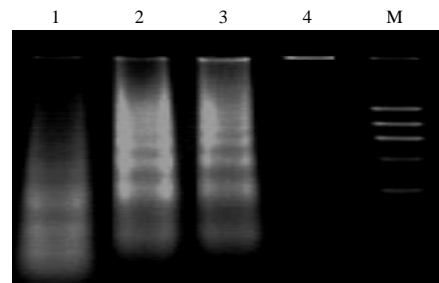
1、3、5、7 分别是3、6、9、12 h处理组 DNA ladder 检测;2、4、6、8 分别是3、6、9、12 h对照组 DNA ladder 检测;M Ladder marker.

图1 水杨酸处理水稻研磨体系后DNA的变化

Fig. 1 The changes of DNA in the grinded rice cell (cell mass) treated with SA

2.2 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 及 Zn^{2+} 对水稻研磨细胞(团)DNA的影响

根据杨征等^[6]的研究,250 mmol/L CaCl_2 处理水稻愈伤组织,其DNA在4 h后发生明显降解,因而选择250 mmol/L的 CaCl_2 、 MgCl_2 、 ZnCl_2 处理水稻研磨细胞(团),4 h后提取DNA,并检测DNA的变化情况,由图2可以看出,250 mmol/L CaCl_2 、 ZnCl_2 和 MgCl_2 处理4 h后,DNA均发生降解,形成典型的DNA Ladder带,而且 CaCl_2 和 MgCl_2 诱导效果大致相当。



1 ZnCl_2 处理 2 CaCl_2 处理 3 MgCl_2 处理 4 对照 M Ladder marker.

图2 CaCl_2 和 MgCl_2 及 ZnCl_2 处理水稻研磨体系后DNA的变化

Fig. 2 The changes of DNA in the grinded rice cell (cell mass) treated with CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2

3 讨论

研究^[8-10]揭示,经历细胞凋亡过程的细胞会呈现体积缩小,染色质凝集、断裂、趋边化,细胞器解体、消失,细胞膜发泡形成凋亡小体(其中包含有凝集的细胞断片和细胞器等)等变化。分子生物学证据也逐步被阐明:细胞染色质DNA在核小体连接部位断裂,其片段大小为200 bp的倍数,经琼脂糖凝胶电泳可见到特征性的DNA梯度^[11]。本试验中

CaCl₂、MgCl₂以及ZnCl₂均诱导水稻研磨细胞(团)产生典型的DNA Ladder现象,表明CaCl₂、MgCl₂及ZnCl₂能诱导水稻细胞凋亡。而杨征等^[6]报道,受Ca²⁺、Mg²⁺诱导的水稻愈伤组织产生DNA片段化,但并不形成DNA Ladder。笔者分析认为,水稻愈伤组织中各细胞同步性差,细胞凋亡时染色质DNA降解程度不一致。而采用液氮研磨时的低温在一定程度上促使细胞同步化,从而呈现典型的DNA Ladder现象。

研究发现,在动物的凋亡中还存在不形成DNA Ladder的降解途径^[12],这在植物细胞凋亡的研究中也有同样的发现。大量证据表明,DNA降解为180 bp或180 bp倍数的寡核苷酸并非是所有细胞凋亡特有的现象,某些凋亡细胞并不出现梯状DNA图谱^[13]。水杨酸生物合成能被各种逆境激发的活性氧激活^[3-4]。它接受上游活性氧信号、cAMP信号、Ca和H⁺的浓度信号而作为信使。在下游可以通过调节一氧化氮合成酶(NOS)和乙烯来导致凋亡,也可以直接导致凋亡^[14]。另一方面,它也可以通过MAPK级联反应或其他途径来调控防御基因表达^[15]。本试验结果也进一步证实了这一观点,即水杨酸能诱导水稻细胞产生DNA片段化,但并不形成DNA Ladder。

笔者参考杨征等^[6]的研究,以水杨酸、CaCl₂、MgCl₂以及ZnCl₂处理水稻研磨细胞(团),可以初步断定应用研磨诱导法已建立起细胞凋亡体系。将水稻幼苗液氮冷冻研磨成小的细胞团,确实造成了一些细胞的坏死。但由于液氮的速冻作用,大量的细胞得以存活。细胞凋亡是多细胞生物体在发育过程中或在某些环境因子的作用下发生的受基因调控的主动死亡方式。细胞凋亡中染色体DNA的断裂是个渐进的过程,染色体DNA先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为50~300 kb的大片段,然后大约30%的染色质DNA在Ca²⁺和Mg²⁺依赖的核酸内切酶作用下,在核小体单位之间被随机切断,形成180~200 bp核小体DNA多聚体。在琼脂糖凝胶电泳检测时表现为Ladder带。而细胞坏死则不会出现这种现象。也正由于这一特殊性,可以忽略研磨造成的坏死细胞的影响。

应用研磨法建立细胞凋亡体系,有以下优点:

1) 周期短。从种子萌发到研磨体系的建立大概只需7~9 d。2) 技术要求低。只需种子发芽成苗后研磨成小细胞团。3) 所需药品少,不需要特殊仪器设备。研

磨诱导法获得的凋亡细胞与其他体系诱导获得的凋亡细胞在细胞形态建成、生理生化变化等方面情况是否一致还需比较,因此该体系能否可以直接用于研究细胞凋亡机制还有待进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 蒋争凡,翟中和.细胞凋亡[J].科学通报,1999,44(18): 1920-1928.
- [2] Taylor C B. Defense response in plants and animal: More of the same[J]. Plant Cell, 1998, 10: 873-876.
- [3] Wyllie A H. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation [J]. Nature, 1980, 284: 555-556.
- [4] 向华,饶力群,肖立峰.水杨酸对水稻种子萌发及其生理生化的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(1): 12-14.
- [5] 张素勤,耿广东,程智慧.外源水杨酸对茄子抗寒性的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(6): 687-689.
- [6] 杨征,蔡陈陵,何光存,等. Ca²⁺诱导水稻细胞DNA片段化的研究[J].作物学报,1999,25(6): 707-711.
- [7] 周涌,洪亚辉,陈鹏,等.不同诱导剂诱导黄瓜愈伤组织凋亡的研究[J].湖南农业科学,2007(5): 73-74, 78.
- [8] 肖军,高洁.高等植物细胞凋亡的诱因及生物学意义[J].山东农业大学学报,2008,39(1): 125-128.
- [9] 王磊,宿红艳,王媛,等.温度对烟草愈伤组织细胞凋亡的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(1): 44-46.
- [10] 仪慧兰,仪民,吴婷. SO₂诱导拟南芥保卫细胞凋亡[J].山西大学学报,2009,32(4): 621-626.
- [11] 范作晓,沈法富,谢庆恩,等.植物细胞凋亡的检测方法[J].生物技术通讯,2007,18(1): 163-165.
- [12] Oberhammer F, Wilson J W, Dive C, et al. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation[J]. EMBO J, 1993, 12: 3679-3684.
- [13] Joseph R, Li W, Han E. Neuronal death, cytoplasmic calcium and internucleosomal DNA fragmentation: Evidence for DNA fragments being released from cells [J]. Mol Brain Res, 1993, 17: 70-76.
- [14] Rao M V, Dais K R. The physiology of ozone induced cell death[J]. Planta, 2001, 213(5): 682-690.
- [15] Asai T, Stone J M, Heard J E, et al. Fumonisin B1 induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylic-dependent signaling pathways[J]. Plant Cell, 2000, 12: 1823-1835.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平