

水杨酸作用下东北红豆杉细胞的二维凝胶电泳分析

乔建军 赵 红 葛志强 元英进* 曾安平

(天津大学化工学院制药工程系,天津 300072)

摘 要 东北红豆杉悬浮培养体系中加入适量浓度的水杨酸,染色结果表明,水杨酸可以增加细胞膜通透性,并可诱导部分细胞发生核凝集或核碎裂。提取细胞染色体 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,发现染色体 DNA 发生了部分降解。应用蛋白质双向凝胶电泳技术,研究了水杨酸处理后东北红豆杉细胞发生应激反应过程中蛋白质的表达情况,分析了处理细胞与正常细胞的蛋白质组差异,发现在水杨酸处理 48h 后的样品中有 7 个蛋白质差异点,而且有 6 个蛋白点仅在对照中检测到。结果表明,外加水杨酸改变了东北红豆杉细胞的基因表达,抑制部分蛋白合成的同时也合成了部分新蛋白质,这些蛋白可能与水杨酸的作用有关。

关键词 水杨酸,东北红豆杉细胞,细胞凋亡,二维凝胶电泳,蛋白质组

中图分类号 Q945,Q942 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0092-05

水杨酸(Salicylic acid, SA)是植物细胞内普遍存在的一种酚类化合物,它在植物细胞中具有多种生理调节作用^[1],SA 及其盐类被认为是一类新的植物激素^[2]。研究表明,烟草叶片接种烟草花叶病毒(Tomato mosaic virus, TMV)后,SA 含量会大大增加,并可进一步诱导病源相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, PRs)的积累及植物抗病性的产生^[3]。水杨酸羟化酶(E.C.1.14.13.1)能够降解 SA,大量表达水杨酸羟化酶的转基因烟草植株丧失了积累 SA 的能力,同时也丧失了产生抗病能力,说明 SA 是植物产生抗病性必需的物质^[4-6]。另外,外源添加 SA 同样能够诱导植物积累 PRs 并产生抗病反应^[7-8]。

在基因或蛋白质水平研究 SA 对于植物细胞的生理生化作用是目前最为有效的研究手段。通常认为,蛋白质的表达可以通过基因产物-mRNA 的水平反映出来,然而,最新研究表明,基因的表达水平与细胞中相应蛋白质的含量并没有严格的一致性^[9]。直接在蛋白质组水平研究 SA 作用后蛋白质表达的变化,更有利于阐明 SA 的作用机理。利用二维凝胶电泳技术可以对东北红豆杉细胞的蛋白质组进行分析,研究 SA 作用后细胞中蛋白表达的变化,为研究 SA 的作用机理奠定基础。

1994 年澳大利亚的两位学者 Wilkins 和 Williams 首先提出了蛋白质组(Proteome)的概念,即基因组表

达的全部蛋白质,或指细胞、组织或肌体在特定时间和空间所表达的所有蛋白质^[10]。1975 年,O'Farrell 等人建立了二维凝胶电泳的方法^[11],此法经逐步改进后可取得良好的实验效果^[12-13]。

本文研究了外加 SA 对于东北红豆杉悬浮培养细胞的影响,结果表明,外源添加 SA 可以增加细胞膜的通透性,导致部分染色体 DNA 发生降解,细胞发生强烈的应激反应。应用二维凝胶电泳技术研究东北红豆杉悬浮培养细胞在 SA 作用下的蛋白表达变化,找到部分与 SA 作用可能相关的蛋白点,为研究细胞发生应激反应的分子机理以及水杨酸的作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株系及细胞悬浮培养

东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)细胞从东北红豆杉幼茎诱导所得,采用改良的 B₅ 固体培养基继代培养^[14],每 30d 接种 1 次。生长良好的细胞可转入改良的 B₅ 液体培养基中,在 25℃、110 r/min 的黑暗条件下悬浮培养五代以获得生长状态良好的细胞,在传代第 7 天时加入适当浓度的 SA,备实验所用。

1.2 实验设备及试剂

二维凝胶电泳系统购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。pH3~10 线性 18cmIPG 预制胶条、IPG

缓冲液、蛋白质银染试剂盒、二硫苏糖醇(DTT)均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。Propidium-iodine(PI) and Hoechst 33342 购自 Sigma 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞染色:取 1mL 细胞培养液,1500 r/min 离心 10 min,然后将沉淀用 PBS(0.8% 氯化钠、0.02% 氯化钾、0.144% 磷酸氢二钠和 0.024% 磷酸二氢钾, pH 6.8)洗 3 次,中间需不断吹打,防止细胞成团。最后将细胞重悬于 0.2mL PBS 溶液中,加入 PI 及 Hoechst 33342 至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,染色 15min 后在荧光显微镜下观察。

1.3.2 细胞总 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳:细胞总 DNA 的提取参照文献 [15],DNA 样品经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (W/V)溴化乙啶染色,并在紫外透射仪上观察、照相。

1.3.3 蛋白样品制备:收集红豆杉凋亡细胞及正常细胞,用 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,直接加液氮研磨至粉末状,分装于 1.5mL 的离心管中(每管 200mg),用 500 μL 裂解缓冲液(8mol/L 尿素,4% CHAPS,40mmol/L Tris)溶解细胞样品,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下充分溶解样品。13000 r/min 离心 20min,取上清 300 μL ,加入 3 倍体积的冷丙酮,-25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2h,然后以转速 13000 r/min 离心 20min,去上清,沉淀物用冷冻干燥机冻干。然后将样品溶于 200 μL 的 IPG 溶胀液中(8mol/L 尿素,2% CHAPS,0.5% IPG 缓冲液,痕量溴酚蓝,用前加 0.3% DTT),测定蛋白质含量后贮存于 -25 $^{\circ}\text{C}$ 备用 [16]。

1.3.4 IPG 干胶条的溶胀与等点聚焦:将含有约 1.0mg 蛋白的 300 μL 溶胀液加于干净的等电聚焦槽中,撕去 IPG 干胶条的保护膜,胶面朝下放于槽中;加 1mL 矿物油覆盖,加盖后于下列条件等点聚焦:30V,1h;500V,1h;1000V,1h;8000V,4h。

1.3.5 IEF 胶条的平衡:等点聚焦结束后,将胶条用双蒸水冲洗,在平衡缓冲液(50mmol/L Tris-Cl, pH 8.8,6mol/L 尿素,30% 甘油,2% SDS,痕量溴酚蓝,用前每 10mL 加 100mg DTT)中平衡 20 min。

1.3.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的配制:灌制浓度为 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,胶厚 1.5mm,面积 29cm \times 19cm。具体步骤及配方见分子克隆 [17]。

1.3.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:将平衡好的胶条置于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,用低熔点琼脂糖封胶。将玻璃板插入电泳槽中,在 80V 电压下进行电泳,溴酚蓝前沿走至凝胶边缘时停止电泳。

1.3.8 凝胶的染色及图像处理:凝胶经考马斯亮蓝

R250 染色后进行透射扫描(光学分辨率 300DPI),利用 ImageMaster 2-D Elite Version 3.1 图像分析软件进行图像处理,经点检测、背景消减、ID 校正、匹配等步骤比较蛋白点的差异。

2 实验结果

2.1 SA 作用后东北红豆杉悬浮培养细胞的形态学变化

在 50mL 的东北红豆杉悬浮培养体系中加入 SA 至终浓度 0.375mmol/L,染色结果如图 1 所示,在 24h 时约有 10% 的细胞核被 PI 染成红色,在 48h 时约有 20% 的细胞核被染成红色,而在对照组中仅有约 2% 的细胞被染成红色。结果表明,外加水杨酸改变了东北红豆杉细胞膜的通透性,部分细胞核被染成红色。另外,如图 2 所示,SA 可诱导部分细胞发生核碎裂,在 48h 时,约有 5% 的细胞核发生核碎裂,而在对照中未观察到有核碎裂发生。

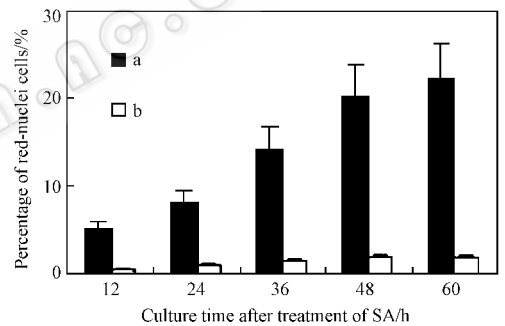


图 1 SA 处理后东北红豆杉悬浮培养体系中红核细胞所占比例

Fig.1 Percentages of red cells in the systems induced by SA (a) Treated with 0.375mmol/L SA ; (b) Control

2.2 SA 作用后东北红豆杉细胞总 DNA 电泳图

分别提取添加 SA48h 后的东北红豆杉悬浮培养细胞及对照的总 DNA,琼脂糖凝胶电泳后染色观察。结果如图 3 所示,添加 SA48h 后东北红豆杉细胞的染色体 DNA 发生降解,可看到模糊的 DNA 条带,而对照细胞生长良好,未发现有染色体 DNA 降解。结果表明,外源添加 SA 可诱导东北红豆杉悬浮培养细胞产生应激反应,并有类似细胞凋亡现象的发生。

2.3 二维凝胶电泳图谱分析

提取添加 SA 48h 后的东北红豆杉悬浮培养细胞的总蛋白并进行二维凝胶电泳,结果如图 4 所示,*T. cuspidata* 细胞中蛋白质的等电点和分子量分布较广,蛋白质主要集中在 40~80 kD 之间,等电点主

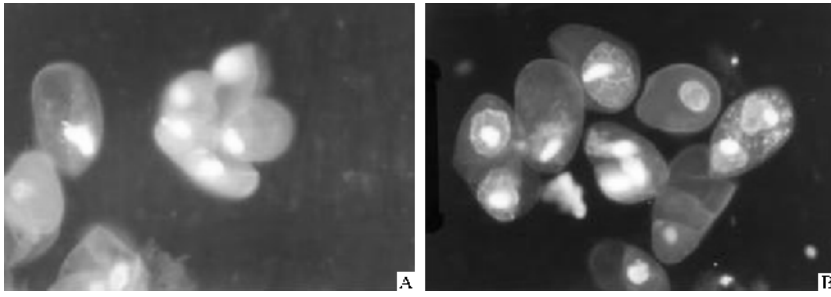


图 2 SA 处理后东北红豆杉悬浮培养体系中细胞核的变化

Fig.2 Morphological changes of nuclei of suspension cultures of *Taxus cuspidata*

(1) Control ;(2) Treated with 0.375mmol/L SA at 48 h



图 3 东北红豆杉细胞染色体 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of nuclear DNA from suspension cultures of *Taxus cuspidata*

1. DNA from control culture ; 2. Total DNA from the SA-treated culture at day 2 ; 3. Lambda DNA/*Hind* III Markers (23kb , 9.4kb , 6.6kb , 4.4kb , 2.3kb , 2.0kb , 0.6 kb)

要集中在 pH 4.0 ~ 8.0 之间 , 略偏酸性的蛋白较多 , 碱性蛋白较少。

利用 ImageMaster 2-D Elite (Version 3.1) 软件对图像进行分析 , 结果表明 , SA 处理的样品与对照组的二维凝胶电泳图谱基本相同 , 但也存在着少量的特异蛋白点。在 SA 处理的样品的二维凝胶电泳图谱中有 7 个特异蛋白点 , 同样有 6 个蛋白点仅存在于对照中 , 这些特异点可能与 SA 的作用有关。这些特异蛋白点的等电点、分子量及含量见 Table 1 , SA 处理后新生成的蛋白质点的放大图谱如图 5 所示。另外 , 还可检测到 SA 处理后部分蛋白点的表达量也发生改变 , 这些蛋白点也应与 SA 的作用有关。

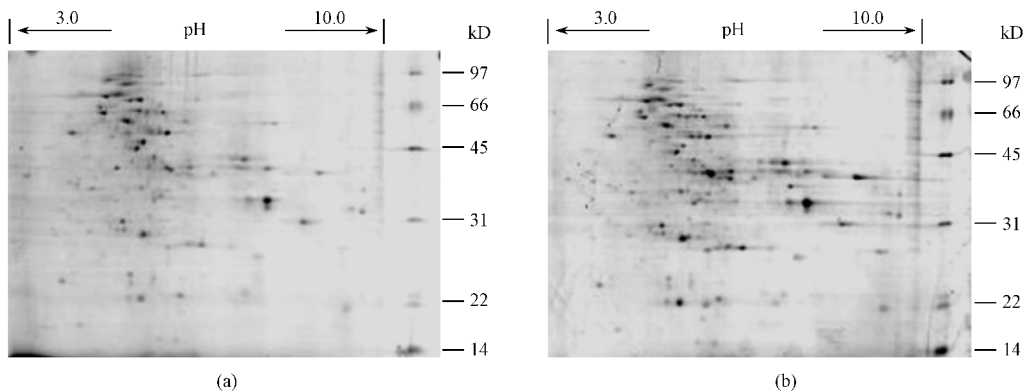


图 4 SA 作用下东北红豆杉悬浮培养细胞蛋白的二维凝胶电泳分析

Fig.4 Two-dimensional gel electrophoresis of the expressed proteins from suspension culture of *Taxus cuspidata* treated with SA

(a) From control culture ; (b) From the SA-treated culture

表 1 特异蛋白点的等电点与分子量

Table 1 Isoelectric point and molecular weight of special protein spots

From control culture				From the SA-treated culture			
Spot No.	Volume	pI	MW(kD)	Spot No.	Volume	pI	MW(kD)
33	400.4	5.5	63.4	10	3419.9	5.9	20.4
107	5155.0	4.7	74.3	11	878.7	5.9	18.4
191	611.8	4.9	51.5	23	1845.5	6.1	28.2
208	367.4	4.8	55.9	32	808.6	5.7	33.5
231	552.3	6.1	87.8	156	1642.7	5.5	60.0
265	293	5.1	60.8	197	3480.0	7.6	37.2
				221	550.1	4.8	46.4

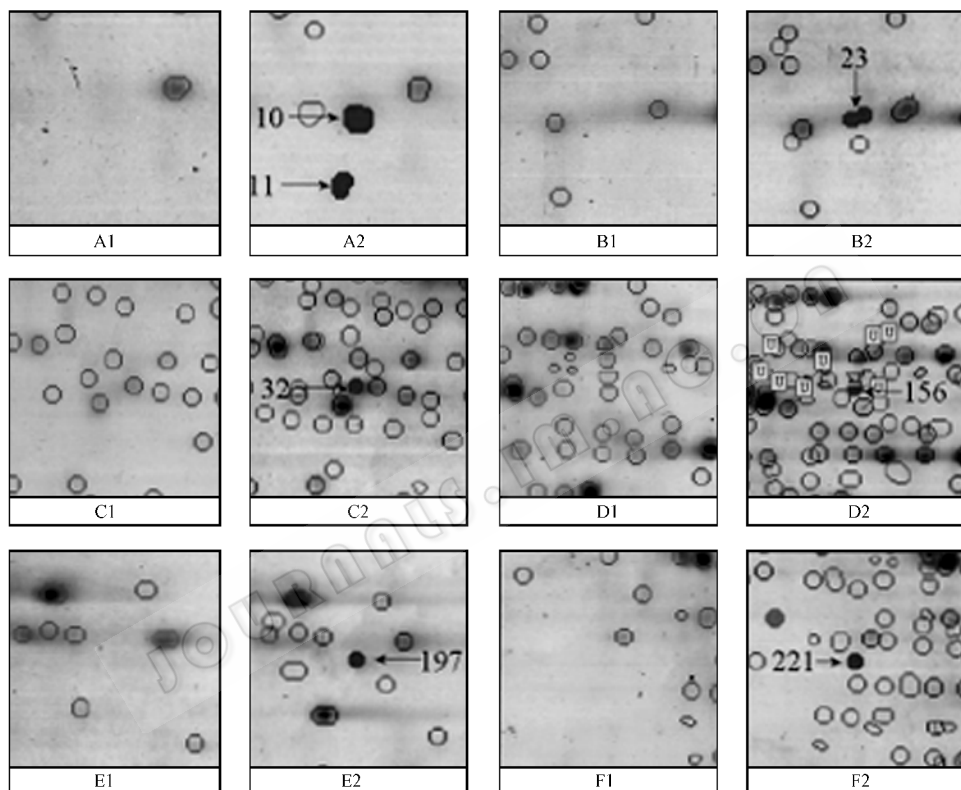


图 5 SA 处理后东北红豆杉细胞中蛋白表达特点

Fig. 5 Special protein spots from *Taxus cuspidata* treated with SA

A1 ~ F1. From the control culture at day 2 ; A2 ~ F2. From the SA-treated cells at day 2

3 讨论

水杨酸是植物细胞产生应激反应过程中非常重要的信号分子,外源 SA 处理可以诱导植物细胞发生相应的生理生化反应,保护植物细胞抵抗外界不良环境^[1,4]。本文研究了外加 SA 对于东北红豆杉悬浮培养细胞的影响,结果表明,外加 SA (0.375mmol/L)可以增加细胞膜的通透性,并可诱导部分细胞发生核碎裂。

利用二维凝胶电泳技术分析了水杨酸作用后东北红豆杉细胞中蛋白表达变化,结果表明,SA 对于细胞中蛋白的表达有很大影响。比较 SA 作用后东

北红豆杉细胞的二维凝胶电泳图谱与对照的区别,可以将蛋白点大概分为三类:1. 在 SA 作用体系中与对照中的表达量基本相同,此类蛋白应该与细胞的基础代谢有关,是维持细胞生命活动必不可少的蛋白,此类蛋白通常由管家基因负责编码;2. SA 处理后表达量下降或者是不再表达的蛋白,此类蛋白应与细胞的生长及分裂有关;3. SA 处理后表达量提高或者是新表达的蛋白,此类蛋白应该与细胞产生应激反应及细胞凋亡有关。

由于实验中使用了固相 pH 梯度胶条,采用高电压聚焦的方法,大大缩短了聚焦的时间,提高了二维凝胶电泳的稳定性及分辨率。如希望进一步提高

二维凝胶电泳的分辨率,可利用小范围固相 pH 梯度胶条进行等电聚焦,然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,染色后将各 pH 范围所得的图谱拼在一起,可得到一张完整的二维凝胶图谱。另外,利用建立的东北红豆杉蛋白二维凝胶电泳系统,可以分析细胞培养过程中蛋白的表达变化,比较紫杉醇合成过程中东北红豆杉细胞蛋白表达的变化,为确定紫杉醇合成酶系及紫杉醇的生物合成途径奠定基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Delaney T P, Uknes S, Vernooij B *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1994, **266**: 1247 - 1249
- [2] Rakin I, Skubatz H, Tang W *et al.* Salicylic acid levels in thermogenic and nonthermogenic plants. *Ann Bot*, 1990, **66**: 369 - 373
- [3] Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux J P. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol*, 1997, **35**: 235 - 270
- [4] Métraux J P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur J Plant Pathol*, 2001, **107**: 13 - 18
- [5] Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B *et al.* Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 1993, **261**: 754 - 756
- [6] Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T *et al.* Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol*, 1995, **29**: 959 - 968
- [7] Bi Y M, Kenton P, Mur L *et al.* H₂O₂ does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J*, 1995, **8**: 235 - 245
- [8] Mur L, Naylor G, Warner S A J *et al.* Salicylic acid potentiates de-

fense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J*, 1996, **9**: 559 - 571

- [9] Anderson L, Seihamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 533 - 537
- [10] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, **13**: 19 - 50
- [11] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, **250**: 4007 - 4021
- [12] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Meth*, 1982, **6**: 317 - 339
- [13] Görg A, Obermaier C, Boguth G *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21**: 1037 - 1053
- [14] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 1968, **50**, 151 - 158
- [15] Katsuhara M, Kawasaki T. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant Cell Physiol*, 1996, **37**: 169 - 173
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

2-Dimensional Gel Electrophoresis on Protein Patterns from Suspension Cultures of *Taxus cuspidata* Induced by SA

QIAO Jian-Jun ZHAO Hong GE Zhi-Qiang YUAN Ying-Jin* ZENG An-Ping

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract The permeability of cell membrane was enhanced by exogenous SA in the culture of *Taxus cuspidata*. Nuclei condense and fragments were observed in some cells by using fluorescent microscope, and the degraded chromosomal DNA was observed by using agarose gel electrophoresis. The changes in soluble proteins of the suspension cultures of *Taxus cuspidata* induced by salicylic acids were analyzed by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Comparing with the control, seven new protein spots were found and six protein spots were not found in the cultures grown with SA at 48h. The results obtained showed that SA could induce the expression of some special proteins that might be related with the action of SA in the suspension cultures of *Taxus cuspidata*.

Key words Salicylic acid, *Taxus cuspidata*, programmed cell death, 2-dimensional gel electrophoresis, proteome

Received: 08-07-2002

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 20028607).

* Corresponding author. Tel 86-22-27401149; Fax 86-22-27403888; E-mail yjyuan@public.tpt.tj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>