

烟草细胞凋亡过程中核酸酶活性研究

康洁, 李方远

(商丘师范学院生物系, 河南 商丘 476000)

摘要: 以烟草为材料, 以 2-甲基萘醌为诱导物, 研究了植物细胞凋亡过程中核酸酶活性, 结果表明: 2-甲基萘醌诱导的烟草原生质体使鸡血红细胞发生了典型的凋亡现象, 加入 Zn^{2+} 、EDTA、EGTA、AC-DEVD-CHO 的样品无“DNA ladder”出现; 加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 后, “DNA ladder”重新形成。2-甲基萘醌诱导的胞浆提取物和细胞核与只加细胞色素 C 诱导的胞浆提取物在电泳图上出现相同的蛋白条带, 分子量约 36KD。从而表明: 烟草细胞凋亡过程中有特异核酸酶被激活, 该核酸酶活性依赖于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 被 Zn^{2+} 、AC-DEVD-CHO 抑制, 该酶活性与 caspase 凋亡通路有关。

关键词: 2-甲基萘醌; 烟草原生质体胞浆提取物; 核酸酶; DNA 梯状条带

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2004)09-0003-04

Studies on the Activity of Nuclease during the Apoptosis of Tobacco Cell

KANG Jie, LI Fang-yuan

(Biology Department of Shangqiu Teachers College, Shangqiu 476000, China)

Abstract: The studies with tobacco as tested material and 2-dimethyl naphthaquinone as inducer showed that the tobacco protoplasm induced by 2-dimethyl naphthaquinone made the erythrocyte of chicken occur typical apoptosis. No “DNA ladder” appeared if Zn^{2+} , EDTA, EGTA, AC-DEVD-CHO were added in samples. “DNA ladder” reformed if Ca^{2+} , Mg^{2+} were added. The cytoplasm extract and karyon induced by 2-dimethyl naphthaquinone and cytoplasm extract induced by cytochrome C, showed the similar protein bands on the electrophoresis picture, with molecular weight of about 36KD. It is concluded that during the decline of tobacco cell, the nuclease is activated, and its activity depends on Ca^{2+} , Mg^{2+} and is restrained by Zn^{2+} , AC-DEVD-CHO. The enzyme exists in cytoplasm and karyon at the same time.

Key words: 2-Dimethyl naphthaquinone; Cytoplasm extract of tobacco protoplasm; Nuclease; DNA ladder

细胞凋亡 (cell apoptosis) 又称细胞编程性死亡 (programmed cell death), 是多细胞生物体自身基因调控的主动死亡方式, 它对维持体内器官、组织及细胞数量的相对平衡与内环境的稳定起着决定性作用^[1], 在植物的发育、分化和抵抗环境胁迫中也起着重要作用。动物细胞凋亡的机制已研究很清楚, 其基本程序包括 caspase 的活化和死亡

底物 (death substrate) 的降解及染色质 DNA 在核小体间的切割^[2]。植物细胞凋亡机理还不很清楚, 近几年的研究发现, 植物细胞中存在着类似于动物细胞的凋亡过程^[3], 并发现有 caspase 类似蛋白^[4], 但与凋亡有关的对核小体有切割活性的核酸酶的研究很少有报道。笔者以烟草为试验材料, 以 2-甲基萘醌为诱导物, 研究烟草原生质体

收稿日期: 2004-03-17

作者简介: 康洁 (1967-), 女, 河南民权人, 讲师, 主要从事分子细胞生物学和分子免疫学的教学与研究工作。

凋亡过程中核酸酶的活性。试验表明,烟草细胞中存在一种分子量约为 36KD 的与凋亡相关的核酸酶,它具有核小体间切割活性,且其活性依赖 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,并能被 Zn^{2+} 和 AC-DEVD-CHO 抑制, AC-DEVD-CHO 是 caspase 特异抑制剂,说明此酶与 caspase 有一定的联系。

1 材料与方法

1.1 烟草细胞原生质体的制备及凋亡诱导

按常规方法制备烟草悬浮细胞。取悬浮培养的细胞 2 g (鲜重) 加到 10 ml 的酶液中,于 50 r/min, 25 °C 酶解 4 h (暗处) 后用 200 目尼龙网过滤,再取悬浮细胞 120 g, 50 r/min 离心 5 min, 收集原生质体。分别用 2-甲基萘醌和细胞色素 C 诱导原生质体凋亡,终浓度分别为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$, 22 °C 温育 4 h。取经 2-甲基萘醌诱导的原生质体适量于不同试管,分别加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、EDTA、EGTA、 AC-DEVD-CHO 至终浓度为 5 mmol/L, 5 mmol/L, 3 mmol/L, 5 mmol/L, 5 mmol/L, 100 $\mu\text{mol/L}$, 于 22 °C 温育 4 h 取样。对照组为不加诱导剂的正常原生质体。

1.2 烟草胞浆提取物和细胞核的制备

制备胞浆提取物:诱导的原生质体和正常原生质体分别匀浆后,在 4 °C 下 50 r/min 离心 2 h, 收集可溶性胞浆。制备细胞核:取诱导的原生质体 120 g 50 r/min 离心 5 min, 保留沉淀,加入预

冷至 4 °C, 含 Triton X-100 (0.02%, v/v) 的核分离缓冲液 (10 mmol/L MES, 0.2 mmol/L 蔗糖, 2.5 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L DTT, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L 精胺, pH 5.2), 置研钵中轻研 15 min, 400 目尼龙网过滤, 取 500 g 离心 5 min (50 r/min), 沉淀为细胞核。

1.3 核酸酶活性的检测

分别在 30 μl 经 2-甲基萘醌诱导后制取的各种胞浆提取物中加入 10^5 个鸡血红细胞核, 22 °C 温育 2 h, 提取核酸并电泳。对照组是正常胞浆提取物加鸡血红细胞。

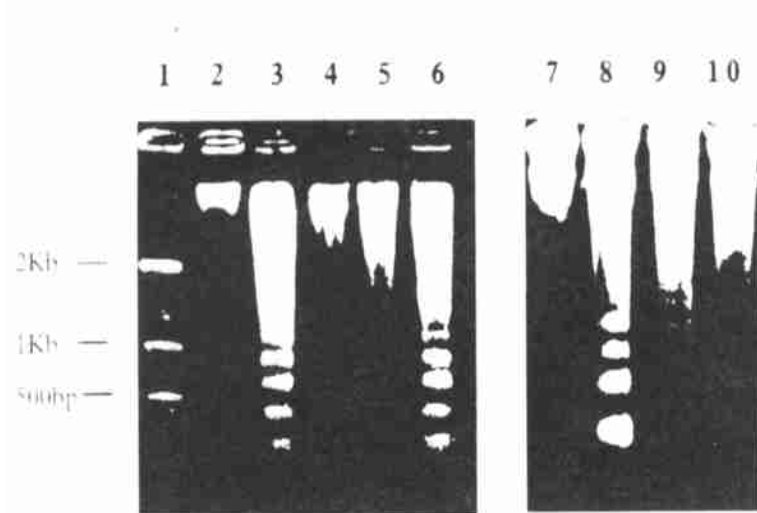
1.4 核酸酶在核小体间切割活性的检测

在 30 μl 正常胞浆提取物中加入 10^5 个不含内源性核酸酶的鸡血红细胞, 再加入细胞色素 C 至 100 $\mu\text{mol/L}$, 22 °C 温育 2 h, 加中止液, 提取核酸并电泳。设立阴性对照 (不加诱导剂的原生质体和胞浆提取物)。

2 结果与分析

2.1 烟草细胞原生质体的诱导结果

核酸电泳的结果显示 (图 1), 用 2-甲基萘醌诱导的烟草原生质体胞浆提取物能使鸡血红细胞 DNA 形成 “DNA ladder” (图 1-3)。表明烟草细胞中存在与凋亡相关的核酸酶。诱导的酶活性依赖于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 并被 Zn^{2+} 和 AC-DEVD-CHO 抑制 (图 1-4~10)。正常胞浆提取物不能



1. 100bp 间隔的分子量 Marker; 2. 未加诱导的对照; 3. 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-甲基萘醌诱导 4 h 后 DNA 降解形成 “DNA ladder”; 4. 5 mmol/L Zn^{2+} 可完全抑制 “DNA ladder” 的形成; 5. 5 mmol/L EDTA 可完全抑制 “DNA ladder” 的形成; 6. 加入 5 mmol/L EGTA 的同时加入 5 mmol/L Ca^{2+} 可以重新形成 “DNA ladder”; 7. 5 mmol/L EDTA 可完全抑制 “DNA ladder” 的形成; 8. 加入 5 mmol/L EDTA 的同时加入 5 mmol/L Ca^{2+} 和 5 mmol/L Mg^{2+} 可以重新形成 “DNA ladder”; 9. 加入 5 mmol/L EDTA 的同时加入 5 mmol/L Ca^{2+} , “DNA ladder” 形成可部分恢复; 10. 100 $\mu\text{mol/L}$ AC-DEVD-CHO 可完全抑制 “DNA ladder” 形成

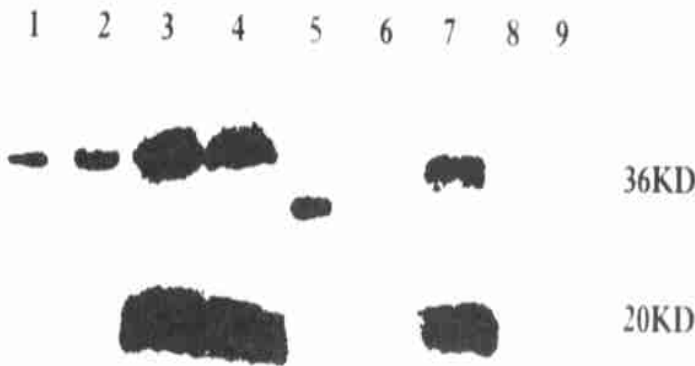
图 1 核酸电泳显示 DNA 的特异降解及不同离子和抑制剂对 “DNA ladder” 的影响

使鸡血红细胞 DNA 降解(图 1—2)。

2.2 核酸酶分子量的检测结果

经 SDS—PAGE 电泳显示(图 2), 在不经诱导的正常原生质体和胞浆提取物中无核酸酶活性条带, 经 2—甲基萘醌诱导 4 h 的胞浆提取物中显

示出清晰的条带, 此条带与只用细胞色素 C 诱导的烟草胞浆提取物中的相似, 该核酸酶分子量大约 36KD。经 2—甲基萘醌诱导的原生质体和细胞核也出现了此条带, 表明该核酸酶不仅存在于细胞质中而且也存在于细胞核中。



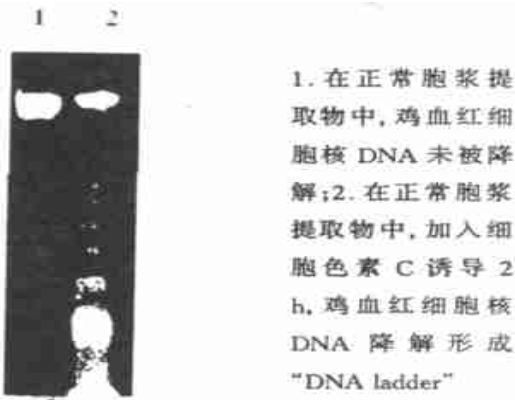
1. 2 μ mol/L 细胞色素 C 诱导的烟草胞浆提取物; 2. 100 μ mol/L 2—甲基萘醌诱导 4 h 后提取的烟草胞浆提取物; 3 4. 100 μ mol/L 2—甲基萘醌诱导 4 h 后的烟草原生质体; 5. DNaseI 对照; 6. 100 μ mol/L AC—DEVD—CHO 可完全抑制细胞色素 C 诱导的烟草胞浆提取物中的 DNase 活性; 7. 100 μ mol/L 2—甲基萘醌诱导 4 h 后提取的烟草细胞核; 8. 未加诱导剂的对照原生质体; 9. 未加诱导剂的对照胞浆提取物

图 2 凋亡核酸酶分子量检测

2.3 核酸酶在核小体间切割活性的检测结果

正常胞浆提取物中加入不含内源性核酸酶的鸡血红细胞核, 然后加入细胞色素 C 进行诱导。试验结果表明(图 3), 红细胞核 DNA 出现梯状断裂, 而在不加诱导剂的胞浆提取物中, 红细胞核 DNA 未被降解。这说明诱导的 36KD 核酸酶具有核小体间切割活性, 也进一步证明它是凋亡特异的。

间特异降解形成电泳可见的呈间隔 180 ~ 200bp 片段的阶梯状分布(DNA ladder)条带^[5]。文献曾报道与凋亡有关的核酸酶有 DNase I、DNase II、NNE18 等^[6]。在本试验中, 发现烟草细胞的细胞质中有与凋亡相关的核酸酶, 这种核酸酶的活性可以在 2—甲基萘醌诱导的原生质体和胞浆提取物中以及细胞色素 C 诱导的胞浆提取物中被检测到, 而且该核酸酶可以在核小体间特异切割 DNA 形成电泳所见的“DNA ladder”。细胞色素 C 是线粒体内膜上与氧化呼吸有关的重要蛋白, 在动物细胞凋亡中它从线粒体释放到细胞质中激活 caspase。近年来的研究证明细胞色素 C 也参与植物细胞的凋亡过程^[7]。试验中我们将用细胞色素 C 诱导的烟草细胞胞浆提取物, 与用 2—甲基萘醌诱导的烟草细胞一起做电泳, 检测出与凋亡有关的核酸酶, 该酶同时存在于细胞质和细胞核中, 其酶活性依赖于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 并被 Zn^{2+} 抑制, 还可以被 caspase—3 的特异抑制剂 AC—DEVD—CHO 所抑制, 说明该酶参与了 caspase 细胞凋亡通路。在动物细胞中, caspase—3 在凋亡过程起着重要作用, 可以特异的切割其底物或自身切割, 启动死亡事件发生。国外有文献报道,



1. 在正常胞浆提取物中, 鸡血红细胞核 DNA 未被降解; 2. 在正常胞浆提取物中, 加入细胞色素 C 诱导 2 h, 鸡血红细胞核 DNA 降解形成“DNA ladder”

图 3 核酸酶在核小体间切割活性检测

3 讨论

细胞凋亡的一个重要特征是染色质在核小体

优质强筋小麦新品种郑农 16 号的特征特性及栽培技术

马巧云¹, 廖祥政², 栗进朝¹, 雷体文¹

(1 郑州市农林科学研究所, 河南 郑州 450005; 2 贵州大学农学院)

中图分类号: S512.1 文献标识码: B 文章编号: 1004—3268(2004)09—0006—02

郑农 16 号是郑州市农林科学研究所选育而成的集高产、优质、抗病、广适于一体的优质强筋小麦新品种, 2003 年通过河南省农作物品种审定委员会审定。

1 特征特性

郑农 16 号属弱春性, 但耐寒性较强。分蘖力强, 成穗率高, 芽鞘黄绿色, 幼苗半直立、色绿。起身拔节早, 拔节期叶半披, 茎叶无蜡质、深绿色, 旗叶角度中等, 叶面有绒毛。抽穗早、花药黄色。株高 80 cm 左右, 穗纺锤形、长芒, 护颖黄白色、无绒毛、椭圆形, 颖肩为斜肩, 颖嘴呈鸟嘴状, 脊背明显。产量三要素比较协调, 自身调节能力强。穗粒数 30 粒左右, 粒长椭圆形、白色、角质、千粒重

45 ~ 50 g。黑胚少, 外观商品品质好。

2 产量水平

郑农 16 号产量一般每公顷 7 500 kg 左右。2000 ~ 2001 年本所产量比较, 平均 7 647.45 kg/hm², 比对照豫麦 18 号增产 4.89%; 2001 ~ 2002 年国家黄淮南片区试平均 6 779.7 kg/hm², 比对照豫麦 18 号增产 3.22%, 省区试平均 6 871.5 kg/hm², 比对照豫麦 18 号增产 2.02%; 2002 ~ 2003 年国家黄淮南片区试, 郑农 16 号平均 6 387.75 kg/hm², 比对照豫麦 18 号减产 2.5%, 省区试平均 6 967.5 kg/hm², 比对照豫麦 18 号增产 0.96%。以上试验结果表明, 郑农 16 号的丰产性和稳产性稍优于生产上应用已久、

收稿日期: 2004—02—26
作者简介: 马巧云(1970—), 女, 河南巩义人, 助理研究员, 主要从事小麦育种工作。

在植物细胞中有 caspase 类似蛋白的存在^[9], 我们的试验进一步证实了植物细胞凋亡中有 caspase 存在, 本试验结果还为进一步研究植物细胞凋亡机理和研究与植物细胞凋亡有关的发育分化问题提供重要的参考。

参考文献:

[1] Greenberg J T, Guo A. Programmed cell death in plants: A pathogen—triggered response activated coordinately with multiple defense function [J]. Cell, 1994, 77: 551—563.

[2] Nataga S. Apoptosis by death factor [J]. Cell, 1997, 88: 355—365.

[3] Groover A, Heidel D A. Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro [J]. Proto-

plasma, 1997, 196: 197—211.

[4] Demura T and Fukuda H. Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally and spatially during vascular system development [J]. Plant Cell, 1994, 6: 967—981.

[5] Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation [J]. Nature, 1980, 284: 555—559.

[6] Zhang C H, Roberson A. A triplet of nuclease proteins (NP⁴²⁻⁵⁰) is activated in human Jurkat cells undergoing apoptosis [J]. Cellular Immunol, 1995, 165: 161—167.

[7] Sun Y L, Zhao Y. Cytochrome c release and caspase activation in menadione-induced apoptosis in plants [J]. FAEBs lett, 1999, 462: 317—321.