

用伊文思蓝染色法检测植物整体叶片的细胞活性

刘楠, 林植芳*

中国科学院华南植物园, 中国科学院退化生态系统植被恢复与管理重点实验室, 广州510650

摘要: 本文利用伊文思蓝(evans blue)作为细胞活性染料, 检测了胁迫处理后3种草本和2种灌木植物叶片的细胞活性。结果显示, 不同类型的胁迫(温度、PEG、Pb、Cd、NaCl和NaHSO₃)均造成了叶片细胞一定程度的伤害。随着各种胁迫的加剧, 叶片染色面积和染色后提取液吸光度都呈现梯度增加的趋势。研究分别利用染色面积和其提取液吸光度表达叶片细胞的活性, 提出了一种更安全、更准确的植物整体叶片细胞活性检测方法。

关键词: 伊文思蓝; 拟南芥; 细胞活性; 整体叶片检测

Use of Evans Blue for Testing Cell Viability of Intact Leaves of Plant

LIU Nan, LIN Zhi-Fang*

Key Laboratory of Vegetation Restoration and Management of Degraded Ecosystems, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstract: The current study tested stress induced cell viability of intact leaves of three grass species and two shrub species by evans blue method. The results showed that different types of stresses (temperature, PEG, Pb, Cd, NaCl and NaHSO₃) caused leaf cell damages to different degrees. Along with the exaggeration of different stress treatments, the dyed area in leaves and the extract solution absorbance from dyed leaves were increased in gradient. This study compared two different methods in calculating leaf cell viability by leaf dyed area and extract solution absorbance from dyed leaves, respectively. It also proposed a safer and more accurate method for testing cell viability of intact leaf of plant.

Key words: evans blue; *Arabidopsis thaliana*; cell viability; intact leaf test

植物在高温、低温、干旱、盐渍、重金属、大气污染物等逆境条件下都会受到不同程度的伤害(Lin等2009), 伤害的程度因逆境条件和植物自身抗性而产生差异。逆境会导致植物光合速率下降, 组织缺水并引起气孔关闭, 叶绿体受损, 相关的酶失活或变性, 严重时会造成细胞和组织的死亡(潘瑞焱2004)。因此, 植物细胞活性的检测, 是判定植物受伤害程度和检验其抗逆性的直接和有效的方法。

通常情况下, 具有生长和繁殖能力的细胞被认为具有细胞活性。对细胞活性的鉴定方法有些建立在活细胞的物理或化学性质上, 如鉴定细胞膜完整性或细胞质膜流动性(Lin等2011)。有些则建立在对细胞代谢活性的检测上, 例如计算四唑盐的还原或荧光底物的水解。其中鉴定植物细胞膜完整性的方法大致分为5种, 分别利用伊文思蓝(evans blue)、亚甲基蓝(methylene blue)、锥虫蓝(trypsin blue)、中性红(neutral red)和酚藏红花(phenosafranin)对细胞进行染色(Castro-Concha等

2008)。这些染色剂可渗入破裂的细胞膜并与死细胞物质结合显色, 随后利用显微镜观察或分光光度法计算细胞相对活性。

其中, 伊文思蓝染色法已被广泛应用于鉴定动物细胞活性。其原理在于伊文思蓝能够与蛋白结合形成伊文思蓝蛋白复合物。正常细胞膜不能透过伊文思蓝, 当细胞受到损伤后, 伊文思蓝进入细胞并与蛋白结合, 使其染成蓝色(Ibla和Khoury 2006; Castro-Concha等2008)。在对植物材料的研究中, 前人的工作大多是在细胞和离体组织水平, 用于为组织培养过程中植物细胞活力程度的判定提供依据, 缺乏更大尺度上的植物组织活性鉴定。本文以几种草本及灌木植物叶片为研究对象, 利用不同类型的胁迫处理植物叶片, 从整体叶片

收稿 2011-03-16 修定 2011-04-20

资助 教育部留学回国人员科研启动基金、广东省科技计划项目(2010B060200039)和广州市科技亚运专项行动计划项目(2010U1-E00601)。

* 通讯作者(E-mail: linzhif@scbg.ac.cn; Tel: 020-37252995)。

的角度研究伊文思蓝在植物细胞活性鉴定方面的作用, 改进并提出一种简便、廉价和安全的植物全叶片细胞活性的检测方法。

材料与方法

1 植物材料

选取3种草本植物和2种灌木植物叶片作为研究对象, 避免了乔木叶片革质化和粗叶脉对染色效果的影响。其中草本植物有大戟科的飞扬草(*Euphorbia hirta* L.), 十字花科的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和景天科的落地生根(*Bryophyllum pinatum* L. f. oken)。灌木植物有木犀科的山指甲(*Ligustrum sinense* Lour.)和大戟科的红背桂(*Excoecaria cochinchinensis* Lour.)。飞扬草、拟南芥和落地生根为室内盆栽苗, 其中拟南芥为2周龄, 飞扬草和落地生根为当年生; 其余两种灌木为室外的绿篱植物。以5种植物的成熟新生叶作为研究对象, 进行各项离体胁迫处理和染色观察。

2 胁迫处理

化学胁迫: 将10片离体的完整叶片分别浸泡在盛有 PbAC_2 (0、50、100、150、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 CdCl_2 (0、50、100、150、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 NaCl (0、1%、2%、3%)和 NaHSO_3 (0、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液的培养皿中24 h。

物理胁迫: 将10片离体的完整叶片分别浸泡在盛有纯净水的培养皿中进行热处理(40 $^{\circ}\text{C}$: 0、30、60、90 min)、冷处理(-10 $^{\circ}\text{C}$: 0、5、20、28 h)和PEG处理(0、5%、10%、15%) 24 h。

3 染色及观察

处理后的叶片取出并用纯净水清洗、抹干。将叶片浸泡在0.25% (W/V)的伊文思蓝溶液中24 h (Baker和Mock 1994)。随后取出叶片, 用纯净水清洗表面的蓝色染液, 吸去叶面水分后放入煮沸的无水乙醇:甘油(9:1)中30 min, 除去叶绿素至叶片底色显白色为止。将脱掉叶绿素而呈现有明显蓝色斑的叶片平展, 用数码相机拍照, 随后每份各取2片叶剪碎, 放入4 mL的1% SDS的水溶液中萃取伊文思蓝3 d。以沸水煮15~20 min杀死细胞后被伊文思蓝全部染上蓝色的叶片作对照, 提取液在600 nm下测定吸光度。

4 数据分析

用以下2种方法计算细胞相对活性:

1)利用Image-J软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)计算叶片非染色区域面积(A)与全叶片面积(A_t)。将二者的比值作为细胞相对活性(V)。即: $V=A/A_t\times 100\%$ 。

2)建立计算公式 $V=[1-(a/ad)]\times 100\%$, 计算细胞相对活性(V), 其中 a 为胁迫处理后的叶片染色提取液吸光度, ad 为沸水煮死的叶片染色提取液吸光度。

实验结果

1 不同胁迫处理后拟南芥叶片染色情况

图1是拟南芥叶片在不同胁迫条件下的伊文思蓝染色情况。从图片中可以看到, 叶片经不同胁迫条件处理后, 蓝色染色区域随着处理梯度增加而增大。但由于胁迫条件不同, 处理后叶片染色情况也各有差异。不同浓度的 PbAC_2 处理后, 拟南芥叶片染色面积普遍较小, 最高不超过叶片总面积的20%。同为重金属离子, Cd 对叶片的伤害比 Pb 大, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 处理后, 叶片超过80%的面积均被染成蓝色, 失去了细胞活性。研究发现, 拟南芥叶片对盐离子的胁迫相当敏感, 1%浓度的 NaCl 处理即可导致57%的叶面积被伊文思蓝染色, 浓度升高后, 染色面积持续增大, 染色深度也有一定程度的增加。我们还发现, 重度 NaCl 胁迫可造成叶片萎焉变软以至于部分溃烂, 推测细胞壁骨架和膜结构受到严重的伤害。空气 SO_2 污染物进入植物细胞后, 以 HSO_3^- 形式存在并对细胞的结构和生理功能造成伤害(Liu等2009)。本文对拟南芥的研究结果显示, 经200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHSO_3 处理后仍有近73%的细胞存活, 当浓度达到300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 高浓度的 HSO_3^- 使整个叶片大部分细胞丧失活力。此外, 不同程度的物理胁迫(高温、低温和PEG)也能导致叶片细胞死亡并染色, 但叶片的受害程度和染色面积普遍低于化学胁迫。

2 不同胁迫处理对几种植物细胞相对活性的影响

将染色后的拟南芥叶片剪碎并用SDS水溶液萃取后, 溶液的吸光度和相对活性的计算结果列于表1。与拍照后的结果相似, 叶片染色程度(吸光度)随胁迫加重而增加。增加的幅度与叶片染色照片结果基本一致, 仍以3%的 NaCl 溶液和300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHSO_3 溶液最有伤害性。此外, 作为辅助研究结果, 几种常见的草本和灌木植物叶片受不同胁

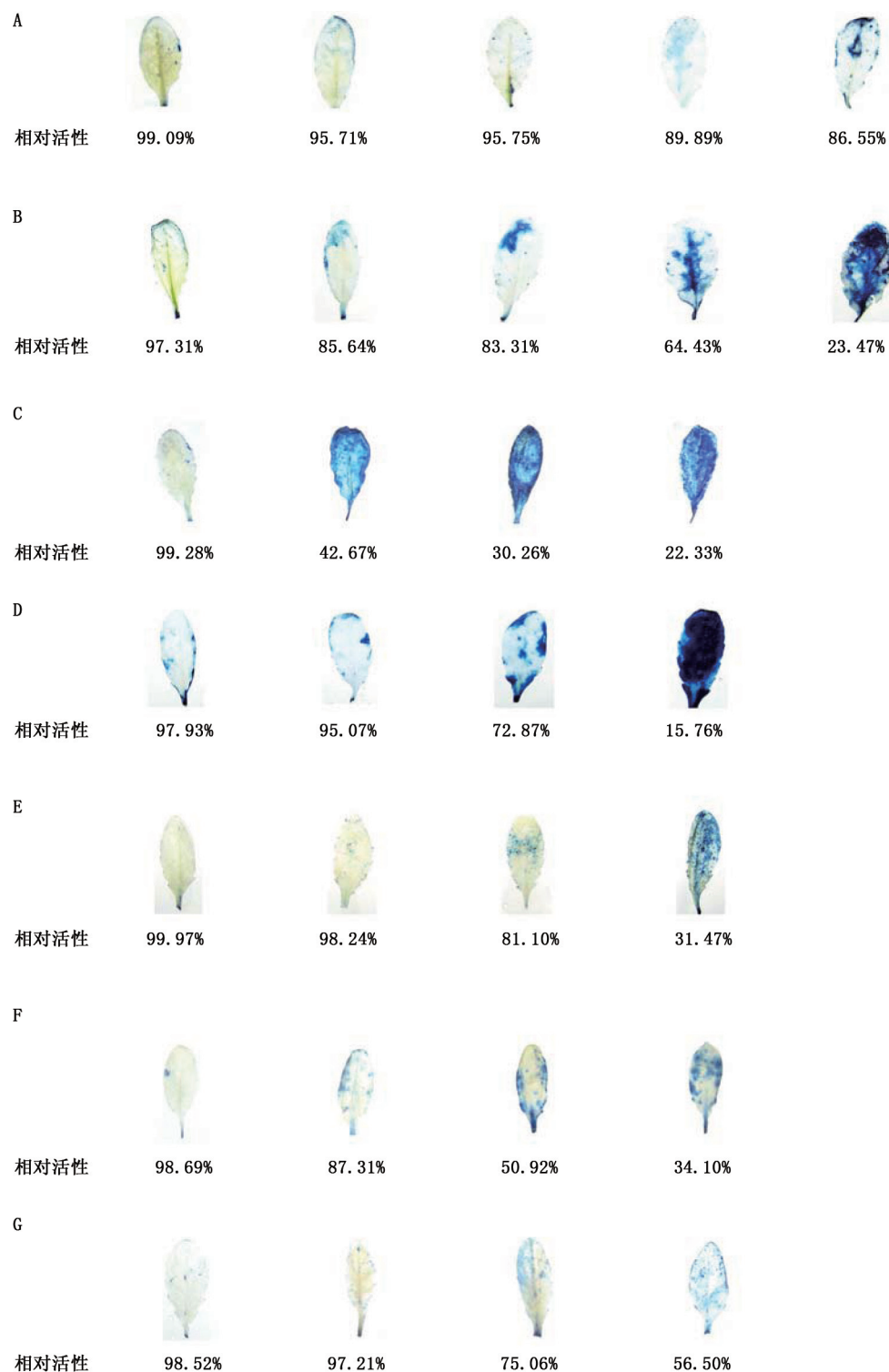


图1 不同胁迫处理下拟南芥叶片的伊文思蓝染色照片及细胞活性

Fig.1 Evans blue dyeing pictures and cell viability in leaves of *Arabidopsis thaliana* under different stresses

A: PbAc_2 (0、50、100、150、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: CdCl_2 (0、50、100、150、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); C: NaCl (0、1%、2%、3%); D: NaHSO_3 (0、100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); E: 热胁迫(40 $^{\circ}\text{C}$: 0、30、60、90 min); F: 冷胁迫(-10 $^{\circ}\text{C}$: 0、5、20、28 h); G: PEG胁迫(0、5%、10%、15%)。图片从左到右对应胁迫处理方式依次递增。

表1 不同胁迫处理下拟南芥叶片经伊文思蓝染色后萃取液吸光度及细胞相对活性

Table 1 Extract solution absorbance from dyed leaves of *Arabidopsis thaliana* and their cell viability under different stresses

胁迫类型	处理	吸光度(相对活性/%)	胁迫类型	处理	吸光度(相对活性/%)
重金属胁迫	PbAC ₂ (0 μmol·L ⁻¹)	0.051±0.007 (97.01)	盐胁迫	NaCl (0)	0.027±0.004 (98.42)
	PbAC ₂ (50 μmol·L ⁻¹)	0.048±0.002 (97.19)		NaCl (1%)	0.339±0.009 (80.12)
	PbAC ₂ (100 μmol·L ⁻¹)	0.083±0.001 (95.13)		NaCl (2%)	0.578±0.097 (66.10)
	PbAC ₂ (150 μmol·L ⁻¹)	0.091±0.001 (94.66)		NaCl (3%)	0.884±0.207 (48.16)
	PbAC ₂ (200 μmol·L ⁻¹)	0.164±0.016 (90.39)		HSO ₃ 胁迫	NaHSO ₃ (0 μmol·L ⁻¹)
重金属胁迫	CdCl ₂ (0 μmol·L ⁻¹)	0.051±0.007 (97.01)	NaHSO ₃ (100 μmol·L ⁻¹)		0.197±0.079 (88.45)
	CdCl ₂ (50 μmol·L ⁻¹)	0.089±0.025 (94.78)	NaHSO ₃ (200 μmol·L ⁻¹)		0.541±0.099 (68.27)
	CdCl ₂ (100 μmol·L ⁻¹)	0.180±0.025 (89.44)	NaHSO ₃ (300 μmol·L ⁻¹)		1.128±0.095 (33.84)
	CdCl ₂ (150 μmol·L ⁻¹)	0.331±0.033 (80.46)	冷胁迫	-10 °C (0)	0.070±0.010 (95.89)
	CdCl ₂ (200 μmol·L ⁻¹)	0.506±0.010 (70.33)		-10 °C (5 h)	0.112±0.006 (93.39)
热胁迫	40 °C (0 min)	0.029±0.004 (98.25)		-10 °C (20 h)	0.305±0.010 (82.11)
	40 °C (30 min)	0.079±0.001 (95.22)	-10 °C (28 h)	0.616±0.011 (63.87)	
	40 °C (60 min)	0.130±0.016 (92.12)	渗透胁迫	PEG (0)	0.096±0.005 (94.36)
	40 °C (90 min)	0.196±0.004 (88.12)		PEG (5%)	0.110±0.010 (93.58)
	100 °C (15~20 min)	1.705±0.158 (0)		PEG (10%)	0.283±0.026 (83.40)
		PEG (15%)		0.359±0.015 (78.96)	

迫处理后提取的伊文思蓝染色液的吸光度及细胞相对活性列于表2。由表2可以看出, 提高CdCl₂和NaCl的浓度均明显降低飞扬草的细胞存活率, 山指甲经NaHSO₃处理, 其细胞存活率也出现浓度的剂量效应。40 °C热水处理红背桂和落地生根叶片超过60 min, 引起细胞相对活性显著下降, 尤以落地生根对热水的敏感性更高。

3 不同胁迫处理下处理浓度与叶片细胞相对活性的相关性

分别将染色面积法和吸光度法计算的叶片细胞相对活性与不同胁迫处理浓度进行相关性分析,

并将结果列于表3。从相关系数来看, 处理浓度与细胞相对活性呈明显的负相关性, 所有的 r 值均高于0.9。且除PbAC₂、低温和PEG处理外, 吸光度法测定的细胞相对活性与胁迫处理浓度的相关系数的绝对值均大于染色面积测定法。结果表明, 利用吸光度法判定胁迫对细胞活性的影响较染色面积法更为优越。

讨 论

对于不同草本和灌木植物叶片而言, 纯净水浸泡过的叶片染色面积小于3%, 吸光度均小于

表2 不同胁迫处理下几种植物经伊文思蓝染色后萃取液吸光度及细胞相对活性

Table 2 Extract solution absorbance from dyed leaves of several species and their cell viability under different stresses

胁迫类型(植物种名)	处理	吸光度(相对活性/%)	胁迫类型(植物种名)	处理	吸光度(相对活性/%)
重金属胁迫 (飞扬草)	CdCl ₂ (0 μmol·L ⁻¹)	0.018±0.001 (98.31)	热胁迫 (红背桂)	NaHSO ₃ (200 μmol·L ⁻¹)	0.310±0.010 (55.66)
	CdCl ₂ (100 μmol·L ⁻¹)	0.165±0.005 (84.49)		NaHSO ₃ (300 μmol·L ⁻¹)	0.382±0.004 (45.50)
	CdCl ₂ (150 μmol·L ⁻¹)	0.351±0.001 (67.02)		死叶片	0.699±0.004 (0)
	CdCl ₂ (200 μmol·L ⁻¹)	0.533±0.007 (49.91)		40 °C (0 min)	0.022±0.005 (95.65)
	死叶片	1.604±0.028 (0)		40 °C (30 min)	0.063±0.007 (87.53)
盐胁迫 (飞扬草)	NaCl (0)	0.018±0.001 (98.66)	40 °C (60 min)	0.117±0.011 (76.83)	
	NaCl (2%)	0.112±0.005 (91.67)	40 °C (90 min)	0.311±0.014 (38.42)	
	NaCl (4%)	0.144±0.009 (91.67)	100 °C (15~20 min)	0.505±0.014 (0)	
	NaCl (6%)	0.268±0.013 (80.05)	热胁迫 (落地生根)	40 °C (0 min)	0.033±0.001 (93.72)
	死叶片	1.343±0.031 (0)		40 °C (60 min)	0.176±0.007 (66.89)
HSO ₃ 胁迫 (山指甲)	NaHSO ₃ (0 μmol·L ⁻¹)	0.069±0.014 (90.13)		40 °C (90 min)	0.396±0.019 (25.52)
	NaHSO ₃ (100 μmol·L ⁻¹)	0.240±0.030 (65.67)	100 °C (15~20 min)	0.532±0.045 (0)	

表3 不同胁迫处理下处理浓度/时间与叶片细胞相对活性的相关系数(r)

Table 3 The correlated coefficient (r) of concentration/time of different stress factors and leaf cell viability

胁迫因子	染色面积 r 值	吸光度 r 值
PbAC ₂	-0.965*	-0.908*
CdCl ₂	-0.921*	-0.971*
NaCl	-0.903	-0.999*
NaHSO ₃	-0.910	-0.955*
热处理	-0.899	-0.998*
冷处理	-0.999*	-0.958*
PEG	-0.956*	-0.956*

*相关性显著($P < 0.05$)。

0.10。作为对照材料,正常叶片具有很低的伊文思蓝染色水平,受到胁迫后,不同类型植物的全叶片染色水平均逐步上升,显示了较好的重复性。

染色后的叶片可采取拍照和萃取后测吸光度的方法判定相对活性。两种方法显示了一致性,其中染色叶片拍照法更直观并适合于定性描述,而萃取染色叶片测吸光度的方法更适于定量描述。本研究中,相对于萃取方法,叶片拍照法存在着一定的缺陷。例如,叶片染色后,对染色区域面积的计算需要把彩色照片处理成为灰度照片,再计算灰度部分的面积。然而在灰度照片中,染色深度的不同的区域则很难在面积上进行区别,这导致了两种方法在计算细胞相对活性上存在着较大的差别,染色面积计算得出的叶片相对活性低于提取液吸光度法的结果,其与处理浓度之间的相关性较萃取液的吸光度者低。以图1和表1中同为3%的NaCl和300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaHSO₃处理为例,染色面积法对叶片活性的指示作用较差(图1),但萃取液的吸光度就能很好的定量描述细胞活性(表1)。

本文利用伊文思蓝染色可以很好地描述植物细胞受到伤害的程度和细胞活性。然而在以往的研究中,由于侧重点不同,人们更多的关注细胞和组织水平的活性测定,对整个叶片的活力缺乏整体的描述。此外,从有关的伊文思蓝染色法测定细胞活性的文献中(Baker和Mock 1994; Romero-Puertas等2004),发现大多数研究均以含有甲醇-

SDS溶液提取染色后的植物组织。这种方法不仅具有潜在不安全性,而且脱色不完全,容易造成吸光度结果不准确,不能完全反应细胞活性。我们的方法对此进行了改进,利用SDS的水溶液进行萃取,不仅脱色干净,而且提供了一种无毒、安全的试验方法。值得指出的是,该研究手段具有一定的局限性,以完整叶作此类试验只适用于具有较小面积的叶片。对于大、厚和革质化的叶片,建议将叶片打孔成叶圆片后,再用伊文思蓝染色的方式测定细胞活性。我们之前曾经对海芋(*Alocasia macrorrhiza*)叶圆片进行过重金属处理,并利用伊文思蓝染色法测定叶圆片细胞活性,发现Pb的毒性小于Cd (Liu等2010),这一结果与本文全叶片处理的检测结果相吻合。

参考文献

- 潘瑞焱(2004). 植物生理学. 北京: 高等教育出版社
- Baker CJ, Mock NM (1994). An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 39: 7-12
- Castro-Concha LA, Escobedo RM, Miranda-Ham ML (2008). Measurement of cell viability in *in vitro* cultures. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (eds). *Plant Cell Culture Protocols*. 2nd ed. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 318: 71-76
- Ibla JC, Khoury J (2006). Methods to assess tissue permeability. In: Colgan SP (ed). *Cell-Cell Interactions: Methods and Protocols*. 2nd ed. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 341: 111-117
- Lin ZF, Liu N, Lin GZ, Peng CL (2009). *In situ* localisation of superoxide generated in leaves of *Alocasia macrorrhiza* (L.) Shott under various stresses. *J Plant Biol*, 52: 340-347
- Lin ZF, Liu N, Lin GZ, Peng CL (2011). Factors altering the membrane fluidity of spicach thylakoid as determined by fluorescence polarization. *Acta Physiol Plant*, 33: 1019-1024
- Liu N, Lin ZF, Guan LL, Lin GZ, Peng CL (2009). Light acclimation and HSO₃⁻ damage on photosynthetic apparatus of three subtropical forest species. *Ecotoxicology*, 18: 929-938
- Liu N, Lin ZF, Lin GZ, Song LY, Chen SW, Mo H, Peng CL (2010). Lead and cadmium induced alterations of cellular functions in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. Shott. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73: 1238-1245
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Río LA, Sandalio LM (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ*, 27: 1122-1134