

一种定量分析水稻细胞过敏反应的方法

齐放军* 高世强 吴茂森 何晨阳**

中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094

A Method for the Quantitative Determination of Hypersensitive Response of Rice Cells

QI Fang-Jun*, GAO Shi-Qiang, WU Mao-Sen, HE Chen-Yang**

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

提要 在定量分析水稻细胞过敏反应(HR)方法中, 溴酚蓝染色法的效果明显优于伊文氏蓝染色法。线性回归分析显示, 在 0.625~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溴酚蓝最大光吸收值与其浓度间的相关系数为 0.9994。溴酚蓝染色法优化的测定条件为: 0.03% 溴酚蓝染色 15 min, 水洗去除未结合染料, 再在 50°C 下用含 50% 甲醇和 1% SDS 抽提液抽提与死亡细胞结合的染料 30 min, 测定抽提液光吸收值(OD_{595}), 以甲醇处理 15 min 的细胞作为全杀死细胞参照。用优化方法测定的水稻细胞死亡率与实际死亡率一致。

关键词 水稻细胞; 过敏反应; 植物病原细菌; 溴酚蓝染色法

植物细胞过敏反应(hypersensitive response, HR)是抗病反应的特征性标志之一(Greenberg 等 1994)。与动物细胞凋亡相似, 植物细胞 HR 是受基因表达控制的程序化细胞快速死亡反应(Greenberg 和 Yao 2004)。植物 HR 的发生不仅能将病原菌限制在侵染位点内, 还可激发植物其它类型抗病反应的产生(Greenberg 等 1994; Greenberg 和 Yao 2004)。

定性检测植物 HR 的方法很多(Danon 等 2000; Houot 等 2001; Sasabe 等 2000; Solomon 等 1999), 如细胞学方法分析亚细胞结构的特征性变化、生化方法测定细胞死亡的标志酶和 DNA Laddering 等分子生物学技术测定编程性死亡的分子特征。此外, 定量分析植物 HR 也是揭示其产生机制的手段, 染色法是目前定量检测细胞死亡中的主要研究方法之一(Delledonne 等 1998, 2001)。染色法的基本原理是染料能渗入死亡细胞, 而活细胞由于其有完整的细胞膜和选择性通透能力, 可阻止染料进入细胞内(Weiss 和 Zychlinsky 2002)。伊文氏蓝(Evan's blue)染料分子量较大, 活细胞拒染明显, 是检测细胞死亡中最常用的染料之一(Delledonne 等 1998, 2001)。我们发现伊文氏蓝染料不能有效地染色水稻死亡细胞, 因而不适宜于水稻细胞死亡的定量测定。而分子

量较小的溴酚蓝(bromphenol blue)染料则能显著区分活细胞和死亡细胞, 可准确测定水稻细胞死亡率。本文报道定量分析水稻细胞 HR 的溴酚蓝染色方法及其测定条件优化所得到的结果。

材料与方法

1 水稻悬浮培养细胞制备

参照 Kuchitsu 等(1993)的方法进行。将水稻品种‘日本晴’(*Oryza sativa* cv. Nipponbare)的成熟胚接种在附加 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D 的 MS 培养基(Murashige 和 Skooge 1962)上诱导, 形成的愈伤组织转至 MS 培养基上继代培养, 20 d 继代 1 次。生长良好的愈伤组织接入附加 1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D 的 MS 液体培养基中, 在 28°C、100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养。每周更换培养基, 继代培养悬浮细胞。取继代培养 5 代以上, 生长良好、均一的悬浮细胞分装至 50 mL 三角瓶中(10 mL 培养基中 1 g 细胞), 用于下列实验。

2 不同染色方法和细胞死亡率测定

用 0.03% 溴酚蓝或 0.05% 伊文氏蓝染色正常

收稿 2005-05-26 修定 2005-11-23

资助 国家自然科学基金(30571212、30370922)。

*E-mail: qfj@sdu.edu.cn, Tel: 010-62896063

** 通讯作者(E-mail: cyhe@caas.net.cn, Tel: 010-62894147)。

生长的水稻细胞和杀死细胞, 染色 15 min 后以流水充分冲洗去除未结合染料, 在 50℃ 下用 20 mL 含 50% 甲醇和 1% SDS 的溶液抽提与死细胞结合的染料 30 min, 测定抽提液光吸收值, 伊文氏蓝染色的测定波长为 600 nm, 溴酚蓝染色的测定波长为 595 nm。具体测定内容有: (1) 甲醇处理 15 min 杀死的水稻细胞, 分别用不同浓度溴酚蓝染色后测定, 比较染料浓度对测定的影响; (2) 用甲醇或乙醇处理, 或煮沸处理水稻细胞不同时间后, 再用 0.03% 溴酚蓝染色测定, 比较细胞杀死处理方法的优劣; (3) 精确称量水稻活细胞和甲醇处理的死细胞, 人工制备已知死亡率的水稻细胞样品, 对这些已知死亡率的水稻细胞样品进行测定。按公式: 细胞死亡率 (%) = $(OD_{595} \text{ 处理} - OD_{595} \text{ 对照}) / (OD_{595} \text{ 全杀死} - OD_{595} \text{ 对照}) \times 100\%$ 计算。

3 溴酚蓝光谱特性分析

用可见-紫外分光光度计 (Perkin Elmer Lambda 35) 对不同浓度溴酚蓝进行波长 (500~650 nm) 扫描分析。线形回归分析溴酚蓝最大光吸收值与其浓度间的相关性。

4 病原细菌诱导水稻细胞 HR 的测定

亲和菌株水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 'Jxo I' 和细菌性条斑病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzicola*) 'Rs63', 由南京农业大学刘凤权先生惠赠; 不亲和菌株辣椒细菌性斑点病菌 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) 'Xv1', 'Xv5' 和 'Xv18', 甘蓝黑腐病菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 'Xc9', 由本所孙福在先生提供。菌株在 NA (方中达 1996) 上培养, 其单菌落接种在 NB (方中达 1996) 中, 于 28℃、150 r·min⁻¹ 下过夜振荡培养, 离心收集菌体, 并悬浮于 MS 培养基中, 制备菌悬液, 接种浓度为 10⁸ cfu·mL⁻¹。接种 24 h 后测定水稻细胞死亡率。

结果与讨论

1 不同染色测定水稻细胞过敏反应方法的比较

结果如图 1 所示。伊文氏蓝对水稻死亡细胞的染色效果差, 染色后的活细胞和死细胞光吸收值差异不明显, 表明该染料对水稻死亡细胞的染色效果差, 不能准确测定水稻 HR 的死细胞。而用溴酚蓝染色, 则能显示出水稻活细胞和死细胞

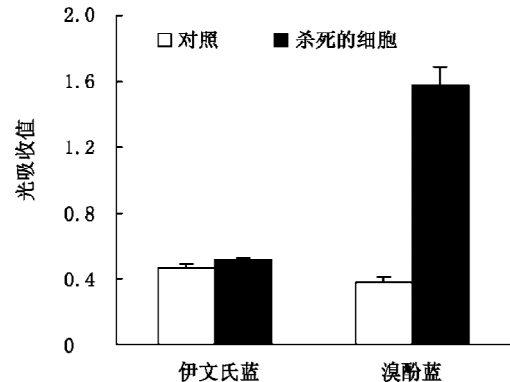


图 1 伊文氏蓝与溴酚蓝对水稻细胞染色的效果比较

光吸收值的差异, 即能明显区分活细胞和死细胞, 显示其效果明显优于伊文氏蓝。

2 溴酚蓝的光谱特性

溴酚蓝有单一的光吸收峰, 最大光吸收波长为 595 nm (图 2)。0.625、1.25、2.5、5、10 及 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度溴酚蓝的最大光吸收值分别为 0.072、0.173、0.376、0.808、1.569、2.964 (图 2)。线形回归分析显示, 溴酚蓝的最大光吸收值与其浓度间的相关系数为 0.9994, 线形关系良好。这些结果进一步表明溴酚蓝是适用于定量分析水稻细胞死亡的染料。

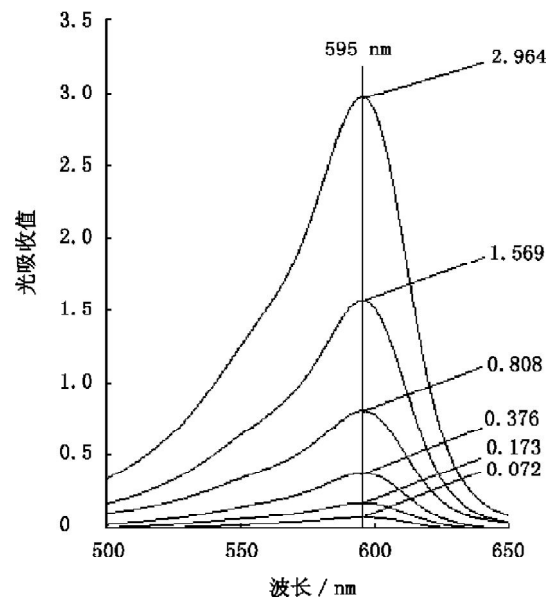


图 2 不同浓度溴酚蓝的光谱分析

各曲线自上而下分别代表浓度为 20、10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴酚蓝的波长扫描结果。

3 杀死水稻细胞的方法比较

用染色法测定细胞死亡率, 杀死细胞的光吸收值是参照的指标之一。为了确定适宜的细胞杀死方法, 我们对甲醇或乙醇处理以及煮沸处理杀死的水稻细胞作了比较。图3显示, 甲醇和乙醇处理杀死的细胞光吸收值均较大, 煮沸处理杀死的细胞光吸收值略低。据此, 本文即以甲醇处理15 min的水稻细胞作为杀死细胞的参照样品。

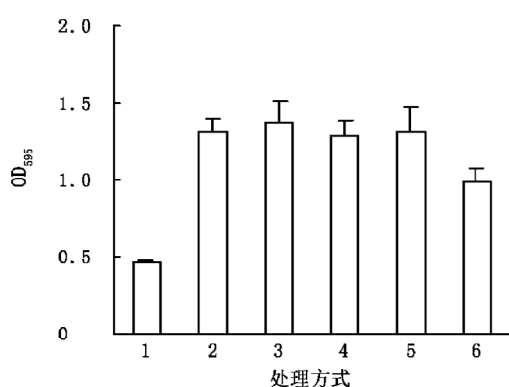


图3 不同处理杀死的水稻细胞的染色结果

1: 对照; 2: 甲醇处理 15 min; 3: 甲醇处理 30 min; 4: 乙醇处理 15 min; 5: 乙醇处理 30 min; 6: 煮沸 5 min。

4 不同浓度溴酚蓝的染色效果比较

图4结果显示, 染色的溴酚蓝浓度低于0.02%, 光吸收值随着溴酚蓝浓度的增加而升高, 这表明溴酚蓝对死细胞的染色不充分; 溴酚蓝浓度提高到或超过0.03%时, 光吸收值趋于稳定。据此, 取0.03%溴酚蓝用作水稻细胞染色。

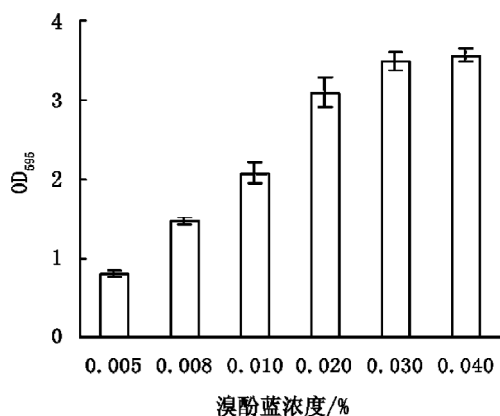


图4 不同浓度溴酚蓝对水稻细胞的染色结果

5 已知死亡率的水稻细胞测定

用上述最适的测定条件测定人工制备的已知死亡率水稻细胞样品的结果表明, 溴酚蓝染色法对水稻细胞死亡率的测定值与样品的实际死亡率基本上吻合(表1), 说明溴酚蓝染色法可用于水稻死细胞的定量测定。由于水稻活细胞样品含水量的差异以及用水冲洗未结合染料操作中的细胞损失, 会对实验结果造成一定的偏差, 这在操作时应当加以注意, 本文中的此类偏差可控制在10%以内。

表1 溴酚蓝染色法测定已知死亡率水稻细胞的效果

样品死亡率/%	死亡率的测定值/%
0	0±9.8
5	4.0±8.5
10	9.0±1.9
20	19.0±2.6
40	44.1±6.7
60	68.3±1.3
80	87.0±2.4
100	100.0±9.8

6 病原细菌诱导水稻细胞HR的测定

图5显示, 亲和菌株‘JxoI’、‘Rs63’诱导的水稻细胞死亡率低, 与未经处理的对照无明显差异, 表明亲和细菌不能诱导水稻细胞HR; 而不亲和菌株‘Xv1’、‘Xv5’、‘Xv18’、‘Xc9’诱导水稻细胞的死亡率分别为42.3%、48.8%、64.5%、56.8%, 表明不亲和细菌能够诱导水稻细胞HR。

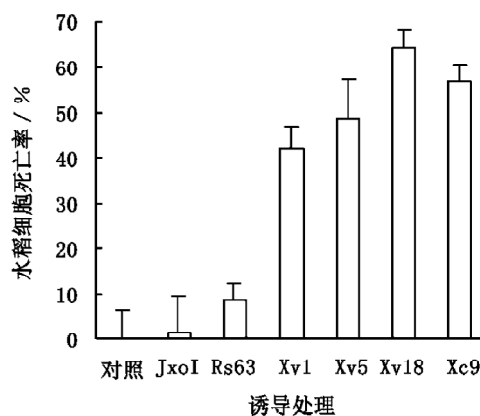


图5 溴酚蓝染色测定病原细菌诱导水稻细胞HR

总之, 本文建立的溴酚蓝染色法为研究水稻细胞 HR 研究提供了稳定而可靠的定量方法, 同时对其它植物 HR 的研究也有一定的参考价值。

参考文献

- 方中达(1996). 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 182
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P (2000). Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem*, 38: 647~655
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585~588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13454~13459
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77: 551~563
- Greenberg JT, Yao N (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6: 201~211
- Houot V, Etienne P, Petitot AS, Barber S, Blein JP, Suty L (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *J Exp Bot*, 52: 1721~1730
- Kuchitsu K, Kikuyama M, Shibuya N (1993). *N*-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*, 174: 79~81
- Murashige T, Skooge F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473~479
- Sasabe M, Takeuchi K, Kamoun S, Ichinose Y, Govers F, Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem*, 267: 5005~5013
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999). The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11: 431~444
- Weiss DS, Zychlinsky A (2002). Methods for studying bacteria-induced host cell death. *Method Microbiol*, 31: 439~460