

检测到^[6]. 该小组又利用一株因酪氨酸合成酶基因发生点突变而呈现白化表型的上皮细胞系, 进行定点纠正, 结果被纠正的细胞出现黑色的表型变化^[7]. 但对于绝大多数无表型特征的基因定点纠正而言, AS-PCR 无疑是一种快速、便捷的检测手段. 本实验室已成功运用此方法检测到效率极低的寡核苷酸定位点突变.

参 考 文 献

- 1 Bottema C, Sommer S. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mut Res*, 1993, **288** (1): 93~ 102
- 2 Hessner M, Luhm R, Pearson S, *et al.* Prevalence of prothrombin G2021A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost*, 1999, **81** (5): 733~ 738
- 3 Yun K, Soejima H, Arend E H, *et al.* Analysis of IGF2 gene imprinting in breast and colorectal cancer by allele specific PCR. *J Pathol*, 1999, **187** (5): 518~ 522
- 4 Stoming T A, Stoming G S, Lanclos K D, *et al.* An Λ_Y type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T → C mutation at position - 175 to the cap site of the Λ_Y globin gene. *Blood*, 1989, **73** (1): 329~ 333
- 5 Gura T. Repairing the genome's spelling mistakes. *Science*, 1999, **285** (5426): 316~ 318
- 6 Santana E, Peritz A, Iyer S, *et al.* Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial

cells. *J Invest Dermatol*, 1998, **111** (6): 1172~ 1177

- 7 Alexeev V, Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (13): 1343~ 1346

Allele Specific PCR: A Useful Method for Detecting Trace Amounts Point Mutation in Mammalian Cell Pool. YIN Wen Xuan, LIU De Pei, LI Zhu Hong, LIANG Zhi Quan (LIANG Chi Chuan) (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*).

Abstract To detect trace amount of DNA point mutation in mammalian cell pool, a semi-nest allele specific PCR was optimized by adding 5% formamide and decreasing all the components' amount of the polymerase chain reaction to eliminate the nonspecific amplification. This modification was so effective and highly specific that it can be used to detect the point mutation which is lower than 0.025% in mammalian cell pool.

Key words allele gene, PCR, point mutation

低温诱导唐古特红景天细胞分泌抗冻蛋白*

卢存福

(北京林业大学生物学院森林生物学实验中心, 北京 100083)

简令成 匡廷云

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 选择青海高原海拔 4000m 高山上生长的唐古特红景天为实验材料, 以叶片为外植体, 在 MS+ BA₂+ NAA_{0.2} 固体培养基上诱导出黄绿色、松脆愈伤组织. 愈伤组织细胞在同样成分的液体培养基中培养获得成功. 在悬浮培养液中可检测到分泌蛋白的存在. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明, 低温锻炼或脱落酸 (ABA) 诱导后, 细胞分泌蛋白的多肽谱带数增加. 与此相对应的是, 细胞的抗冻能力也明显提高. PAS 染色揭示多肽中均含有糖基. 通过测定热滞值, 确信细胞分泌蛋白是具有抗冻活性的糖蛋白.

关键词 高山植物, 唐古特红景天, 悬浮培养细胞, 抗冻蛋白

学科分类号 Q71

抗冻蛋白 (AFP) 最初是从极区海鱼中发现的一种适应低温的特异蛋白质, 它能阻止体内冰核的形成与生长, 维持体内的非冰冻状态^[1]. 受动物抗冻蛋白 (AFP) 研究的启发, 1992 年加拿大 Griffith 等^[2]首先在冬黑麦中发现了植物 AFP. 这一发现给人们许多启示, 即通过从植物中筛选活性

高的 AFP, 克隆、筛选抗冻基因, 从而有可能通过基因工程手段提高冷敏感植物的抗冻性.

* 国家自然科学基金 (39800118) 和霍英东青年教师基金 (71030) 资助项目.

Tel: (010) 62338346, E-mail: lucunfu@beilin.bjfu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-21, 修回日期: 2000-04-20

高山植物是一类处于极端低温环境中的特殊植物类型, 冰雪、霜冻伴随其整个生长周期. 起伏不定的严酷低温环境压力, 使这类植物形成了特殊的抗冻机制, 这类植物可能是宝贵的抗冻基因库. 为此, 我们选择了在号称地球第三极的青藏高原地区分布的唐古特红景天为实验对象, 研究从叶片诱导得到的愈伤组织细胞的抗冻特性及其抗冻蛋白, 以期揭示高山植物特殊的抗冻机制积累新的资料.

1 材料与方 法

唐古特红景天 (*Rhodiola algida* Var *tangutica*) 采自青海高原海拔 4 000 m 的达坂山山顶. 取幼嫩叶片, 洗净, 用 100% 乙醇漂洗两次, 再经 5% 次氯酸钠消毒 10~ 15 min, 无菌水洗 3 次, 将叶片切割成 0.2 cm × 0.2 cm 的小块, 在 MS + BA₂+ NAA_{0.2}固体培养基诱导愈伤组织, 14 d 继代一次, 得到黄绿色、松脆的愈伤组织, 培养箱温度为 18/22 ℃, 无光照. 细胞悬浮培养在 MS+ BA₂+ NAA_{0.2}液体培养基, 并在 4~ 5 ℃冰箱中进行低温锻炼.

悬浮培养细胞抗冻能力测定参照简令成^[3]的方法. 此法是显示细胞内脱氢酶的活性. 电子受体氯化三苯四氮唑 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 被还原, 形成红色化合物 (formazan), 用比色法确定组织的代谢强弱和死活.

悬浮培养细胞分泌蛋白的分离: 悬浮培养细胞经 3 000g 离心 20 min, 收集上清液, 并经过滤纸过滤, 滤液透析(对蒸馏水)一昼夜. 滤液加 4 倍丙酮, 于 -20 ℃沉淀, 经 3 000g 离心收集蛋白质沉淀, 置 -70 ℃冰箱备用.

蛋白质浓度测定用双缩脲法^[4].

蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 参照 Laemmli^[5]的方法, 分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 4.6%. 采用上海生物化学研究所东风生化试剂厂生产的低分子质量标准蛋白质作标准, 测定蛋白质的分子质量. 糖蛋白的显示参考 Glossmann 等^[6]的方法. 参照 Devries^[7]的方法, 用显微镜观察冰晶消长, 测定抗冻蛋白的热滞值 (抗冻活性).

抗冻蛋白中糖基作用的检测及蛋白酶处理: 蛋白质提取液用胰蛋白酶 (1 g/L) 室温处理 2 h, 测定 AFP 活性变化. 样品在 4 ℃, 含 10 mmol/L 高碘酸钠的 50 mmol/L 乙酸钠溶液中反应 6 h, 检测 AFP 活性变化. 样品用 200 mmol/L 硼酸钠

(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.6) 处理 6 h. 测定 AFP 活性变化^[8].

2 结果与分析

2.1 唐古特红景天细胞悬浮培养

幼叶在 MS+ BA₂+ NAA_{0.2}固体培养基上可诱导出黄绿色、松脆的愈伤组织. 愈伤组织在昼夜温度 18/22 ℃条件下培养, 无光照. 实验发现, 愈伤组织在 5 ℃冰箱中也能良好地生长.

细胞悬浮培养所用液体培养基成分同上述固体培养基. 选取在固体培养基上继代生长 7 d 的愈伤组织, 每 50 ml 培养基接种 2 g 鲜重起始培养, 悬浮细胞生长曲线见图 1. 从图 1 中可以看到经过短暂的滞后期 (约 2 d), 细胞经历大约 9 d 的直线增长期. 到第 13 d, 细胞逐渐进入静止期.

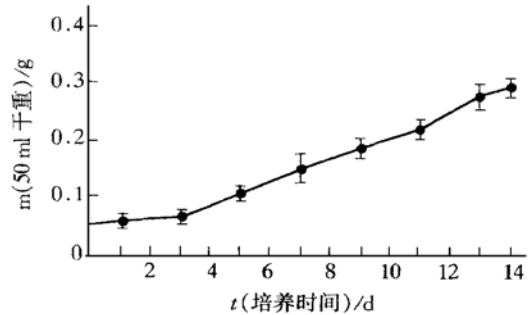


图 1 唐古特红景天悬浮培养细胞生长曲线

2.2 悬浮培养细胞的抗冻能力

如图 2 所示, 25 ℃培养的悬浮培养细胞耐受 -21 ℃的低温 (半致死温度); 低温锻炼 14 d 后, 悬浮培养细胞的抗冻能力明显提高 (LT₅₀ = -26 ℃). 正常室温 (25 ℃) 下 ABA (7.5 × 10⁻⁵ mol/L) 处理也能提高细胞的抗冻能力 (LT₅₀ = -25 ℃), 但较低温驯化的效果差. ABA 同低温协同诱导可明显提高细胞的抗冻能力 (LT₅₀ = -28.5 ℃).

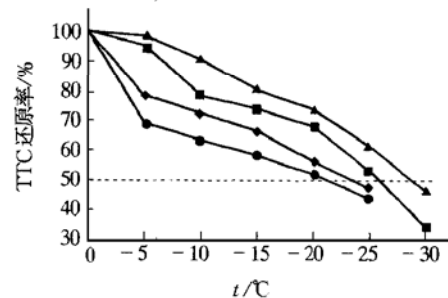


图 2 低温诱导及 ABA 处理对唐古特红景天悬浮培养细胞抗冻能力的影响

●—●: 25 ℃, 7 d; ◆—◆: 25 ℃+ ABA, 10 d; ■—■: 4~ 5 ℃, 14 d; ▲—▲: 4~ 5 ℃+ ABA, 14 d.

2.3 悬浮细胞的分泌蛋白及其 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析

在悬浮细胞培养液中可检测到细胞分泌的胞外蛋白的存在. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明, 经 ABA 或低温锻炼后细胞分泌蛋白的组成发生改变. 25℃培养时胞外蛋白为 29 ku、37.6ku 两条多肽; 25℃下 ABA 诱导得到的 29 ku、37.6ku 两条多肽表达量增加; 低温诱导 14 d 分泌蛋白由 29 ku、37.6 ku、50ku 三条多肽组成, 但 37.6ku 的一条多肽表达量增加. 低温同 ABA 协同诱导得到三条多肽 (29 ku、37.6 ku、50ku), 其中 29 ku、50ku 表达量较低温诱导的表达量增加 (图 3). 细胞内蛋白质合成的改变同细胞抗冻能力的发展是一致的, 即低温诱导使悬浮细胞抗冻能力增强, 与此对应的是细胞合成分泌蛋白的能力的增强, 后者应是前者的物质基础. 电泳胶板经 PAS 染色揭示胞外分泌蛋白为糖蛋白. 由图 3 可以看到, 电泳胶板经 PAS 染色后, 多肽谱带颜色较浅, 证明胞外分泌蛋白中糖基在蛋白质组中所占比例较小. 但经 PAS 染色后的湿电泳胶板在 X 光箱上仍可较清晰地观察到同考马斯亮蓝染色对应的多肽谱带.

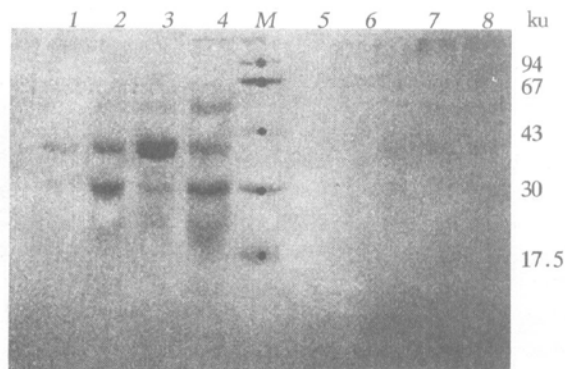


图 3 唐古特红景天悬浮培养细胞分泌蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析

1、2、3、4: 考马斯亮蓝染色; 5、6、7、8: PAS 反应; M: 标准分子质量蛋白. 1、5: 25℃, 7 d; 2、6: 25℃+ ABA, 10d; 3、7: 4~5℃, 14d; 4、8: 4~5℃+ ABA, 14 d.

2.4 悬浮培养细胞分泌蛋白的抗冻活性

用显微镜观察法测定蛋白质溶液冰晶的消长, 以热滞值 (冰点与溶点的差值) 大小表示蛋白质的抗冻活性. 如表 1 所示, 悬浮细胞分泌蛋白表现出明显的热滞效应. 在不同诱导条件下获得的细胞分泌蛋白的抗冻活性不相同. 从表 1 的测定结果来

看, 室温下, 细胞分泌蛋白的抗冻活性较低; 低温 (5℃) 与 ABA 协同诱导获得的胞外分泌蛋白抗冻活性最高, 可达 0.5℃. 这一结果同前述的低温诱导或 ABA 处理后悬浮细胞抗冻能力的发展及细胞分泌蛋白组分的改变等实验结果是一致的, 即细胞抗冻能力愈高, 其产生的抗冻蛋白抗冻活性愈高、组成也愈复杂. 从表 1 还可看到, 蒸馏水及 10 g/L 的牛血清白蛋白溶液均不表现抗冻活性, 这说明抗冻蛋白是一种特殊的蛋白质.

表 1 唐古特红景天悬浮培养细胞分泌蛋白的抗冻活性 (溶点-冰点)

处理	ρ (蛋白质) / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	热滞值/℃
重蒸水		0
牛血清蛋白	10	0
25℃, 7 d	9	0.1±0.02
25℃+ ABA, 10 d	9	0.3±0.03
5℃, 14 d	5	0.4±0.01
5℃, 10 d	9	0.4±0.05
5℃+ ABA, 14 d	9	0.5±0.06

注: ABA 的浓度为 7.5×10^{-5} mol/L.

为进一步分析悬浮细胞分泌蛋白的生化特性, 作了沸水浴处理、胰蛋白酶水解处理、高碘酸氧化处理、硼酸钠处理. 胰蛋白酶水解由精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 羧基组成的肽键. 高碘酸能打断碳、羟基之间的化学键, 并氧化羟基为醛基. 硼酸干扰碳原子上的顺式-羟基. 因此, 高碘酸和硼酸均可改变碳水化合物 (糖类) 的结构. 如表 2 所示, 经过上述处理后, 蛋白质的抗冻活性均消失. 这一方面证明了所获得的抗冻蛋白的蛋白质性质, 即变性或水解为氨基酸后抗冻活性消失; 另一方面也揭示了糖基在 AFP 中的存在及对保证抗

表 2 蛋白水解酶、糖基影响因子对抗冻蛋白抗冻活性的影响

处理	热滞值/℃
对照	0.5±0.06
煮沸	0
胰蛋白酶	0
高碘酸	0
硼酸	0

注: 抗冻蛋白为 5℃培养 10 d 的悬浮培养细胞分泌的抗冻蛋白 (12 g/L).

冻蛋白的抗冻活性是至关重要的, 因为糖基受到破坏后 AFP 活性消失, 虽然糖基在 AFP 中所占比例较小 (图 3).

3 讨 论

唐古特红景天悬浮培养细胞经低温 (5℃) 驯化后抗寒力提高, 同时在培养液中可检测到 AFP. 这一发现, 进一步证实 AFP 在抗冻植物中可能是较普遍存在的这一早期推测^[9].

许多研究都揭示 ABA 可以代替低温诱导抗寒植物抗寒力的发展, 并认为 ABA 可诱导抗寒基因表达及蛋白质的合成. ABA 在提高植物抗寒力的同时, 可以诱导新的蛋白质的合成, 尽管这种蛋白质的作用多数还不清楚, 但很可能同抗逆性的提高有关. Robertson 等^[10, 11]曾用 ABA 从苜蓿及雀麦悬浮细胞诱导出细胞分泌蛋白, 但这种蛋白质是否有抗冻活性, 作者没有进一步分析. Chen 等^[12]用蛋白质合成抑制剂 (放线菌酮) 处理马铃薯, 抑制锻炼中蛋白质的合成, 结果发现低温或外源 ABA 都不能诱发抗寒力的增加. 不仅如此, 经 4/2℃ 低温锻炼后马铃薯体内 ABA 含量升高, 但此时使用放线菌酮处理后, 抗寒力发展立刻受阻. 由此推知, 抗寒力的发展依赖于低温或 ABA 诱导的蛋白质合成的增强. 我们的实验结果表明, ABA 可有效地诱导唐古特红景天悬浮培养细胞抗冻能力的提高, 并且低温同 ABA 协同作用诱导效果更明显. 不仅如此, 电泳分析发现, 低温、ABA 处理后, 细胞分泌蛋白发生了质和量的变化, 而且这些变化同细胞的抗冻能力成正相关, 这类蛋白为糖蛋白, 具有 AFP 的活性. 这一结果也为在高山自然低温环境下唐古特红景天叶片细胞间隙积累 AFP 提供了间接的实验依据 (结果另文发表).

低温或 ABA 诱导的蛋白质合成的改变是植物基因表达改变的结果, 即植物体内可能存在冷调节基因 (COR 基因). 从低温或 ABA 诱导的拟南芥转录产物推导出的蛋白质氨基酸序列同北极比目鱼 AFP 的氨基酸序列很相似^[13]. 另一个从低温诱导的拟南芥蛋白, 有很高的保护低温敏感的乳酸脱氢酶避免冰冻破坏的作用^[14]. 到目前已有多个冷调节基因被分离到. 这样看来, 从低温诱导或 ABA 处理的唐古特红景天细胞中分离抗冻蛋白基因是可能的.

总之, 本实验所获得的唐古特红景天悬浮培养细胞系在低温或 ABA 诱导下能有效地合成抗冻蛋

白, 为进一步分离纯化高活性抗冻多肽, 分析其生化特性, 克隆 AFP 基因奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 卢存福, 王 红, 简令成, 等. 植物抗冻蛋白研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1998, **25** (3): 210~ 216
Lu C F, Wang H, Jian L C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 1998, **25** (3): 210~ 216
- 2 Griffith M, Ala P, Yang D S C, *et al.* Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. Plant Physiol, 1992, **100** (2): 593~ 596
- 3 简令成. 种质的超低温保存. 见: 陈维纶主编. 植物生物技术. 北京: 科学出版社, 1987. 191~ 209
Jian L C. Cryopreservation of germplasm. In: Chen Wei-Lun ed. Plant Biotechnology. Beijing: Science Press, 1987. 191~ 209
- 4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, **72** (2): 248~ 254
- 5 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 6 Glossmann H, Neville D M. Glycoproteins of cell surfaces. J Biol Chem, 1971, **246** (20): 6339~ 6346
- 7 Devries A L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. Science, 1971, **172** (3988): 1152~ 1155
- 8 Duman J G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bitter-sweet nightshade *Solanum dulcamara*. Biochim Biophys Acta, 1994, **1206** (1): 129~ 135
- 9 Guy L C. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Ann Rev Plant Physiol Mol Biol, 1990, **41**: 187~ 223
- 10 Robertson A J, Gusta L V. Abscisic acid and low temperature induced polypeptide changes in alfalfa (*Medicago sativa*) cell suspension cultures. Can J Bot, 1986, **64** (10): 2758~ 2763
- 11 Robertson A J, Gusta L V, Reaney M T T, *et al.* Identification of proteins correlated with increased freezing tolerance in bromegrass cell cultures. Plant Physiol, 1988, **86** (2): 344~ 347
- 12 Chen H H, Li P P. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing frost hardiness during cold acclimation. Plant Physiol, 1980, **65** (4): 1146~ 1148
- 13 Kurkela S, Franck M. Cloning and characterization of a cold and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. Plant Molecular Biology, 1990, **15** (1): 137~ 144
- 14 Chandler P M, Robertson M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, **45**: 113~ 141

Secretory Antifreeze Proteins Produced in Suspension Culture Cells of *Rhodiola algida* Var. *tangutica* During Cold Acclimation. LU Cur-Fu (*College of Plant Sciences, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China*); JIAN Ling-Cheng, KUANG Ting-Yun (*Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*).

Abstract The culture of callus and cell suspension induced from leaves of *Rhodiola algida* Var. *tangutica* collected from Qinghai plateau (altitude: 4 000 m), on solid and in liquid culture medium (MS+ BA₂+ NAA_{0.2}) respectively, was successful. After cold (4~5 °C) acclimation or ABA treatment for 10 or 14 days, the freezing resistance of suspension cells was increased. Proteins from the liquid suspension cell culture medium exhibited antifreeze activity. Treatment of the antifreeze proteins (AFPs) with boiling or trypsin caused inactivation, proving the protein characteristics of

AFPs. Periodate and borate inhibited the antifreeze activity of AFPs, suggesting the presence of carbohydrate. Of the four treatments (25 °C; 25 °C + ABA; 5 °C; 5 °C+ ABA), 2~3 polypeptides (29~50 ku) could be detected from the one dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). PAS (periodic acid-schiff's reagent) reaction of SDS-PAGE showed the presence of carbohydrate in the polypeptides.

Key words alpine plant, *Rhodiola algida* Var. *tangutica*, suspension cell culture, antifreeze proteins

欢迎订阅 2001 年《植物学通报》

《植物学通报》是中国植物学会创办的植物学综合性科技刊物。国内统一刊号 CN11-1945/Q, 国际标准连续出版物号 ISSN 1003-2266。

主要刊登内容: 1. 植物学各分支学科及其有关的农、林、牧、药、环保和轻工等方面有一定理论水平和应用价值的专论与综述; 2. 新技术、新方法; 3. 研究论文和简报; 4. 高等院校植物学教学研讨; 5. 信息动态; 6. 科学家园地。全国性植物学专题学术讨论会论文或摘要以专辑发表。

《植物学通报》的主要读者对象是从事植物学以及有关的农、林、牧、医药、轻工、环保等方面的科技、教学人员, 深受广大读者的欢迎。据中国科学院上海文献情报中心对生命科学 450 种中文期刊近几年流通频次的统计, 在流通率最高的 59 种生命科学中文期刊中, 《植物学通报》排在第 14 位, 居植物学类刊物之首。该刊为“中国自然科学核心期刊”, 据中国科学引文数据库统计数据, 被引频次排名前 500 名期刊中, 该刊在近 3 年内名次提高了 186 名次, 现位于第 211 名。

该刊为双月刊, 每双数月月末出版, 单价每册 14 元, 全年 84 元。欢迎全国各地图书情报单位及广大读者在当地邮局订阅。若错过邮局订阅, 请直接与编辑部联系订阅。除现刊外, 尚有自创刊以来的全部过期刊物, 半价优惠, 共计 180 元(含邮费)。欲订阅者, 与编辑部联系。该刊编辑部地址: 北京市香山南辛村 20 号, 《植物学通报》编辑部, 邮政编码: 100093, 电话: (010) 62591431-6135。

欢迎订阅《生物技术通讯》

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的中央级专业性学术刊物(国内统一刊号 CN81-1148/Q, 国际标准刊号 ISSN 1009-0002), 主要报道生物技术(生物工程)及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有: 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员, 大专院校相关专业师生及有关工程技术人员, 以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿。

《生物技术通讯》(季刊)为大 16 开本, 80 页, 每期定价 9 元, 全年 36 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-196, 国外发行代号: 1433Q。编辑部办理邮购业务。

邮政编码: 100071, 地址: 北京丰台东大街 20 号

电话: (010) 66948856, 传真: (010) 63895646

电子信箱: yanmf@ns.glc.cn.net biolett@bj163.com