文章编号: 1673-1689(2011)03-0440-05

番茄果实组织在衰老和热胁迫中死亡率及 DNA 片段化的测定

姚 丹, 潘多军, 刘 翔, 马秋敏, 车英慧, 罗云波, 曲桂芹*
(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 组织、细胞死亡率及 DNA 片段化分析是番茄果实细胞程序性死亡(PCD)必不可少的检测指标。优化了番茄果实的电导率测定方法和 TUNEL 原位杂交方法,比较了不同甘露醇浓度和水作为介质对番茄果实圆片电导率测定的影响。0.2 mol/L~0.3mol/L 的甘露醇溶液下番茄果实圆片的电导率较低,120 min 后趋于稳定,而水为介质使番茄果实圆片电导率在测定的 240 min 内一直呈上升趋势,由 30 min 时的(23.95±0.85)%升至 240 min 的(63.95±0.35)%。结果表明 0.3 mol/L 甘露醇,震荡 120 min 为番茄果实电导率测定的适宜条件。进一步对成熟衰老和 45 ℃热激处理的番茄果皮圆片电导率进行了测定,发现成熟的番茄及热激处理绿熟期果实细胞死亡率升高。对番茄果皮进行徒手切片的 TUNEL 原位荧光染色方法检测果实细胞 DNA 片段化简便可行,TUNEL 原位杂交方法分别检测出了衰老果实和热激处理绿熟番茄果实 TUNEL 阳性细胞核。

关键词: 细胞程序性死亡; 番茄果实; 电导率; TUNEL 原位杂交
中图分类号: S 37 文献标识码: A

Determination of Cell Viability and DNA Fragmentation in Tomato Fruit Induced by Senescence and Heat Stress

YAO Dan, PAN Duo-jun, LIU Xiang, MA Qiu-min,
CHE Ying-hui, LUO Yun-bo, QU Gui-qin*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Cell viability and DNA fragmentation analysis are essential markers for tomato fruit programmed cell death (PCD). The ion leakage detection and TUNEL assay of tomato fruit method were optimized in this study, and compared the effect of different concentrations of mannitol and water as a medium on determination of ion leakage. The ion leakage of tomato fruit discs was lower in 0.2 mol/L(0.3mol/L of mannitol solution, and became stable after 120 min. But the ion leakage in water increased continually within 240 min, from (23.95±0.85)% to (63.95±0.35)%. The results showed that immersion of pericarp discs in 0.3mol/L mannitol, 120 min shaking was suitable for detecting the ion leakage of tomato fruit. Cell death rate rised in red ripe tomatoes and 45 ℃ heat-treated mature green tomatoes. In situ TUNEL staining using hand slice for detecting DNA fragmentation of tomato fruit cells was simple and feasible, and

收稿日期: 2010-05-17
基金项目: 国家自然科学基金项目(30500352); 国家公益性行业(农业)科研专项项目(200803033-B0602-03)。
* 通信作者: 曲桂芹(1970-), 女, 黑龙江虎林人, 副教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。
Email: quguiqin2000@sina.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

TUNEL-positive nucleus were detected in senescence tomato fruit and heat- treated mature green tomato fruit, respectively.

Key words: PCD, tomato fruit, ion leakage, in situ TUNEL staining

番茄是一种重要的经济作物, 有很高的营养价值。番茄果实在生长成熟过程和采后都受到各种环境胁迫, 对果实产量、品质都有重要影响, 很多研究表明这些与植物程序性死亡的发生有密切关系[1]。细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD), 是动植物在正常的生长条件下或各种外界胁迫条件下除去不需要及有害的细胞过程, 受众多因素严格调控[2-4]。植物在发育和受各种胁迫中也会发生 PCD, 并有各种生理生化的特征, 包括染色质的皱缩、DNA 的片断化、线粒体内外膜之间细胞色素 C 释放及 caspase 激活等等, 最终导致细胞的死亡[4-5]。

对番茄果实发育或胁迫诱导的 PCD 过程及机制进行深入研究对番茄果实品质控制、采后贮藏等有较高的理论价值, 而果实组织的死亡率检测以及 TUNEL 分析是 PCD 研究中必不可少的指标。电导率测定是植物组织(比如叶片或花朵) 发生 PCD 常用的细胞存活率检测方法[6-7], 当细胞受到伤害甚至死亡时, 其质膜透性会发生不同程度的增大, 电解质会有不同程度的外渗, 以致于电导率升高, 通过电导率的变化可以检测细胞的死亡程度。

TUNEL 原位杂交能够在细胞水平上原位观测发生 DNA 片段化的细胞, 方法灵敏, 快速, 简单。当 DNA 发生片段化, 产生单链或双链缺口, 缺口处有相应的 3′- OH 末端, TUNEL 杂交[8]是在末端脱氧核糖核酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 的作用下, 使 DNA 缺口处的 3′- OH 与特异性荧光物质连接在一起, 在荧光显微镜或流式细胞仪中检测出荧光信号。而没有发生 PCD 的细胞的 DNA 不能与 TUNEL 染料联结, 观察不到荧光现象。

本研究分别以绿熟期和红熟期番茄果实为研究材料, 对果实组织电导率测定介质、果实圆片在介质中放置时间进行优化, 同时利用 TUNEL 技术分别检测了热胁迫和采后衰老诱导的果实细胞核发生 DNA 片段化。

1　材料与方法

1.1　材料与设备

1.1.1　材料　绿熟期、红熟期的番茄果实, 品种为中蔬 4 号(*Lycopersicon esculentum* cv. zhongshu)。

在不同时间的热激实验中, 将绿熟期番茄果实在 45 ℃水浴中分别加热 20、40、60、80 min。热激完后, 去掉果实外面的保鲜膜, 在空气中自然降温到室温, 放置 6 h。

1.1.2　主要试剂　TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒和 DAPI 染色试剂: 美国 Roche 公司产品; 甘露醇、多聚甲醛等其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3　主要设备　电导仪: 上海理达仪器厂产品; BX- RFA 反射荧光显微镜: 日本 Olympus 公司产品。

1.2　实验方法

1.2.1　相对电导率测定　番茄圆片的准备: 用内径为 1cm 的打孔器将番茄果皮打出圆片, 切除果皮的内表皮, 去离子水漂洗 3 次, 洗去多余的果胶物质, 滤纸吸去多余水份。

打开电导仪, 进行校正, 调整电极常数。用水和不同浓度的甘露醇 0.2、0.25、0.3mol/L 作为介质进行电导率的测定。在试管中加入 15 mL 不同浓度的甘露醇, 测定初始电导, 记为 a。将 3 个洗好的番茄果皮圆片放入含有甘露醇的试管中, 摇床上震荡, 每 30 min 测一次电导, 记为 b。然后将试管放入沸水中煮 15 min, 用相应浓度甘露醇补足 15 mL 测其电导, 记为 c。相对电导率计算公式:

相对电导率(%) = $(b-a)/(c-a) \times 100\%$。

1.2.2　TUNEL 检测　切取番茄赤道部果皮, 徒手切出约 0.5 mm 厚的番茄果皮组织。

参考 Roche TUNEL 试剂盒上实验方法, 经过部分改进进行实验操作。将番茄组织切片立即放入体积分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 h, 吸去多聚甲醛溶液, 用 pH 值为 7.4, 10 mmol/L 的 PBS 溶液漂洗果皮切片组织 3 次, 每次 5 min。加入预冷的 TUNEL 渗透液, 4 ℃渗透 30 min, 吸去渗透液, 用 PBS 溶液漂洗果皮切片组织 3 次, 每次 5 min。将番茄果皮组织放在载玻片上, 吸去多余液体, 滴加 30 μL TUNEL 反应液, 盖上 parafilm, 放入暗湿盒中, 37 ℃孵育 1 h。吸去多余 TUNEL 反应液, 用 PBS 溶液漂洗果皮切片组织 3 次, 每次 5 min。滴加 DAPI, 反应 5 min。在荧光显微镜下观察, 紫外发射光观测番茄细胞核, 观测为蓝光荧光; 蓝光发射光观测发生 DNA 片段化的细胞核, 观测为绿色

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

荧光。

2 结果与讨论

2.1 水及甘露醇溶液对番茄果实圆片电导率的测定

电导率常用于植物组织 PCD 过程中细胞死亡率的检测[6-7]，叶片组织一般用水溶液作为介质测定电导率[9]，而番茄果实相对于叶片组织，有其自身的特点，比如果皮具有一定厚度，果实组织含水量较高、汁液较丰富。因此番茄果实电导率的测定方法需根据果实的特性进行优化。

作者测定了水、不同浓度甘露醇，不同浸泡时间对红熟期的番茄果实圆片电导率的影响，从而选择出适宜番茄果实组织电导率测定的条件，结果如图 1。0~ 240 min 测定过程中，在以去离子水溶液为介质时，果皮圆片相对电导率持续升高，由 30 min 时的(23.95±0.85)% 升至 240 min 的(63.95±0.35)%。但当番茄果皮圆片放置在 0.2、0.25 和 0.3 mol/L 的甘露醇溶液中测定相对电导率时，在前 120 min 中，果实圆片的相对电导率有一定幅度的升高，但明显低于以纯水为介质的电导率，如 0.3 mol/L 甘露醇溶液中放置 120 min 的相对电导率数值比水中低 39.87%。番茄果皮圆片在随后放置的 120 min 内，相对电导率数值趋于稳定。

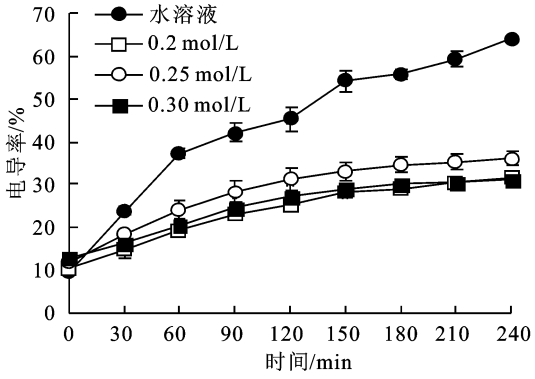


图 1 水和不同浓度甘露醇溶液对红熟期番茄果实圆片电导率测定的影响

Fig. 1 Effect of water and mannitol solution concentrations of on ion leakage of red ripe tomato fruit discs

由此可见，在番茄果实圆片相对电导率测定中，以水溶液作介质测定的电导率，渗透刺激传入组织，增高了组织的电导率从而掩盖了真实的电解质的渗出[10-11]。本研究中未做处理的番茄果皮圆片在水为测定介质的电导率背景已经很高(120 min 时接近 50%)，不易于比较对照组和处理组的差别。但在甘露醇作为介质测定果皮圆片电导率的实验中，在 120 min 时为 30% 左右，番茄圆片的电导率在 0.2~ 0.3mol/L 的甘露醇溶液中没有显著差异($P<0.05$)。因此在后续实验中，选用 0.3 mol/L 的甘露醇，摇床上震荡 120 min 测定番茄果实电导率。

2.2 绿熟和红熟番茄果实电导率的测定

为进一步比较研究中常用的绿熟和红熟番茄果皮相对电导率在水和甘露醇介质中变化，选取大小质量一致的绿熟期和红熟期番茄果实，打孔器获得果皮圆片，分别放入水和 0.3 mol/L 的测定介质中，结果见图 2。不论以水还是以甘露醇为测定介质，红熟的番茄果皮圆片的相对电导率明显高于绿熟番茄果实，即果实的电导率随成熟度增加而升高。但绿熟期果实圆片在 0.3 mol/L 甘露醇中测定相对电导率仅为(12.27±0.40)%，在水溶液中电导率测定值却为(31.43±1.63)%；红熟期果实电导率在 0.3 mol/L 甘露醇中为(35.61±0.14)%，在水溶液中却高达(51.53±0.69)%。

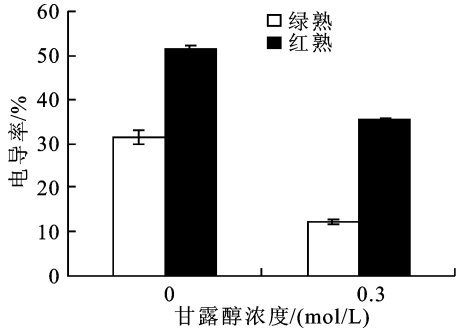


图 2 不同成熟时期番茄果实电导率

Fig. 2 Ion leakage of different maturity tomato fruits

番茄果实从绿熟成长到红熟，衰老程度增加，果实质地也变得更加松软，电导率(细胞膜透性)随着果实成熟度而增高。实验中 0.3mol/L 甘露醇测出的绿熟、红熟番茄果实圆片的电导率明显的低于水溶液测定值，进一步证明了甘露醇溶液适用于测定红熟和绿熟期番茄果实的电导率。

2.3 热胁迫处理对番茄果实圆片电导率的影响

番茄果实在田间生长和采后都会受到各种胁迫，如温度，盐，病害等，其中热胁迫是常见的一种胁迫。热激处理可以导致黄瓜子叶、烟草悬浮细胞发生 PCD[12-13]，Qu 等人发现热胁迫能够引起番茄果实 PCD 发生[1]。为进一步比较不同热激时间对绿熟期番茄果实的伤害是否具有时间依赖效应，我们将绿熟期的番茄果实在 45 ℃中水浴热激不同时间(20~ 80 min)后室温放置 6 h，然后立即取样测定它们的电导率(见图 3)。从图 3 中可以发现，随着热激时间的延长，果实电导率也随之升高。20、40、60、80 min 热激的番茄果实的电导率分别比未处理组高 1.16%、31.02%、59.90%、68.48%。说明随

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

着热激时间延长的过程中, 番茄果实受损害的程度不断升高, 果皮细胞的死亡率也在逐渐升高。

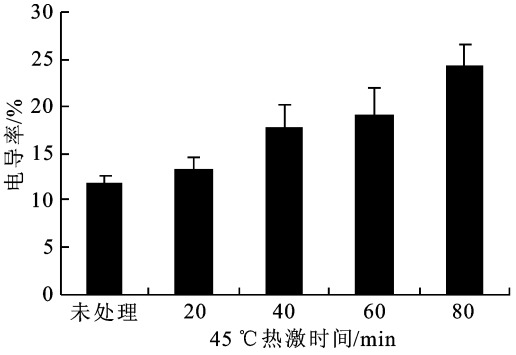


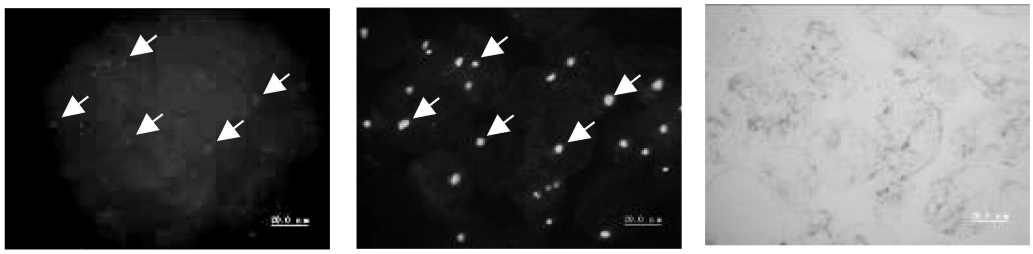
图 3　45 ℃不同热激时间处理的番茄果皮圆片的电导率

Fig. 3　Ion leakage of green tomato fruit after heat shock in different time at 45 ℃

2.4　番茄果实成熟衰老过程中细胞核片段化的 TUNEL 检测

对番茄果实圆片电导率的测定只能说明细胞受伤害的程度, 而 PCD 发生的重要形态学特征是 DNA 发生片段化。通过 DNA 凝胶电泳检测出 DNA Ladder 可以说明 DNA 片段化的发生, 但这一方法不够灵敏, 在很多发生 PCD 现象的细胞中不能检测出 DNA Ladder[14]。TUNEL 原位杂交方法能够在单细胞水平检测发生 DNA 片段化的细胞, 是一种非常灵敏, 准确的方法。

发育诱导的 PCD 是植物在正常生长过程中发生的 PCD 现象, 如花粉囊、雌配子体、维管组织发生以及衰老、授粉、性别决定等过程中都有 PCD 参与[14-16]等。实验中我们运用 TUNEL- DAPI 互染技术对采后的红熟番茄进行了检测, 验证番茄果实细胞在成熟衰老过程中是否发生 DNA 片段化。实验结果见图 4。图 4(a) 为 TUNEL 染色, 绿色圆点为发生 DNA 片段化的细胞核。图 4(b) 为 DAPI 染色, 其可特异性结合细胞核, 目的是对细胞核进行定位, 蓝色圆点为染上 DAPI 的全部细胞核; 从图中可知, 番茄果实在采摘储藏了 14 d 时, 出现了 TUNEL 阳性细胞核, 说明在成熟衰老的番茄果实有细胞发生了 DNA 的片断化。



(a)绿色　　(b)蓝色　　(c)

(a) TUNEL 染色。(b) DAPI 染色。(c) 明场视野观察。箭头指的是 TUNEL 阳性细胞核

图 4　红熟番茄采后 14 d DNA 片段化的 TUNEL 原位杂交

Fig. 4　In situ detection of DNA fragmentation by TUNEL analysis in tomato of 14d after havest

对植物组织进行 TUNEL 检测可以采用新鲜植物材料或石蜡切片材料, 石蜡切片材料准备周期长, 操作复杂, 需要脱蜡复水等环节, 步骤多使得染色效果受到其中各种条件的影响, 而且番茄果皮细胞水分含量较高, 处理过程中易发生细胞脱水皱缩, 使得细胞结构发生变化。为了避免石蜡切片在番茄果皮细胞的 TUNEL 检测中存在的问题, 本研究采用的徒手切片法, 其具有操作简单, 用时短的优点, 几个小时内就可以进行观测, 细胞结构保持得好, 而且番茄果皮细胞较大, 徒手切出的切片细胞层数少, 便于观测和计算发生片段化的细胞核。

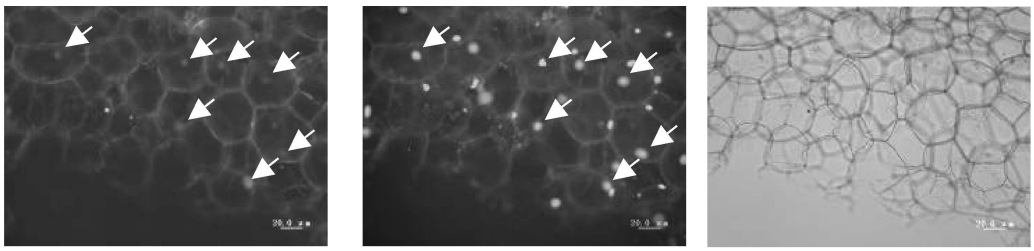
2.5　热胁迫诱导的番茄细胞核片段化的 TUNEL 检测

为进一步验证该方法是否可以应用于绿熟期的番茄, 我们用 45 ℃对绿熟期番茄果实热激处理 20 min, 利用徒手切片结合 DAPI、TUNEL 复染, 荧光显微镜镜下检测在这个胁迫下番茄果实细胞是否会发生 DNA 的片段化(见图 5)。在热激处理 20 min, 室温放置 6 h 后的番茄果实细胞中中出现了 TUNEL 阳性点, 出现的阳性 TUNEL 的细胞核约占图中总细胞核的 44%, 说明热激使绿熟期番茄果实细胞发生了 DNA 断裂现象。

3　结　语

植物 PCD 的发生具有其特有的典型特征, 比如 DNA 片断化, 染色质的皱缩、细胞色素 C 的释放及 caspase 激活。在研究 PCD 发生或调控时, 上述特征都是必不可少的, 但对于发育或胁迫诱导植物 PCD, 细胞或组织死亡率的测定和 DNA 片段化的发生能够最直观反映 PCD 的进程。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



(a) (b) (c)

a 为 TUNEL 染色。b 为DAPI染色。c 为明场视野观察。箭头指的是 TUNEL 阳性细胞核

图 5 45 ℃热激 20 min 后室温放置 6h 的番茄果实 DNA 片段化的 TUNEL 原位杂交

Fig. 5 In situ detection of DNA fragmentation by TUNEL analysis in tomato fruit at 6 h after treated at 45 ℃ for 20 min

作者对番茄果实电导率的测定方法进行了优化,并且对 TUNEL 原位杂交切片的方法进行了改进。通过电导率的测定检测细胞死亡的发生,以及用徒手切片的 TUNEL 原位杂交方法检测细胞 DNA 片段化的发生,发现在成熟衰老和 45 ℃热激胁迫的番茄果实中,均发生了细胞死亡现象和 DNA 的片段化。后续研究可以结合更多的细胞形态学检测和 caspase-like 酶活测定等多种方法,共同检测番茄果实 PCD 的发生,进行进一步深入研究。

参考文献(References):

[1] Qu G Q, Liu X, Zhang Y L, et al. Evidence for programmed cell death and activation of specific caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response[J]. **Planta,** 2009: 229, 1269-1279.

[2] Ellis R E, Yaun J, Horvitz H R. Mechanisms and functions of cell death[J]. **Annual Review of Cell Biology,** 1991, 7: 663-698.

[3] Lawen A. Apoptosis-an introduction[J]. **Bioessays,** 2003, 25: 888 896.

[4] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide[J]. **Science,** 1995, 267: 1445-1449.

[5] Danon A, Delorme V, Mailhac N, et al. Plant programmed cell death: a common way to die[J]. **Plant Physiology and Biochemistry,** 2000, 38: 647-655.

[6] Borochov A, Spiegelstein H, Philosoph-Hadas S. Ethylene and flower petal senescence: interrelationship with membrane lipid catabolism[J]. **Physiologia Plantarum,** 1997, 100: 606-612.

[7] Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, et al. Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death[J]. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** 1998, 11: 544-554.

[8] Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement[J]. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry,** 1998, 46: 327-334.

[9] Kawai-Yamada M, Ohori Y, and Uchimiya H. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax, Hydrogen Peroxide, and Salicylic Acid Induced Cell Death[J]. **The Plant Cell,** 2004, 16: 21-32.

[10] Vickery R S, Bruinsma J. Compartments and permeability for potassium in developing fruits of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)[J]. **Journal of Experimental Botany,** 1973, 24: 1261-1270.

[11] Simon E W. Leakage from fruit cells in water[J]. **Journal of Experimental Botany,** 1977, 28: 1147-1152.

[12] Balk J, Leaver C J, McCabe P F. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat induced programmed cell death in cucumber plants[J]. **FEBS Letters,** 1999, 463: 151-154.

[13] Vacca R A, Valenti D, Bobba A, et al. Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death[J]. **Plant Physiology,** 2006, 141: 208 219.

[14] Eason J R, Pinkney T T, Johnston J W. DNA fragmentation and nuclear degradation during harvest-induced senescence of asparagus spears[J]. **Postharvest Biology and Technology,** 2002, 26: 231-235.

[15] Beers E P, McDowell J M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmentalcues[J]. **Current Opinion in Plant Biology,** 2001, 4: 561-567.

[16] Kuriyama H, Fukuda H. Developmental programmed cell death in plants[J]. **Current Opinion in Plant Biology,** 2002, 5: 568-573.

[17] Thomas S G, Franklin-Tong V E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in papaver pollen[J]. **Nature,** 2004, 429: 305 309.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net