

# 苹果实生树阶段转变过程中 丝氨酸羟甲基转移酶的变化

曾广娟<sup>1,2</sup>, 张新忠<sup>3</sup>, 李春敏<sup>2\*</sup>

(1. 中国环境管理干部学院, 河北 秦皇岛 066004; 2. 河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600;  
3. 中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100193)

**摘要:** 用酶联免疫(ELISA)法和免疫组织化学方法(IHC)检测5年生苹果实生树不同节位的丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)的变化。结果表明,此酶只存在苹果实生树营养生长期的叶片中,而在童期的叶片和生殖生长期的叶片中含量极低或检测不到。SHMT在苹果实生树阶段转变过程中存在差异表达。

**关键词:** 苹果; 阶段转变; 丝氨酸羟甲基转移酶; 酶联免疫(ELISA); 免疫组织化学(IHC)

中图分类号: S661.103.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0254-04

## Changes of Serine Hydroxymethyltransferase during Phase Change in Apple (*Malus domestica* Borhk.)

ZENG Guang-juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xin-zhong<sup>3</sup>, LI Chun-min<sup>2\*</sup>

(1. Environmental Management College of China, Qinhuangdao 066004, China; 2. Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Science, Changli 066600, China; 3. Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Changes of serine hydroxy methyl transferase (SHMT) in leaves from different nodes of five-year-old apple seedlings were analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunocytochemistry (IHC) methods. The results showed that SHMT was only present in leaves of vegetative phase and was absent in the same organ of juvenile and reproductive phase.

**Key words:** *Malus domestica* Borhk.; phase change; SHMT; ELISA; IHC

丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase SHMT, E. C. 2. 1. 2. 1)普遍存在于真核生物中,在高等植物的一碳代谢和光呼吸中起着非常重要的作用。由于SHMT在植物中具有多种重要而又普遍的生理功能,因此关于SHMT的报道日益受到关注,目前大多数报道是SHMT基因的克隆和表达调控研究。但迄今为止,关于SHMT在实生树阶段转变过程中的变化尚未见报道。本试验主要是在前期工作的基础上即利用双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis 2-DE)技术对苹果实生树童期叶片(J)、成年营养生长期叶片(V)和生殖生长期叶片(R)蛋白质进行分离,发现2491号蛋白质点只在实生树营养生长期出现,而在童期和生殖生长期叶片中检测不到该种蛋白质,肽质量指纹图谱(PMF)分析该蛋白质点与SHMT(相对分子质量 Mr: 48.24 ku,等电点 pI: 9.01)相匹配。为验证SHMT在2-DE及质谱鉴定中结果的可靠性,本试验首先采用ELISA法检测SHMT在J、V、R 3个不同发育时期是否存在

收稿日期: 2010-12-21 修回日期: 2011-01-28

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2007000967, C2010221576)

作者简介: 曾广娟(1970—),女,副教授,博士,主要从事果树种质资源与遗传育种研究, E-mail: guangjuan\_z@163.com; \* 通讯作者: 李春敏,研究员, E-mail: li\_chunmin@126.com。

差异表达,之后再用 IHC 方法对 SHMT 进行节位定位,探讨光呼吸代谢途径在苹果实生树阶段转变过程中是否存在差异以及查看与 SDS - PAGE 结果的符合程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

选取5年生苹果杂种实生树(“红玉”×“金冠”)1株(株系号为:02-17-115)。2008年春季萌芽后每株实生树从根茎部选留基生萌蘖,从树干中部选留旺盛新梢。5月12日分别采集基生萌蘖、与基生萌蘖有部分节位重叠的树干中部旺盛新梢以及与树干中部旺盛新梢有部分节位重叠的树冠内新梢的叶片。用于ELISA检测的样品根据“苹果实生数阶段转变特异蛋白质的SDS-PAGE分析”<sup>[1]</sup>进行典型节位混样,即取童期(J)、营养生长期(V)和生殖生长期(R)3个样品,采集完毕迅速放入冰盒带回实验室,以液氮处理后装入保鲜袋中,置-40℃冰箱中保存。用于IHC检测的叶片,从根茎部开始,以每5节为一样品,将每个样品叶片切成方形,投入到多聚甲醛固定液中固定过夜,操作步骤为:取样—固定—脱水—透明—浸蜡—包埋—切片—展片<sup>[2]</sup>。

丝氨酸羟甲基转移酶多克隆抗体(第一抗体)购于Agriser( Sweden)公司;第二抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG。

### 1.2 酶联免疫方法(ELISA)

按照改良的Tris-HCl法<sup>[3]</sup>提取苹果J、V和R3个时期叶片蛋白质,用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐包被液稀释一抗(1:700),在40孔聚苯乙烯凹孔板中每反应孔加200 μL,37℃孵育3h→PBST(phosphate buffered solution with Tween-20)洗3次×3 min→加入蛋白质样品,先37℃孵育2h,后4℃冰箱过夜→PBST洗3次×3 min,加入HRP标记的二抗(1:500),37℃孵育2h→PBST洗3次×3 min→OPD显色(邻苯二胺,*o*-phenylenediamine),避光,室温30 min→终止反应(于各反应孔中加入4 mol/L硫酸40 μL)→结果判定(在酶标仪上测波长492 nm吸光度值)。以空白对照孔调零后测各孔OD值,阳性的判断标准为 $OD_{492nm}$ 值大于阴性对照值的2.1倍<sup>[4-5]</sup>。

### 1.3 免疫组织化学方法(IHC)

把切片经二甲苯脱蜡和水化→封闭通透液浸润切片30 min(RT避光)以封闭内源性过氧化物酶→PBS(phosphate buffered solution)溶液洗3次×3 min→滴入5%羊血清(与二抗来源一致)后放入湿盒中,室温30 min→一抗孵育(甩去切片上的羊血清,用滤纸擦干组织周围残留血清,直接加入已稀释的一抗(1:400)后,放入湿盒中室温1h,然后4℃过夜,从冰箱中取出需37℃复温45 min)→二抗孵育(将一抗甩掉并用PBS洗5 min×5次;用滤纸将周围的水吸去,加入已稀释的二抗后(1:700)室温孵育1h,用PBS洗5次×5 min)→DAB(3,3'-二氨基联苯胺,3,3'-diaminobenzidine)显色(快速滴入,染色时间7 min)→复染、脱水、透明、封片→切片观察,记录与拍照(在10×40倍显微镜下观察每张切片,用Olympus显微镜进行拍照)。首先观察阴性对照(第一抗体和第二抗体均加PBS缓冲液)与阳性对照(ELISA结果中阳性明显的样品),阴性对照样品DAB显色后呈现蓝色反应,阳性对照DAB显色后有抗原的部位呈现棕色至棕黑色反应。把待检样品与阴性对照和阳性对照进行比对,不含SHMT的记为“-”,含有SHMT的记为“+”。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果实生树J、V、R3个不同时期ELISA的检测结果

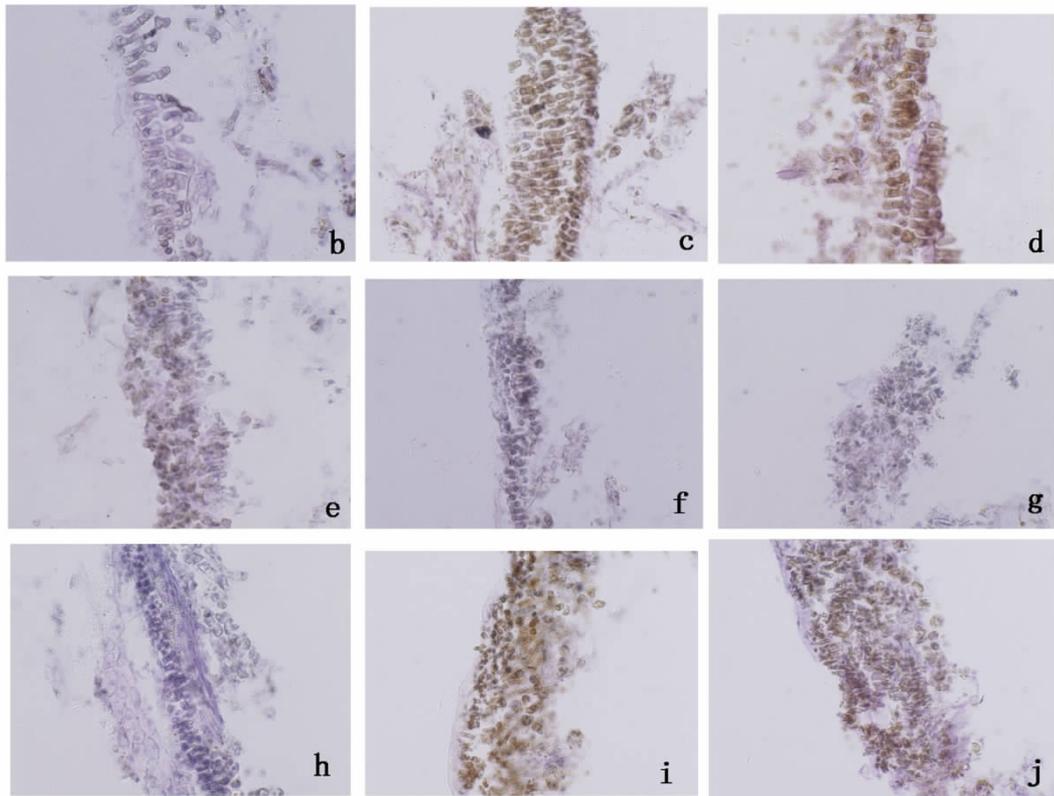
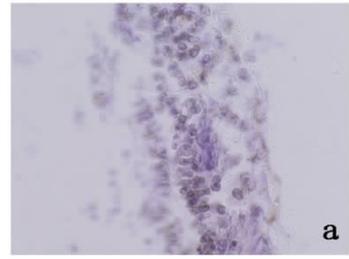
用清水调零,将实生树童期J叶片样品视为阴性对照,加入底物OPD 30 min避光显色,取J、V、R3个不同时期叶片样品进行ELISA检测,并以 $P/N$ 值(被测样品孔吸光度值与阴性对照孔吸光度平均值之比)判断阳性和阴性。其中, $P/N$ 值以2.10为临界值,即 $P/N > 2.10$ 时为阳性(+); $P/N < 2.10$ 时为阴性(-)。结果表明(表1), $VOD_{492nm}/JOD_{492nm} > 2.1$ , $ROD_{492nm}/JOD_{492nm} < 2.1$ ,因此认为实生树营养生长期叶片中含有SHMT,而生殖生长期叶片SHMT的含量极低或检测不到。

表1 ELISA 法检测 SHMT 的  $OD_{492nm}$  值  
Tab.1 Values of  $OD_{492nm}$  detected in ELISA of SHMT

实生树编号 No. seedlings	17-115-童期(阴性对照) 17-115-J(Negative control)	17-115-营养生长期 17-115-V	17-115-生殖生长期 17-115-R
$OD_{492nm}$	0.321 5	0.848 5	0.446 5
$P/N$		2.64	0.72
结果判定 Result determination	-	+	-

## 2.2 实生树不同节位中的免疫组化定位

利用 IHC 对 SHMT 在苹果叶片中的变化进行检测,结果显示 SHMT 在实生树叶片中开始出现的节位为 106—110 节,消失的节位为 126—130 节。在 106—121 节 SHMT 呈阳性反应;在其它节位均表现阴性反应,说明 106—121 节可能为苹果实生树生理状态的转折点(图 1,表 2)。



a,b: 实生树童期叶片,成阴性染色(400×);c,d: 实生树成年营养生长期叶片,成阳性染色(400×);e,f: 实生树生殖生长期叶片,成阴性染色(400×);g,h: 阴性对照(400×);i,j: 阳性对照(400×)。

a,b: Negative staining present in juvenile leaves (400×);c,d: Positive staining present in vegetative leaves (400×);e,f: Negative staining present in reproductive leaves (400×);g,h: Negative control; i,j: Positive control.

图1 实生树叶片不同发育时期的 SHMT 变化

Fig.1 Changes of SHMT in apple seedlings

## 3 讨论

SDS-PAGE<sup>[1]</sup> 结果表明,02-17-115 实生树特异蛋白质出现的节位在 71—75 节,消失的节位在 121—125 节;ELISA 和 IHC 结果表明,SHMT 出现的节位在 106—110 节,消失的节位在 126—130 节。但是,SDS-PAGE 只是说明有特异蛋白质的存在,ELISA 说明 SHMT 在 J、V、R 3 个发育阶段表达量存在差异,IHC 把上述差异定位在具体节位了,这是一个逐步深入研究的过程。

表2 实生树不同节位的 SHMT 免疫组化定位

Tab.2 Immunohistochemistry of SHMT in apple seedlings

节位 Node	丝氨酸羟甲基转移酶 SHMT	节位 Node	丝氨酸羟甲基转移酶 SHMT	节位 Node	丝氨酸羟甲基转移酶 SHMT
6—10	-	61—65	-	106—110	+
16—20	-	66—70	-	111—115	+
26—30	-	71—75	-	116—120	+
31—35	-	76—80	-	121—125	+
36—40	-	81—85	-	126—130	-
41—45	-	86—90	-	131—135	-
46—50	-	91—95	-	136—140	-
51—55	-	96—100	-	141—145	-
56—60	-	101—105	-	146—150	-

阳性反应记为“+”,阴性反应记为“-”。

Positive reaction signed “+”,negative reaction signed “-”.

ELISA 和 IHC 证明 SHMT 的 2-DE 和质谱鉴定结果为阳性,光呼吸代谢途径在苹果实生树阶段转变过程中存在显著差异。上述研究结果进一步证明 J、V、R 3 个发育阶段在代谢特点上是有明显不同的,这与 Zhang 等<sup>[6]</sup>指出苹果实生树个体发育过程中童期、成年营养生长期和生殖生长期分别出现多酚的变化及随着节位升高,苹果实生树叶片、芽和韧皮部中内源细胞分裂素含量有明显变化<sup>[7]</sup>的研究结果一致,证明阶段转变与成花是两个相互独立的过程。

高等植物阶段转变过程存在着特异蛋白质的变化,许多植物上曾发现童期特异蛋白质。如巨杉 (*Sequoiadendron giganteum*) 童期组织中有一种与膜相关的蛋白质 J16,相对分子质量为 16 ku,在成龄期组织中却检测不到该相对分子质量蛋白质<sup>[8]</sup>。相反,有些植物上存在成龄期特异蛋白质。板栗成龄区枝条组培苗中有 38 ku 和 43.6 ku 的 2 条特异蛋白质带,童期枝条的组培苗中没有检测到<sup>[9]</sup>。另一些植物既检测到了童期特异蛋白质,又检测到了成龄期特异蛋白质。Hackett 等<sup>[10]</sup>在洋常春藤 (*Hedera helix*) 童期叶柄中鉴定出了相对分子质量 25 ku、等电点 PI 9 的特异性多肽,而在成龄期叶柄中检测到相对分子质量 28 ku、等电点 PI 5.3 的专一性多肽。在北美红杉 (*Sequoia sempervirens*) 中发现磷酸化的 32 ku 蛋白质仅在成熟期出现,而在童期的细胞中却检测到了被磷酸化的相对分子质量为 31 ku 的特异蛋白质<sup>[11]</sup>。还有许多植物中虽未能检测到与童期、生殖生长期相关的特异蛋白质的定性差异,但检测到了某些蛋白质含量的变化。Besford 等<sup>[12]</sup>在甜樱桃 (*Prunus avium*) 童期茎尖上发现过量表达的 12 ku 蛋白质。而 Hand 等<sup>[13]</sup>在甜樱桃上发现 28 ku 的多肽在童期茎尖含量丰富。在柑桔成龄组织中多量表达的是 59.7 ku 的蛋白质<sup>[14]</sup>。Garcia 等<sup>[15]</sup>在橄榄 (*Olea europaea*) 上发现 29 ku 的多肽在童期叶片组织中多量表达,而 35 ku 蛋白质在成龄组织中高量表达。Huang 等<sup>[16]</sup>在北美红杉的童期组织中发现 36, 44, 46 ku 蛋白质大量表达,29 ku 蛋白质含量较少,成龄期组织中含有更多量的 34 ku 蛋白质。由此可见,前人研究与阶段转变相关的特异蛋白质时,通用的方法是分别取某实生单株童期、成龄期样品进行比较,寻找差异蛋白质,结果比较的只是 J 和 R 之间的差异,象本次试验中只在 V 期出现的差异本来检测不到,结果却检测到了。

#### 参考文献:

- [1] 曾广娟,李春敏,张新忠,等. 苹果实生树阶段转变特异蛋白质的 SDS-PAGE 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 129-134.
- [2] 李晓梅. 大豆茎顶端分生组织石蜡切片的制备[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 708-710.
- [3] 曾广娟,李春敏,张新忠,等. 适于 SDS-PAGE 分析的苹果叶片蛋白质提取方法[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 75-78.
- [4] 李巧云,张志刚,成文华,等. 利用 ELISA 方法鉴定大白菜 TuMV 抗性[J]. 科技导报, 2009, 27(1): 42-45.
- [5] 柳爱春,刘超,赵芸,等. 浙江省兰花两种主要病毒病原调查和分析[J]. 杭州农业科技, 2008(6): 26-28.

- [13] 谭永, 梁宗锁, 董娟娥, 等. 水分胁迫对不同产地板蓝根幼苗抗氧化酶活性和根系活力的影响 [J]. 华北农学报, 2006, 21(5): 20 - 23.
- [14] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutase [J]. Plant Physiol, 1993, 101(157): 7 - 11.
- [15] 周瑞莲, 张承烈, 金巨和. 干旱胁迫下紫花苜蓿叶片含水量、质膜透性 SOD、CAT 活性变化与抗旱性关系研究 [J]. 中国草地, 1991, 4(2): 20 - 24.
- [16] Perez Molphe Baleh E, Gidekel M, Segura Niet M, et al. Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different levels of drought tolerance [J]. Physiol Plant, 1996, 96(102): 284 - 290.
- [17] 尚国亮. 柔枝松不同种源抗旱性及适应性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [18] 刘卓. 不同苜蓿品种耐盐性、抗旱性比较的研究 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2008.
- [19] 焦树英, 李永强, 沙依拉. 沙尔合提, 等. 干旱胁迫对 3 种狼尾草种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 308 - 313.
- [20] 刘遵春, 陈荣江, 包东娥. 干旱胁迫对金光杏梅叶片渗透调节物质和光合作用的影响 [J]. 华北农学报, 2007, 23(1): 119 - 122.
- [21] 郑国琦, 谢亚军. 干旱胁迫对宁夏枸杞幼苗膜脂过氧化及抗氧化保护酶活性的影响 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1343 - 1344, 1552.

(上接第 257 页)

- [6] Zhang X Z, Zhao Y B, Li C M, et al. Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*) [J]. J Plant Physiol, 2007, 164: 574 - 580.
- [7] Zhang X Z, Zhao Y B, Wang G P, et al. Dynamics of endogenous cytokinins during phase change in *Malus domestica* Borkh. [C]. Proc 27<sup>th</sup> Inter Congre Hort Sci Seoul, Korea, 2006, 8: 12 - 19.
- [8] Bon M C. An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum* [J]. Tree Physiol, 1988, 4(4): 381 - 387.
- [9] Amo - Marco J B, Vidal N, Vieitez A M, et al. Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut [J]. J Plant Physiol, 1993, 142: 117 - 119.
- [10] Hackett W P, Murray J, Woo H. Cellular biochemical and molecular analysis of maturation related characteristics in *Hedera helix* [M]. Ahyja M R. Woody Plant Biotechnology. New York: Plenum Press, 1991: 77 - 81.
- [11] Kuo J L, Huang H J, Cheng C M, et al. Rejuvenation in vitro: Modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens* [J]. J Plant Physiol, 1995, 146: 333 - 336.
- [12] Besford R T, Hand P, Peppitt S D, et al. Phase change in *Prunus avium*: Differences between juvenile and mature shoots identified by 2 - dimensional protein separation and *in vitro* translation of mRNA [J]. J Plant Physiol, 1996, 147: 534 - 538.
- [13] Hand P, Besford R T, Richardson C W, et al. Antibodies to phase related proteins in juvenile and mature *Prunus avium* [J]. Plant Growth Regulation, 1996, 20: 25 - 29.
- [14] Snowball A M, Zeman A M, Tchan Y T, et al. Phase change in citrus: Immunologically detectable differences between juvenile and mature plants [J]. Aust J Plant Physiol, 1991, 18: 385 - 396.
- [15] Garcia J L, Avidan N, Troncoso A, et al. Possible juvenile - related proteins in olive tree tissues [J]. Sci Hort, 2000, 85: 271 - 284.
- [16] Huang L C, Pu S Y, Murashige T, et al. Phase - and age - related differences in protein tyrosine phosphorylation in *Sequoia sempervirens* [J]. Biol Plant, 2003, 47(4): 601 - 603.