

甘蔗和烟草幼叶原生质体的核酸含量 与核酸酶活性及其影响因素^{*}

何若天 覃 伟

(广西农业大学实验中心, 南宁 530005)

摘 要 与幼叶组织相比, 酶法新鲜分离的甘蔗和烟草幼叶原生质体内的 RNA、DNA 及总核酸含量均降低。其原因可能是刚游离的原生质体内酸性和碱性 RNA 酶与 DNA 酶等活性提高所致。甘蔗叶原生质体内的核酸降低量和 RNA 酶与 DNA 酶活性的增加程度均高于烟草。

随用作渗透压稳定剂的甘露醇浓度增加, 甘蔗和烟草叶原生质体的 RNA 酶和 DNA 酶活性均相应提高。其中以甘蔗叶原生质体的核酸酶活性增加水平较明显。在细胞壁降解产物的作用下, 除了甘蔗原生质体内的 RNA 酶活性略被促进外, 其 DNA 酶和烟草叶原生质体内的核酸酶均不受影响。

关键词 核酸含量; RNA 酶; DNA 酶; 原生质体; 甘蔗; 烟草

NUCLEIC ACID CONTENT AND NUCLEASE ACTIVITY IN YOUNG LEAF AND ITS PROTOPLAST OF SUGARCANE AND TOBACCO

He Ruotian Qin Wei

(Research Centre, Guangxi Agricultural University, Nanning 530005)

Abstract As compared with the tissue of young leaf, the contents of RNA, DNA and total nucleic acid in freshly isolated protoplasts from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) young leaves by using cell wall degrading enzymes were all decreased, resulting probably from the obviously increased activities of RNAase and DNAase in protoplast of both species. The level of nucleic acid decreased and activities of both nucleases increased are markedly greater in sugarcane leaf protoplast than in tobacco one.

The activities of both nucleases in leaf protoplasts of both species are correspondingly increased with an increase of the concentration of mannitol used as osmoticum, and the level of activities of both nucleases increased are greater in sugarcane leaf protoplast than in tobacco one in that case. Except that the activity of RNAase in sugarcane leaf protoplast was promoted, the activity of DNAase in it and the activities of both nucleases in tobacco leaf protoplast were not influenced by the cell wall degradation products.

Key words Nucleic acid content; RNAase; DNAase; protoplast; sugarcane; tobacco

1996-04-18 收稿

第一作者简介: 何若天, 男, 1935 年出生, 教授 从事植物生理学和植物细胞工程研究工作。

* 国家自然科学基金资助课题

用细胞壁降解酶分离甘蔗和烟草等幼叶原生质体的过程中, 细胞内超氧自由基(O_2^-)、膜脂过氧化产物丙二醛等不断增加, 说明其膜系受到损害^[1]; 甘蔗幼叶细胞的呼吸活力亦受到影响, 并发现细胞壁降解产物(CWDP)是导致呼吸活力下降的主要因素^[2]。本文仅就酶解分离原生质体对细胞核酸含量、核酸酶活性及其某些影响因素作了比较研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与原生质体分离

取栽培甘蔗(*Saccharum officinarum*, 粤糖 57/423)、野生蔗斑茅(*S. arundinaceum* Retz)距茎尖约 6 cm 内呈卷筒状的 2~3 片浅黄色幼叶和烟草(*Nicotiana tabacum* NC89)全伸展幼叶。均纵切为两等份。其中一份作为原供体组织, 另一份供原生质体分离用。

分离原生质体所用酶液为 1.5% 纤维素酶(Onozuka R10)、0.5% 果胶酶(Serva)和 0.5 mol/L (不同浓度处理试验则按指定浓度)甘露醇所组成(pH5.6)。甘蔗原生质体用漂浮法纯化, 烟草原生质体用离心—洗涤法纯化。

1.2 测定方法

1.2.1 核酸含量 DNA、RNA 和总核酸含量按朱治平法^[3]测定。

1.2.2 RNA 酶和 DNA 酶提取与活性 RNA 酶的提取按 Kaur—Sawhney 等法^[4]稍加修改。分别将含有 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个甘蔗叶原生质体/mL 和 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个烟草叶原生质体/mL 的 0.5 mol/L 甘露醇悬浮液在 $80 \times g$ 下离心 10 min。在沉淀物中加入 4 mL 预冷的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(含 5% PVP, pH6.0)。冰冻 1 h 后, 冰浴上匀浆。 $12\,000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min。上清液用作粗酶液。供体幼叶组织 RNA 酶按同法提取。RNA 酶活性测定按 Arad 等法^[5]稍加修改。反应系统为 1 mL 2 mg/mL 的 RNA、0.5 mL 酶液和 0.5 mL pH4.5 或 7.5 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲液。混匀后, 吸取 0.5 mL 混合液加 0.5 mL 含 0.75% 醋酸双氧铀的 25% 高氯酸, 置冰箱中沉淀。余下反应液置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 30 min 后按上法处理。均于 $12\,000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min。分别吸取 0.5 mL 上清液用重蒸馏水稀释至 2 mL。测 OD_{260} 值。以每小时 OD_{260} 上升 0.1 为 1 个酶活性单位(U)。

DNA 酶提取同 RNA 酶。反应系统中除含 0.5 mg/mL 的 DNA 外, 其余同 RNA 酶的。活性测定按 Kunitz 法^[6]测 OD_{260} 值。以每小时 OD_{260} 上升 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。以上各项测定均重复 3 次以上。

1.2.3 CWDP 按前文^[2]方法提制。

1.2.4 酶蛋白含量 按 Bradford 法^[7]测定, 以 BSA 为标准蛋白。

2 结果与讨论

2.1 核酸含量与核酸酶活性

与甘蔗和烟草幼叶组织相比, 它们经酶法新鲜分离的原生质体的核酸含量均明显降低(表 1)。其中甘蔗和野生蔗叶原生质体的 RNA 含量分别约降低 21% 和 49%, 烟草叶原生质体的只减少 11% 左右。甘蔗和野生蔗叶原生质体的 DNA 含量均降低 16% 左右, 而烟草叶原生质体的约减少 10%。可见, 栽培甘蔗和野生蔗叶原生质体的总核酸含量减少最多, 烟草的降低最少。再观其核酸酶活性(表 2)可见, 新鲜分离的甘蔗叶原生质体内酸性和碱性 RNA 酶活性分别为其供体组织的 6.7 和 3.8 倍; 烟草叶原生质体的仅为其供体组织的 2 倍左右。甘蔗叶原生质体的酸性和碱性 DNA 酶活性分别为其供体组织的 1.9 和 8.2 倍, 烟草叶原生质体的则分别为其供体组织的 1.2 和 1.1 倍。据此, 酶法分离的原生质体内 RNA 和 DNA 含量的减少, 很可能与其 RNA 酶和 DNA 酶活性明显增强有关。

表 1 甘蔗和烟草幼叶及其原生质体的核酸含量

Table 1 The nucleic acid content in young leaf and its freshly isolated protoplasts of sugarcane and tobacco

供试植物 Plant		含量 Content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)		
		RNA	DNA	总核酸 Total nucleic acid
甘蔗 Sugarcane	原生质体 Protoplast	339.64±19.9	69.21±1.8	408.85±12.6
	幼叶 Young leaf	375.72±12.7	82.77±0.7	458.49±12.9
斑茅 Reedlike Sweetcane	原生质体 Protoplast	257.78±96.8	115.26±11.2	373.04±86.3
	幼叶 Young leaf	503.85±17.7	138.05±12.6	641.91±19.8
烟草 Tobacco	原生质体 Protoplast	398.56±27.8	53.98±31.5	452.54±59.2
	幼叶 Young leaf	562.03±61.1	60.30±20.9	622.33±82.3

表 2 甘蔗和烟草幼叶及其原生质体核酸酶活性

Table 2 The nuclease activity in young leaf and its freshly isolated protoplasts of sugarcane and tobacco

反应系统 Reaction system pH		酶活性 Activity of enzyme ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}\text{protein}$)					
		甘蔗 Sugarcane		斑茅 Reedlike Sweetcane		烟草 Tobacco	
		幼叶 Young leaf	原生质体 Protoplast	幼叶 Young leaf	原生质体 Protoplast	幼叶 Young leaf	原生质体 Protoplast
RNA ase	4.5	47.19±12.31	318.25±69.43	39.33±11.53	209.78±32.31	20.31±8.50	40.00±11.24
	7.5	64.10±9.73	246.18±73.25	43.72±8.42	187.64±43.22	0.97±0.08	1.71±0.32
DNA ase	4.5	3.29±1.05	6.19±1.38	2.85±0.74	4.03±0.26	2.12±0.65	2.50±0.60
	7.5	2.76±0.54	12.54±4.07	2.37±0.63	6.67±0.16	7.88±0.93	8.83±1.27

2.2 影响核酸酶活性的某些因素

为了了解细胞壁酶促降解过程中那些因素引起细胞内核酸酶活性增强, 测定了酶液中作为渗透压稳定剂的甘露醇浓度和细胞壁降解产物对核酸酶活性的影响。随甘露醇浓度增加, RNA 酶和 DNA 酶活性均有不同程度的提高(图 1)。其中以甘蔗叶原生质体的核酸酶活性增加较明显。

我们曾见 CWDP 能明显降低甘蔗幼叶原生质体的呼吸活力及钝化有关呼吸酶活性^[2]。但在本试验中,随 CWDP 浓度增加,除了甘蔗叶原生质体的 RNA 酶活性略有提高外,其 DNA 酶和烟草的 RNA 酶与 DNA 酶活性均不受影响(表 3)。因此, Premecz 等^[8]认为介质中的渗透压是诱导游离原生质体内 RNA 酶水平大幅度提高的主要因素的看法与本试验结果一致。

3 小结

鉴于在原生质体培养中,甘蔗幼叶原生质体的细胞分裂能力极差,远比不上烟草叶原生质体的那么容易(未发表资料)。其原因除了与酶法分离原生质体期间,与烟草的相比,甘蔗的细胞膜受损较为严重^[1]和呼吸活力为 CWDP 等毒性因子影响较大^[2]外,与本研究所见酶法新鲜分离的甘蔗幼叶原生质体内核酸含量的减少和核酸酶活性的增强均明显高于烟草幼叶原生质体的亦是个重要因素。

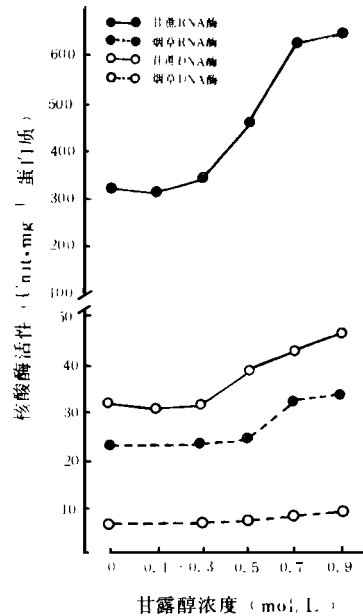


图 1 细胞壁降解酶溶液中甘露醇浓度对甘蔗和烟草幼叶原生质体内核酸酶活性的影响

Fig. 1 The effect of mannitol at different concentrations in cell wall degrading enzymes mixture on the activities of RNAase and DNAase in young leaf protoplasts of sugarcane and tobacco

表 3 CWDP 对甘蔗和烟草叶原生质体核酸酶活性的影响

Table 3 The effect of cell wall degradation products (CWDP) on the nuclease activity in isolated protoplasts of sugarcane and tobacco

细胞壁降解产物浓度 CWDP ¹⁾ Conc. ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	酶活性 Activity of enzyme ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)			
	甘蔗 Sugarcane		烟草 Tobacco	
	RNAase	DNase	RNAase	DNase
0	270.32 ± 12.41	26.40 ± 3.70	24.32 ± 6.31	7.54 ± 1.23
100	275.45 ± 15.20	28.65 ± 4.23	25.17 ± 5.42	7.60 ± 2.06
300	253.62 ± 18.65	27.53 ± 2.81	24.68 ± 0.96	8.31 ± 1.75
500	307.86 ± 26.78	26.21 ± 2.54	26.37 ± 7.23	7.42 ± 2.52
700	367.86 ± 46.34	29.33 ± 0.79	28.92 ± 3.05	7.83 ± 4.05
900	385.37 ± 39.52	28.06 ± 1.47	25.26 ± 2.84	8.25 ± 1.78

1) CWDP 中约含 7.8% DW 低聚糖。The content of oligosaccharide in CWDP is about 7.8% DW.

参 考 文 献

- 1 何若天, 覃 伟, 李任强. 甘蔗和烟草叶原生质体分离期间的膜损伤及有关酶活性变化. 植物生理学报, 1994, 20 (1): 100~104
- 2 何若天, 覃 伟. 甘蔗幼叶原生质体分离过程中呼吸的变化及其影响因素. 植物生理学报, 1995, 21 (1): 80~86
- 3 朱治平. 植物组织中核酸含量的测定. 见薛应龙, 夏镇澳编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 44~46
- 4 Kaur—Sawhney R, Altman A, Galston A W. Dual mechanisms in polyamine— mediated control of ribonuclease activity in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol*, 1978, 62: 158~160
- 5 Arad S(M), Mizrahi Y, Richmond A E. Leaf water content and hormone effects on ribonuclease activity. *Plant Physiol*, 1973, 52: 510~512
- 6 Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease II. Digestion of thymus nucleic acid (desoxy ribonucleic acid) The kinetics of the reaction. *J Gen Physiol*, 1950, 33: 363~377
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of p.rotein— dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 8 Premecz G, Oláh T, Gulyás A, Nyitrai A, Pálfi G, Farkas G L. Is the increase in ribonuclease level in isolated tobacco protoplasts due to osmotic stress? *Plant Sci Lett*, 1977, 9: 195~200

1990年以来《广西植物》来稿由以下专家审阅, 在此公布,

以表示衷心的感谢。

王文采	王伏雄	王道本	王献溥	尤其傲	韦发南	韦裕宗	邓聚龙	孔宪需
毛宗铮	方 鼎	文和群	叶创兴	刘兰芳	刘玉壶	成桂仁	吕鹏程	孙谷畴
孙恢鸿	朱维明	李 恒	李正理	李林初	李治基	李光照	李启任	李树刚
李秉滔	李锡文	李瑞高	李朝奎	苏宗明	吴七根	吴兆洪	吴德邻	陈 介
陈 平	陈守良	陈育新	陈祖铿	陈泽濂	陈维伦	陈瑞阳	张宏达	张永田
张其德	陆益新	陆玲娣	何天相	何若天	余孟兰	应俊生	应建浙	汤彦承
谷粹芝	林 荣	周广泉	周厚高	罗迪光	罗献瑞	罗紫娟	金代钩	邹琦丽
郎楷永	胡志昂	胡适宜	胡启明	胡琳贞	胡嘉琪	郝秉中	娄成后	耿伯介
徐克学	徐炳声	徐位坤	钱南芬	郭俊彦	梁畴芬	梁健英	高 谦	傅立国
傅坤俊	黄成就	黄少甫	黄正福	黄燮才	黄淑美	谢艺林	曾孟潜	喻诚鸿
黎向东	路安民	蓝永珍	蓝福生	蔡灿星	潘开玉	戴伦凯		

广西植物编辑部