DOI:10.19789/j.1004-9398.2016.01.009

组氨酸(L-Histidine)对小麦根尖细胞生长和畸变的影响*

张恰然[1] 苏慧卿[2] 黄 臣[1] 张飞雄[2]**

(1. 北京市陈经纶中学,北京 100020; 2. 首都师范大学生命科学学院,北京 100048)

摘 要

以普通小麦为材料,用不同浓度组氨酸(L-Histidine)处理萌发的种子 24h,采用形态学、细胞生物学、分子生物学等研究方法探究 L-Histidine 对小麦根尖的影响. 结果显示,经过 L-Histidine 处理,小麦根尖生长受到抑制,细胞分裂指数下降,出现染色体畸变、基因组 DNA 序列改变、*rdr* 基因的表达下调等. 表明 L-Histidine 处理使细胞分裂被阻断在 G1-S 转换期,DNA 合成受阻并导致其序列和染色体结构被破坏,最终抑制小麦根的生长.

关键词: L-Histidine,根端分生细胞,细胞周期,染色体畸变,小麦.

中图分类号: Q253

0 引 言

组氨酸(L-Histidine)是一种碱性氨基酸,是组成人体蛋白质的 21 种氨基酸之一[1]. 早期人们认为,组氨酸可由普通的中间代谢产物合成,因此一直被认为是人体的非必需氨基酸,但是随着研究的深入,人们发现幼龄动物和婴儿体内的组氨酸合成量不能满足机体生长需要,即使是成年动物,若不从食物中补充,体内合成的也不能满足需要,所以目前的普遍共识是组氨酸为人体和动物的半必需氨基酸[2],在人体生长、组织修复过程中起着重要作用,可用于治疗溃疡、胃酸过多、过敏、风湿性关节炎、贫血等[3].

组氨酸在基因表达调控中的重要性逐渐被确认. 作为一个磷酸化组氨酸保守残基的信号传导酶家族,组氨酸蛋白激酶(Histidine protein kinases, HPK)在原核生物及真核生物体内的信号传导、基因表达调控等方面都有重要作用,也是目前研究较多的一种蛋白激酶[4].

尽管如此,迄今有关组氨酸对植物生长发育、细胞周期调控及其机理方面的研究很少[5]. 本文以普通小麦为材料,用 L-Histidine 处理萌发的种子,从形态学、细胞生物学、分子生物学等多个层面,深入探讨它与植物细胞周期调控及其相关的机制. 所获得的结果对于进一步认识组氨酸新的生物学功能,了解它在调节生物生长发育和分化中的作用特点等都具有重要的理论意义和实际应用前景.

收稿日期: 2015-05-14

* 北京青少年科技创新学院第七期"翱翔计划"资助项目.

** 通讯作者

1 材料和方法

1.1 实验材料的培养及其处理

本实验使用的普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种 CB037-A,由本学院晏月明教授提供. 挑选大小相同、籽粒饱满的种子浸泡于蒸馏水中吸水约 1 h 后,转入铺有润湿滤纸的培养皿中,于 23 ℃避光培养萌发. 待种子露白时,将萌发的种子用不同浓度(4 mM、8 mM、12 mM、16 mM)的 L-Histidine 溶液整体浸泡,每个处理组随机选取 15 粒种子. 30 min 后,转移到铺有相应浓度 L-Histidine 浸湿滤纸的培养皿中,于 23 ℃恒温培养箱中避光处理 24 h,对照组用蒸馏水处理. 处理后测量主根的长度.

1.2 细胞有丝分裂及畸变的观察

切取处理后的根尖,立即用卡诺固定液(乙醇:冰醋酸 = 3:1)固定,充分水洗后室温解离(解离液,95% 乙醇:浓盐酸 = 1:1)6 min,充分水洗后用改良苯酚品红染色 10 min,常规压片,Leica D2500 型显微镜下观察.

1.3 DNA 的提取和 RAPD 分析

切取小麦根尖,按照康为世纪公司的植物基因

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组 DNA 提取试剂盒(CW0553)说明书的要求提取基因组 DNA. 产物保存于 -20 ℃备用.

从 RAPD 随机引物库中挑选 10 对引物进行 PCR 扩增,反应体系:10 × PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 2 μL,dNTP 混合液 0.2 mM,Taq 酶 1 U,随机引物 20 pmol,DNA 模板 10 ng,用 Milli Q 水补齐至 20 μL. 反应程序:94 ℃预变性 5 min,再以 94 ℃ 变性 1 min、36 ℃ 退火 1 min、72 ℃延伸 2 min,循环 40 次,最后以 72 ℃ 再延伸 10 min.

1.4 RNA 的提取及 RT-PCR

称取新鲜的小麦根尖分生区 0.2 g,快速加入液氮研磨至白色粉末状并转移至离心管中,以 Trizol (Invitrogen) 分离纯化 RNA;用 Fermentas 公司提供的反转录试剂盒进行反转录. 具体反应体系和操作参照说明书进行. 产物于 -80 ℃保存备用.

PCR 反应体系与上述 RAPD 的类似. 扩增程序:核糖核苷酸还原酶小亚基基因(*rdr*)扩增 30 个循环,退火温度 53℃;肌动蛋白基因(*Actin* 2)扩增 38 个循环,退火温度 60 ℃.

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 Bio-Rad 公司的电泳成像系统检测拍照.

1.5 数据、图片处理与统计学分析

实验研究至少重复 3 次,应用 GraphPad Prism5 和 SPSS 软件进行绘图、采用 ANOVA 和 LSD 法进行差异显著性分析. 图片经 Photoshop CS2 软件作适当处理.

2 结果与分析

2.1 不同浓度 L-Histidine 对小麦根长的影响

分别用 0、4 mM、8 mM、12 mM 和 16 mM 的 L-Histidine 处理露白的小麦种子 24 h 后,对根的生长状况进行观察,结果见图 1. 根的长度测量和统计分析结果见图 2.

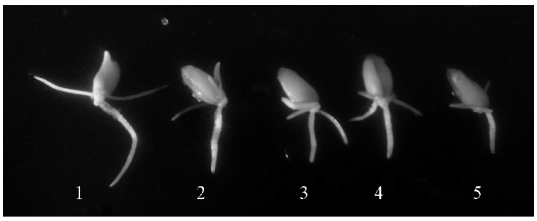


图 1 不同浓度 L-Histidine 处理 24 h 后小麦根的生长情况
1 ~ 5 表示 L-Histidine 的浓度分别为 0,4,8,12 和 16 mM.

从图 1 可以看出,L-Histidine 处理的小麦根的生长受到抑制. 图 2 为根长的统计结果,经 4 mM、8 mM、12 mM L-Histidine 处理的小麦根长缩短,但与对照相比,无显著性差异($p > 0.05$);当L-Histidine浓度为 16 mM 时,小麦根长与对照相比有显著性差异($p < 0.05$),小麦根的生长受到明显抑制.

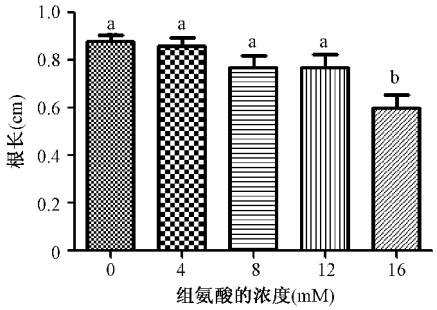


图 2 不同浓度 L-Histidine 处理 24 h 后小麦根长的统计

2.2 不同浓度 L-Histidine 对小麦根尖分生细胞有丝分裂的影响

经过固定、解离、染色和压片,在显微镜下观察不同浓度 L-Histidine 处理的小麦根尖分生细胞,并统计有丝分裂指数,每个浓度随机统计 1 000 个左右的细胞,结果见图 3.

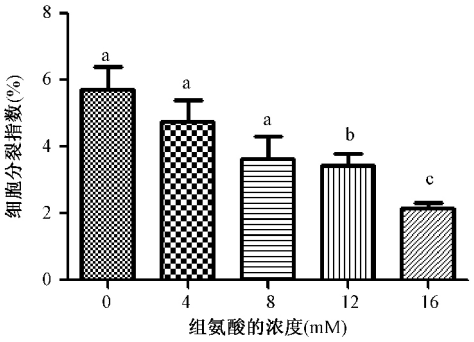


图 3 不同浓度 L-Histidine 处理 24h 后小麦根端分生细胞分裂指数

图 3 显示,随着 L-Histidine 浓度增加,小麦根尖分生细胞分裂指数逐渐下降,当浓度为 12 mM 时,与对照相比有显著性差异($p < 0.05$).

在显微镜下观察经 L-Histidine 处理后的分生组织细胞,可以看到细胞有丝分裂出现一系列不正常现象(图 4). 如微核(图 4 A,三角箭头所示)、染色体断片(图 4 B,短箭头所示)、染色体桥(图 4 B、C 和 D,细箭头所示)以及染色体滞后(图 4 C 和 D,宽箭头所示)等. 结果显示,L-Histidine 处理引起分生组织细胞发生染色体畸变.

2.3 16 mM L-Histidine 处理 24h 后小麦根尖分生细胞基因组 DNA 序列的变化

为了充分认识 L-Histidine 处理引起小麦根尖分

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

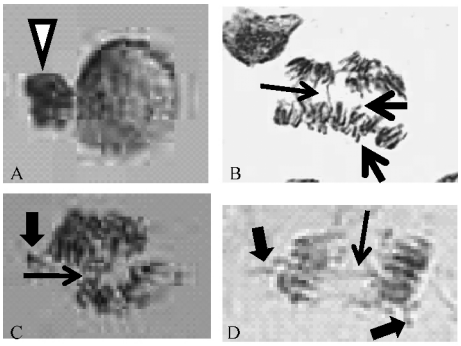


图 4　L-Histidine 处理导致小麦根尖分生细胞畸变图，放大倍数: 1000
三角箭头、短箭头、细箭头和宽键头分别表示微核、染色体断片、染色体桥和染色体滞后

生细胞染色体畸变的机理，本研究从 RAPD 随机引物库中挑选 10 对引物，应用 RAPD 对基因组 DNA 序列进行了分析. 图 5 为引物 S 126 (序列 5′-CCCGGCATAA-3′) 的扩增结果，与对照(C) 相比，处理组(T) 多出一个条带(图 5，箭头所示) ，表明小麦基因组序列发生了改变.

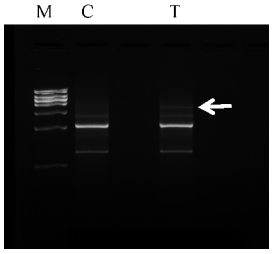


图 5　L-Histidine 处理的小麦根尖细胞基因组 DNA 的 RAPD 电泳图谱
M: marker; C: 对照组; T: 对照组; 箭头表示处理组多出一条带

2.4　16 mM L-Histidine 处理 24h 对小麦根尖分生细胞周期调控的影响

为了探讨 L-Histidine 处理抑制小麦根尖分生细胞周期的时间点，以肌动蛋白基因(*Actin* 2) 为内参基因，用半定量 PCR 技术测定了核糖核苷酸还原酶小亚基基因(*rdr*) 的表达，结果见图 6. 很显然，同对照相比，处理组中 *rdr* 基因的表达显著下调.

3　讨　论

作为一种半必需氨基酸，L-Histidine 对于人及动物的成长发育至关重要[2]. 同时它还被作为药物用于一些疾病的治疗[3]. 细胞信号传导过程中重要

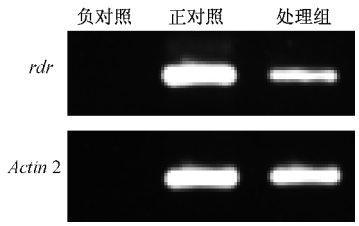


图 6　半定量-PCR 分析 L-Histidine 处理的小麦根端分生组织细胞中 *rdr* 基因表达

激酶之一的组氨酸蛋白激酶在基因表达调控中也发挥着独特的作用[4].

然而迄今为止，有关组氨酸在植物的生长发育中发挥什么样的作用，其机制如何等尚无详尽的报道.

本研究以普通小麦为材料，用不同浓度的 L-Histidine 处理萌发的种子 24 h 后，根的生长受到抑制，细胞分裂指数也相应下降，其抑制作用与 L-Histidine 的浓度有关. 在细胞分裂的间期和有丝分裂期，能观察到微核、染色体桥、染色体断片和染色体滞后等各种变异类型. 这些结果表明外源一定浓度的 L-Histidine 处理不仅能抑制植物根的生长，还能诱发植物细胞产生畸变.

为了从分子水平上充分认识产生上述现象的原因，本文应用 RAPD 技术[6] 对经过 16mM L-Histidine 处理的根分生组织细胞进行基因组 DNA 的随机引物扩增，通过与对照组比较发现，处理组基因组 DNA 多出了扩增条带. 由于该技术是在 PCR 基础上建立的一种对整个基因组进行多态性分析的分子技术，扩增条带的差异预示着基因组 DNA 序列出现变化[6]，因此我们认为 L-Histidine 处理能导致小麦根尖细胞基因组 DNA 发生改变.

核糖核苷酸还原酶小亚基对于 DNA 的合成极为重要，它被认为是细胞周期 G1-S 转换的一种标志物[7]. 本研究采用 RT-PCR 分析证实，经 L-Histidine 处理后，核糖核苷酸还原酶小亚基基因 *rdr* 的表达显著下调，表明 L-Histidine 处理的细胞周期难以有效完成 G1 期向 S 期的转换，DNA 的合成受阻.

根据上述研究结果，我们认为，L-Histidine 处理能阻止小麦细胞分裂进入 S 期，DNA 的复制无法完成，从而导致基因组 DNA 序列发生改变，进而引起染色体畸变，这也就是小麦根尖生长受到抑制的主要原因之一.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参 考 文 献

[1] 陆春燕,李增礼,周乐春,等. 高效液相色谱法检测重组人干扰素 α 2b 注射液中组氨酸含量[J]. 中国生物制品学杂志,2014,27(10):1338-1341.

[2] 李燕,艾庆辉,麦康森,等. 鲈鱼对组氨酸需求量的研究[J]. 中国海洋大学学报,2011,41(3):31-36.

[3] 陈青山,张伟国. L-组氨酸产生菌的选育及其特性的初步研究[J]. 微生物学通报,2007,34(2):228-231.

[4] Loomis W F, Shaulsky G, Wang N. Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes[J]. Journal of Cell Science, 1997, 110(Pt 10): 1141-1145.

[5] 李友勇,刘金枝,陈利. 离体小麦胚胎对 10 种必需氨基酸的生长反应[J]. 生物技术,2004,14(5):84-85.

[6] 杜民,牛宝珍,刘艳红,等. 2 个鲤鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):47-49.

[7] Pena L B, Barcia R A, Azpilicueta C E, et al. Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings[J]. Plant Science, 2012, 196: 1-7.

The Effects of L-Histidine on the Growth and Aberration in Root-tip Meristematic Cells of *Triticum aestivum* L.

Zhang Qiaran[1] Su Huiqing[2] Huang Chen[1] Zhang Feixiong[2]

(1. Beijing Chenjinglun Middle School, Beijing 100020; 2. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract

Germinated common wheat seeds were treated with different concentrations of L-Histidine for 24h to understand the statue of root growth, mitotic index, chromosome aberrations, changes in DNA sequence and *rdr* gene expression. After the treatment, it was shown that the root growth was inhibited along with the mitotic index was decreased. Chromosomal aberrations, changes of genomic DNA sequence were also indicated and the expression of *rdr* gene was down-regulated. Our results demonstrate, for the first time, that L-Histidine can block the cell division during the G1-S transition so that DNA synthesis is inhibited, DNA sequence and chromosome structure are damaged and at last, the root growth is inhibited.

Key words: L-Histidine, root tip meristematic cells, cell cycle, chromosome aberration, wheat.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net