

热预处理诱导京秀葡萄果实低温耐性与小分子热激蛋白 sHsp17.6 合成的关系

张俊环^{1, 2}, 黄卫东¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

摘要:以京秀葡萄果实为试材,研究了 38℃/10 h 热预处理诱导葡萄果实对 -2℃ 低温产生适应性反应过程中小分子热激蛋白 sHsp17.6 的合成变化。结果表明,热预处理明显减缓了低温引起的电解质渗漏率的增加,同时在转录和翻译两种水平上增强了 sHsp17.6 的表达。因此认为,sHsp17.6 参与了热预处理所诱导的葡萄果实的低温耐性。

关键词:葡萄;热预处理;低温耐性;sHsp17.6

中图分类号:S663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2006)02-0001-04

Improvement of Chilling Tolerance and Accumulation of Small Heat Shock Proteins (sHsp17.6) in Grape Berry by Heat-pretreatment

ZHANG Jun-huan^{1, 2}, HUANG Wei-dong¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: The grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) were pretreated for 10 hours in air either at 38 °C (as heat-pretreatment) or at 25 °C (as control) and then transferred to -2 °C. After the chilling stress for 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hour, respectively, the treated samples were used in the present work. The results showed that compared with the control without heat pretreatment, the membrane permeability was decreased in the heat-pretreated berries under chilling stress. Meanwhile, heat pretreatment could induce the expression of sHsp17.6 at a transcription and translation levels. Therefore, we suggested that the synthesis and accumulation of sHsp17.6 was involved in the heat pretreatment-induced chilling-tolerance.

Key words: Chilling; Grape berry; Heat pretreatment; sHsp17.6

低温贮藏一直是采后贮藏保鲜的主要手段,而大多在夏秋高温季节成熟采收的冷敏型果蔬却容易发生贮藏冷害,直接影响其商品品质,造成很大经济损失。作为一种新颖的采后处理技术,果蔬贮前热处理可保持草莓^[1]、梨^[2]、桃^[3]等果实品质,降低柑橘贮藏期病害的发生程度^[4],减轻番茄低温贮藏时的冷害^[5],从而延长贮藏期。这也是植物对逆境具有交叉适应^[6]能力的表现。并有研究表明,热处理可以诱导芒果^[7]、柚子^[8]、黄瓜^[9]等果蔬产生抗冷

性。但迄今为止,人们对植物产生这种交叉适应的机制仍不太清楚。葡萄是一种不耐冷藏的水果,热处理在葡萄冷藏方面的研究还鲜见报道。并且,我们以前的研究表明,热预处理可保持葡萄果皮细胞结构在短时期零下低温条件下的稳定性,同时可诱导 Hsp70 的合成^[10],那么作为与温度逆境密切相关的小分子热激蛋白是否会对热预处理的葡萄果实在短时期低温条件做出积极的响应呢?本研究通过研究经热预处理的葡萄果实细胞中 sHsp17.6 蛋白在

收稿日期:2005-12-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270918;30471192)

作者简介:张俊环(1974-),女,山东人,博士,主要从事果树逆境的细胞与分子生物学机制研究;黄卫东为通讯作者。

-2℃低温下表达水平的变化,来进一步探讨热激蛋白家族在热预处理诱导的交叉适应性形成过程中的作用,并为贮前热处理的应用和果实采后的合理保鲜提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试材为2003年7月28日从中国科学院植物研究所葡萄园采摘的京秀葡萄(*Vitis vinifera* cv. Jingxi-u),可溶性固形物含量为14.7%。

1.2 热预处理和低温处理

选择外观色泽一致的京秀葡萄果穗,分别装入塑料果筐中,外衬0.015 mm厚的PE保鲜袋。试验设2组处理:一组为热预处理组,即将材料放进培养箱在38℃下热处理10 h,之后在27℃室温条件下恢复1 h,转入-2℃冰柜中进行低温处理不同时间;另一组为对照组,即放在27℃培养箱中13 h后再转入-2℃冰柜中进行低温处理,相对湿度为90%~95%,处理后立即取一部分果实的果肉进行电导率测定,其余果实去皮去核后用液氮速冻果肉部分,-80℃冰箱中保存,用于生理生化指标的测定。重复3次。每个重复有12~15 kg果实,分14袋装。

1.3 果实圆片的mRNA转录抑制剂和蛋白质合成抑制剂处理

参照Berutert等^[11]的方法。将可溶性固形物含量为14.7%的京秀葡萄果实去皮后分割成1 mm厚的圆片,在基础温育液(50 mmol/L Mes, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 抗坏血酸, 5 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 200 mmol/L 甘露醇, pH 6.5)中平衡30 min后,分别取20 g的果实圆片,放入60 mL含有100 μmol/L的环己亚胺和10 μg/mL放线菌素D的温育液中,在摇床上振荡温育(25℃)0.5 h,之后分为2组,一组继续在25℃的水浴摇床上,另一组转入38℃水浴摇床上,温育1 h和3 h,之后用ddH₂O洗涤圆片,滤纸吸干水分,液氮速冻,用于热激蛋白的分析。每个处理设3个重复。

1.4 细胞膜透性的测定方法

细胞膜透性测定用相对电导率法^[12]。切取1 mm厚的果实圆片(直径0.5 cm),置三角瓶中,分别用蒸馏水和重蒸水洗2次,用滤纸吸干水分,准确称取1.5 g果实圆片于25 mL试管中,加入15 mL重蒸水,在200 mmHg下抽气10 min,振荡5 min后,在25℃下保温5 min,用DDS-11C型电导仪测C₁,加热

煮沸10 min后迅速冷却,再测C₂,C₁/C₂的值即为相对电导率。测定设3次重复。

1.5 热激蛋白的提取与Western-blot分析

蛋白质提取:参照Knight^[13]的方法,稍做修改。准确称取果肉3 g在液氮中研磨,加入5 mL提取缓冲液(150 mmol/L Tris-HCl (pH 8.9), 2% SDS, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 抗坏血酸, 2 mmol/L EDTA-Na₂, 1 mmol/L PMSF, 0.2% (v/v) β-巯基乙醇和2% (w/v) PVPP),匀浆于4℃下10 000 g离心25 min,取上清液。

蛋白浓度的测定按Bradford的方法^[14]。

SDS-PAGE和Western-blot分析:按照Laemmli^[15]的方法,采用Bio-Rad Mini电泳系统(Bio-Rad, Richmond California, USA),进行SDS-PAGE,分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为4%,每孔蛋白上样量为10 μg。参照文献[13]的方法,将SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的多肽转移至硝酸纤维素膜上(0.45 μm,购自Amersham LIFE SCIENCE),转移后的膜经TBS溶液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl)洗涤后,浸入封闭液(TBS + 0.05% (v/v) Tween 20 + 1% (v/v) BSA, pH 7.5),于室温下轻微振荡封闭2 h。去除封闭液,加入用封闭液稀释的拟南芥sHsp17.6一抗(由亚利桑那大学Vierling教授惠赠)反应液,置摇床上轻摇3 h,使抗原抗体发生免疫反应。TBST1(TBS + 0.05% (v/v) Tween 20)洗膜3次后(每次10 min),加入用TBST1以1:1000稀释的二抗(碱磷酶标记的山羊抗兔血清)反应液,室温孵育反应1 h。经TBST2[50 mmol/L Tris-HCl + 150 mmol/L NaCl + 0.1% (v/v) Tween 20]洗膜3次后(每次10 min),加入10 mL BCIP/NBT底物反应液,置暗处显色,显色充分后用蒸馏水终止反应。

2 结果与分析

2.1 热预处理对葡萄果实细胞质膜透性的影响

由图1可以看出,在短于12 h的低温处理条件下,经热预处理的葡萄果肉细胞相对电导率较低,与对照相比差异不显著。随着低温处理时间延长,细胞相对电导率都有不同程度的增加,低温处理48 h时,对照细胞的相对电导率已超过50%,说明此时细胞膜已受到了不可逆的伤害,但经热预处理的葡萄果肉细胞直到低温72 h时相对电导率才达48.6%。以上结果表明,-2℃低温可使果肉细胞的细胞膜受到了一定的伤害,但热预处理可明显减轻

低温的这种伤害作用。

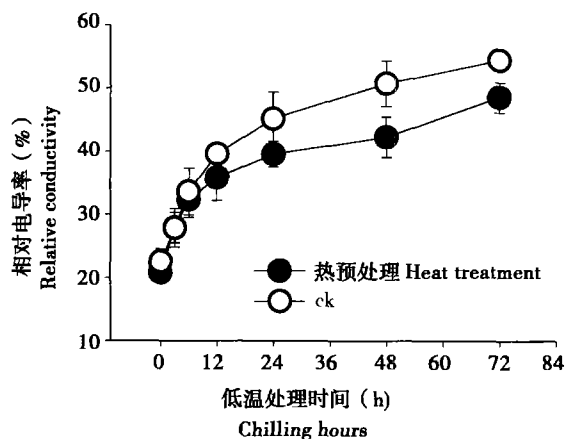


图1 热预处理对低温条件下的葡萄果实细胞电解质外渗率的影响

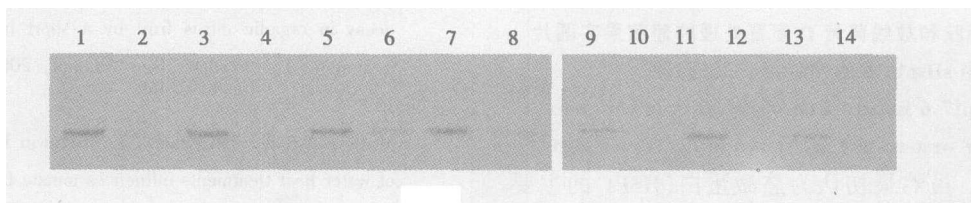
Fig.1 Changes in the relative conductivity in grape berries under chilling stress

2.2 热预处理对葡萄果实细胞 sHsp17.6 合成的影响

用拟南芥 sHsp17.6 抗体在热预处理的果实细胞蛋白质的 SDS-PAGE 电泳带上,特异地识别出一

条分子量约为 17.6 kDa 的多肽,而在对照果肉细胞中没能检测到免疫信号。在低温处理的整个进程中,对照果肉细胞中都几乎检测不到 sHsp17.6 的免疫信号,只是在低温处理的 6, 12, 24 h 时方可隐约看到有极微弱的信号带,低温时间延长到 48 h 时便又完全检测不到了。经过热预处理的果实,在低温处理期间的免疫信号比胁迫前有所减弱,但仍一直相对较强(图 2)。

由图 3 Western-blot 分析结果更清楚地看到,常温 25℃ 条件下,在各处理的葡萄果肉细胞中都没能检测到 sHsp17.6 的免疫信号(图 3a)。在 38℃ 热处理 1 和 3 h 时,经蛋白质合成抑制剂环己亚胺和 mRNA 转录抑制剂放线菌素 D 处理的果实圆片细胞中,也没有 sHsp17.6 的特异信号,只有从基础温育液处理的果实圆片中提取的蛋白所在的泳道,才检测到一条微弱的信号带。蛋白质合成抑制剂处理和 mRNA 转录抑制剂处理间无明显差异(图 3b)。这些结果清楚地表明 sHsp17.6 是热诱导表达的热激蛋白,并且它的合成可在 mRNA 转录和蛋白质翻译水平上被热预处理所调控。



1,3,5,7,9,11,13 泳道中的蛋白分别来自于热预处理果实低温下处理 0,3,6,12,24,48,72 h 的果实;2,4,6,8,10,12,14 泳道蛋白分别来自于对应的对照处理。SDS-PAGE 电泳的每孔蛋白上样量均为 10 μ g。Western 印迹所用的抗体为抗拟南芥 sHsp17.6 的抗体 The protein samples in Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 were extracted from Heat-pretreated berries under chilling stress for 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. Correspondingly, the protein samples in Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 were extracted from control berries under chilling stress for 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. Equal amounts of protein (10 μ g) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Thereafter, the membrane was incubated with Arabidopsis anti-Hsp17.6 antibody and then treated as described in Section 1.5

图2 低温处理过程中果肉细胞中 sHsp17.6 的 Western blot 图谱

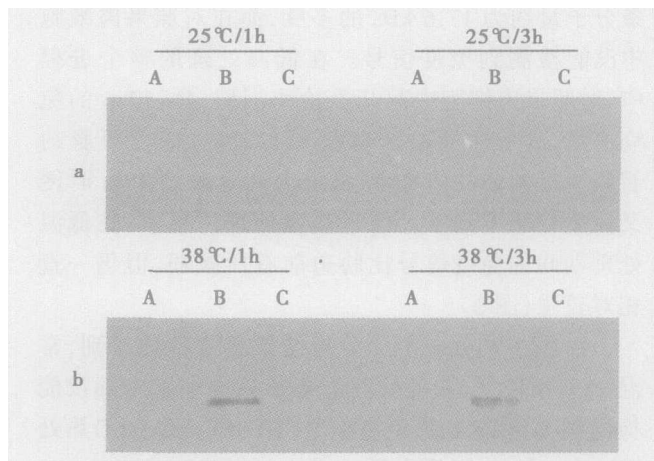
Fig.2 The expression of sHsp17.6 protein from grape berries with different treatment is shown by western-blot

3 讨论

植物受低温伤害时首先是质膜结构遭到破坏,而电解质外渗率是反应细胞膜受到伤害程度的直接指标之一^[16]。葡萄果实处于 -2℃ 低温下 3 h,电解质外渗率已增加 12.1% (图 1),而热预处理可以延缓低温条件下细胞膜渗透率的增加,减轻由于低温所造成的膜伤害,维持膜的稳定性,从而增强果实对低温的适应能力。已有研究表明,对番茄果实进行热处理,可减轻其在随后低温处理时的细胞电解质泄漏^[17]。Wang 等^[18]也得到了类似的结果,38℃ 预处理 1 h,可保护悬浮培养的苹果细胞膜在低温下的伤

害。

我们以前的研究表明,热预处理诱导的葡萄果实的低温耐性可能与果实细胞中热激蛋白 Hsp70 的诱导合成有关,本研究进一步表明,这种耐低温性也与小分子热激蛋白 sHsp 的诱导合成有关。一般认为,热激蛋白是一类在有机体受到温和的热刺激后大量表达的蛋白。近年来的研究表明,诸多生物(如病害)与非生物(如高温、低温、高盐浓度、厌氧、重金属离子、营养匮乏、ABA 等)因素都可诱导热激蛋白的产生^[6]。大部分热激蛋白包括 sHsps 都具有分子伴侣(molecular chaperones)功能^[19],主要参与生物体内新生肽的运输、折叠、组装、定位以及变性蛋白的



泳道 A 的蛋白来自于 100 $\mu\text{mol/L}$ 的环己亚胺处理的圆片,泳道 B 的蛋白来自于基础温育液处理的果肉圆片,泳道 C 的蛋白来自于 10 $\mu\text{g/mL}$ 放线菌素 D 处理的圆片。SDS-PAGE 电泳的每孔蛋白上样量均为 10 μg 。Western 印迹所用的抗体为拟南芥抗 Hsp17.6 的抗体 Lane A, incubated in solution with 100 $\mu\text{mol/L}$ CHX; The protein samples in Lane B in the figures were extracted from berry discs incubated in equilibrium buffer solution; Lane C, incubated in solution with 10 $\mu\text{g/mL}$ Actidione D. Equal amounts of protein (10 μg) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Thereafter, the membrane was incubated with Arabidopsis anti-Hsp17.6 antibody and then treated as described in Section 1.5

图 3 环己亚胺和放线菌素 D 温育处理的葡萄果实圆片中 sHsp17.6 的 Western blot 图谱

Fig.3 sHsp17.6 isolated from berry discs *in vivo* were analyzed by western-blot are shown in figures a and b

复性和降解。虽然最初认为热激蛋白(HSPs)的主要功能是提高植物的耐热性^[20, 21],但越来越多的研究证实 HSPs 与植物耐冷性的提高存在明显相关^[22, 23]。Collins 等人^[24]首先证实了 HSPs 和耐冷性的直接关系。热激(40℃, 3 h)诱导绿豆下胚轴 Hsp70 和 Hsp79 从头合成,减轻随后的冷胁迫(2.5℃)对膜的损伤,使电解质渗漏减少,增强了组织的抗冷性;但热激处理时加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的环己亚胺(蛋白质合成抑制剂)可抵消热处理的效应。这说明,热激处理降低膜透性,提高组织抗冷性,与热激诱导蛋白质合成有关。本研究首次在葡萄果实上得到了类似的结果。38℃热空气处理葡萄果实可诱导产生 sHsp17.6(图 2),并且 sHsp17.6 的表达量与葡萄果肉细胞的相对电导率的变化呈相反的趋势,也就是与葡萄果实的逆境适应性相一致。并且,从时间上来看,先是 sHsp17.6 表达水平的增加,之后才有膜相对电导率的相对减少。因此认为, sHsp17.6 在热预处理诱导的葡萄果实对 -2℃低温的交叉适应性过程中起着重要的调节或是保护作用。热激蛋白可能是与膜保护酶一起作用,保护细

胞膜及各细胞器结构免受低温伤害^[10],从而最终实现增强果实细胞适应低温的能力。

用蛋白质合成抑制剂环己亚胺和 mRNA 转录抑制剂放线菌素 D 温育葡萄果实圆片的试验结果表明,热预处理对 sHsp17.6 的诱导合成被这两种抑制剂所抑制(图 3),进一步表明热预处理能够诱导葡萄果实细胞合成热激蛋白,并且是在 mRNA 转录和翻译水平上被调节。

参考文献:

- [1] Vicente A R, Martinez G A, Civello P M, *et al.* Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage [J]. *Postharv Biol Technol*, 2002, 25: 59 - 71.
- [2] Abreu M, Beirao-da-Costa S, Goncalves E M, *et al.* Use of mild heat pre-treatments for quality retention of fresh-cut Rocha 'pear' [J]. *Postharv Biol Technol*, 2003, 30: 153 - 160.
- [3] Zhou T, Xu S, Sun D W, *et al.* Effects of heat treatment on postharvest quality of peaches [J]. *J Food Engin*, 2002, 54: 17 - 22.
- [4] Porat R, Daus A, Cohen B, *et al.* Reduction in postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment [J]. *Postharv Biol Technol*, 2000 a, 18: 151 - 157.
- [5] McDonald R E, McCollum T G, Baldwin E A. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low-temperature storage [J]. *Postharv Biol Technol*, 2000, 16: 147 - 155.
- [6] Wang W X, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218: 1 - 14.
- [7] 朱世江,季作梁,张昭其,等. 热处理提高芒果抗冷性与蛋白质含量变化的关系[J]. *园艺学报*, 2003, 30 (2): 198 - 200.
- [8] Porat R, Pavoncello D, Peretz J. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit [J]. *Postharv Biol Technol*, 2000 b, 18: 159 - 165.
- [9] 乔勇进,冯双庆,赵玉梅. 热处理对黄瓜贮藏冷害及生理生化的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8 (1): 71 - 74.
- [10] Zhang J H, Huang W D, Pan Q H, *et al.* Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berry by heat-pretreatment [J]. *Postharv Biol Technol*, 2005, 38(1): 80 - 90.
- [11] Beruter J, Studer F M E. Comparison of sorbitol transport in

- excised tissue discs and cortex tissue of intact apple fruit [J]. *J Plant Physiol*, 1995, 146: 95 – 102.
- [12] Vieira Santos C L, Campos A, Azevedo H, *et al.* In situ and *in vitro* senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52 (355): 351 – 360.
- [13] Knight C A, Ackerly D D. Small heat shock protein responses of a closely related pair of desert and coastal encelia [J]. *Int J Plant Sci*, 2003, 164 (1): 53 – 60.
- [14] Bradford N M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Annal Biochem*, 1976, 72: 248 – 259.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680 – 685.
- [16] Price A H, Hendry G A F. Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals [J]. *Plant, Cell and Enviro*, 1991, 14: 451 – 477.
- [17] Saltveit M E. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat shocks applied after chilling [J]. *Postharv Biol Technol*, 2001, 21: 169 – 177.
- [18] Wang C Y, Bowen J H, Weir I E, *et al.* Heat-induced protection against death of suspension-cultured apple fruit Cell exposed to low temperature [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2001, 24: 1199 – 1207.
- [19] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381: 571 – 580.
- [20] Queitsch C, Hong S W, Vierling E, *et al.* Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis [J]. *Plant cell*, 2000, 12 (4): 479 – 472.
- [21] Rouch J M, Bingham S E, Sommerfeld M R. Protein expression during heat stress in thermo-intolerance and thermo-tolerance diatoms [J]. *J Exp Marine Biol and Ecol*, 2004, 306: 231 – 243.
- [22] Uikaji N, Kuwabara C, Takezawa D, *et al.* Accumulation of small heat-shock homology in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cell in mulberry in association with seasonal cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120: 481 – 489.
- [23] Yang K A, Lim C J, Hong J K, *et al.* Identification of Chinese cabbage genes up-regulated by prolonged cold by using microarray analysis [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 959 – 966.
- [24] Collins G G, Nie, X L, Saltveit M E. Heat shock proteins and chilling sensitivity of mung bean hypocotyls [J]. *J Exp Bot*, 1995, 46 (288): 795 – 802.