

doi:10.7668/hbxb.2014.S1.038

四种树木端粒酶活性与树龄及叶位的相关性

张徐俞¹, 王瑾瑜², 郑广顺³, 张俊琦¹, 卢存福¹

(1. 北京林业大学 生物学院, 分析测试中心, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083;

2. 清华大学分析测试中心, 北京 100084; 3. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093)

摘要:为探究端粒酶活性与树龄以及叶位是否存在一定的关系,应用 TRAP 法对不同年龄的油松、银杏、楸树、国槐叶片及油松和银杏同一棵树不同叶位的叶片进行端粒酶活性的测定。结果表明,油松端粒酶活性同树龄无明确的相关性,而楸树、国槐的端粒酶活性随着树龄增加而表现为增加的趋势。端粒酶活性与叶位相关,越靠近顶端的叶片端粒酶活性较高,而靠近下端的叶片端粒酶活性较低。

关键词:树龄;端粒;端粒酶;叶位

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)增刊-0197-05

Analysis of Age- and Leaf Position-associated Telomerase Activity in Four Tree Species

ZHANG Xu-yu¹, WANG Jin-yu², ZHENG Guang-shun³, ZHANG Jun-qi¹, LU Cun-fu¹

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Analysis and Testing Center, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Analysis and Testing Center, Tsinghua University, Beijing 100083, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: The aim of this study was to determine the variation of telomerase during the life-span and with sampling position of leaves in different tree species. Therefore, TRAP assay was used to determine telomerase activity in *Pinus tabulaeformis*, *Ginkgo biloba*, *Catalpa bungei* C. A. Mey, and *Sophora japonica* Linn. The results showed that no significant difference of telomerase activity was found among different ages of trees. But the higher telomerase activities were found in the top position leaves of *Pinus tabulaeformis* and *Ginkgo biloba*. The effect of leaf position on the telomerase activity in *Pinus tabulaeformis* and *Ginkgo biloba* was strong and significant. This is the first observation on such a position-related variation in telomerase activity.

Key words: Tree age; Telomere; Telomerase; Leaf position

端粒是真核生物染色体末端的一种特殊结构,对维持染色体稳定起着重要的作用^[1-2]。在正常细胞中,由于 DNA 聚合酶功能障碍无法完全复制它们的染色体,细胞每有丝分裂一次,就有一段端粒序列丢失,当端粒长度缩短到一定程度,会使细胞停止分裂,导致细胞的衰老与死亡。端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白体,属于逆转录酶,它可以利用自身的 RNA 序列为模板,在端粒酶逆转录酶的作用下,合成端粒 DNA,维持端粒长度。因此,端

粒酶可以通过维持端粒长度的功能间接对细胞的衰老起着延缓的作用。关于端粒、端粒酶与衰老之间的关系多见于动物细胞中的研究。大量试验证明,端粒长度、端粒酶活性与衰老有着密切的关系,其中 Bodnar 等^[3]的研究为端粒及端粒酶与衰老存在密切联系提供了最有力的证据。其研究表明,如果在端粒酶缺乏的细胞中激活端粒酶活性,可以维持端粒长度,增加细胞寿命,甚至使细胞永生生化;相反,通过抑制端粒酶活性,则可迫使永生生化细胞转化为正

收稿日期:2014-10-17

基金项目:高等学校学科创新引智计划资助项目(B13007);长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT13047);北京市教委共建项目(No. 101009);北京市公园管理中心课题项目(No. 0710016);北京市自然科学基金项目(No. 6112016)

作者简介:张徐俞(1990-),女,浙江衢州人,在读硕士,主要从事植物端粒、端粒酶的研究。

通讯作者:卢存福(1966-),男,北京海淀人,教授,博士,主要从事植物分子细胞生物学研究。

常细胞,出现衰老、死亡的现象。在植物中也存在同样的现象,Killan^[4]发现,成熟大麦叶片中的端粒长度较幼胚短,检测两者的端粒酶活性,发现幼胚中端粒酶活性高,而在成熟叶片中几乎检测不到端粒酶活性,由此可以说明端粒酶活性在植物的生长发育和衰老中起着一定的作用。

植物在发育过程中,端粒酶活性在幼胚最高,随着胚的发育成长,端粒酶活性逐渐下降^[5]。对大麦胚芽和心皮的检测显示只有在花芽顶端有端粒酶活性。但在大麦的叶片中却检测不到端粒酶活性^[6]。在大豆中也存在类似的结果,在大豆的营养器官(包括叶、茎、苗端)中基本检测不到端粒酶活性,在根尖、种子中能检测到端粒酶活性^[7]。

有关植物端粒和端粒酶的研究大部分集中在模式植物及草本植物^[8],对于树木年龄与端粒酶关系的研究仅有少量报道^[9]。Flanary 等^[10]发现狐尾松(*Pinus longaeva*)端粒酶活性随树龄从低到高的变

化无明显的规律,即表现为上下浮动。而 Liu 等^[11]对银杏(*Ginkgo biloba*)研究结果表明,端粒长度随树龄增加而增加,而端粒酶活性随树龄(10~700年)增加呈下降的趋势^[12]。本研究选择油松、银杏、楸树、国槐4个树种为研究对象,通过对不同树种及不同树龄的叶片和同一棵树不同部位的叶片进行端粒酶活性的测定,确定端粒酶活性与树龄和叶位的关系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

用于检测端粒酶活性和树龄的关系,取材情况如下:树木年龄确定是根据颐和园管理处和北京林业大学绿化科提供的数据,其他取样地点所选树种树龄的确定依据文献资料;不同叶位的选择是同一棵树上从主干基部到顶端(表1)。

表1 试验所用树种及取样地点

Tab.1 Materials used for studying telomerase activity

植物材料 Plants	树龄 Age group	取材时间及地点 Sampling time and sites
油松 <i>Pinus tabulaeformis</i>	500 ± 50	8月取自北京颐和园
	250 ± 30	8月取自北京颐和园
	20 ± 5	8月取自北京林业大学
	5 ± 2	8月取自北京林业大学
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	700 ± 30	8月取自北京市玉泉路
	100 ± 10	8月取自北京林业大学
	50 ± 5	8月取自北京林业大学
	10 ± 3	8月取自北京林业大学
楸树 <i>Catalpa bungei</i> C. A. Mey	400 ± 50	8月取自北京市广化寺
	200 ± 30	8月取自北京市颐和园
	40 ± 10	8月取自北京市广化寺
	10 ± 4	8月取自北京市颐和园
国槐 <i>Sophora japonica</i> Linn	400 ± 50	8月取自北京植物园
	100 ± 10	8月取自北京植物园
	20 ± 5	8月取自北京林业大学
	1	8月取自实验室栽种

1.2 试验方法

1.2.1 树木叶片端粒酶蛋白提取 参照 Kim 等^[13]的 TRAP 方法,并且在裂解细胞离心后,在上清中加 10% (w/V) PEG 8000^[14]。

1.2.2 TRAP 法测定端粒酶活性 引物设计:先导引物 TS 5'-GACAATCCGTCGAGCAGAGTT-3', 21 bp, 反向引物 RP 5'-CCCTAAACCCTAAACCCTAAA-3', 21 bp。

PCR 反应:PCR 反应体系为 50 μL, 36 μL DEPC H₂O, TRAP Buffer 5 μL, 1 μL 10 nmol/L dNTP mixture, 1 μL 引物, 5 μL Telomerase extract。端粒延伸

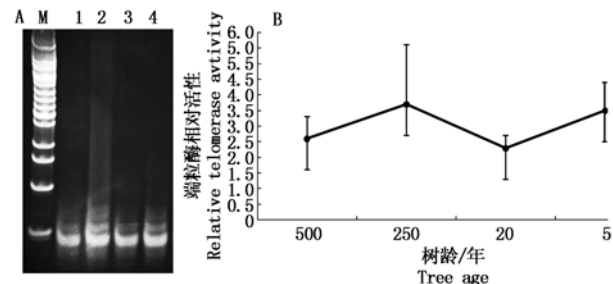
26 ℃, 45 min; 然后 94 ℃ 预变性 2 min; 再加入 RP 1.6 μL, *Taq* 酶 0.4 μL。采用三步反应法: 94 ℃ 45 s, 48 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s 5 个循环; 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 60 s, 72 ℃ 70 s 5 个循环; 94 ℃ 45 s, 56 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s 27 个循环; 最后 72 ℃ 10 min 平衡。其中模板浓度为 100 ng。

PAGE-SYBR Green I 检测: 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶。取出凝胶放入 1 × SYBR Green I 中染色 30 min, 用双蒸水清洗凝胶, 然后于凝胶成像仪下观察。Quantity one 软件进行半定量测定、统计。

2 结果与分析

2.1 不同树龄树木端粒酶活性

2.1.1 不同树龄油松端粒酶活性 图1表明,树龄为500年的油松相对端粒酶活性为2.59,树龄为250年的油松相对端粒酶活性为3.67,树龄为20年的油松相对端粒酶活性为2.31,树龄为5年的油松相对端粒酶活性为3.54。从检测结果看,油松树龄和端粒酶活性没有明确的统计学上的相关性。



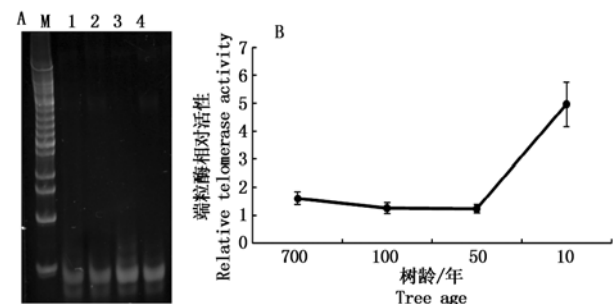
A: 1~4. 树龄为500, 250, 20, 5年的油松端粒酶活性变化; B: 4个不同树龄油松相对端粒酶活性的统计图。

A: 1~4. Indicate the telomerase activity in leaves of 5-to 500-year-old *Pinus tabulaeformis*, respectively; B: Relative telomerase activity in leaves of 5-to 500-year-old *Pinus tabulaeformis*.

图1 不同树龄油松端粒酶活性

Fig. 1 Leaf telomerase activity of *Pinus tabulaeformis* trees at different ages

2.1.2 不同树龄银杏端粒酶活性 树龄为700年的银杏相对端粒酶活性为1.61,树龄为100年的银杏相对端粒酶活性为1.26,树龄为50年的银杏相对端粒酶活性为1.23,树龄为10年的银杏相对端粒酶活性为4.96(图2),10年左右的幼树端粒酶活性明显高于其他树龄的。



A: M. DNA Marker DL-50; 1~4. 树龄700, 100, 50, 10年的银杏端粒酶活性; B: 4个不同树龄的银杏相对端粒酶活性的统计图。

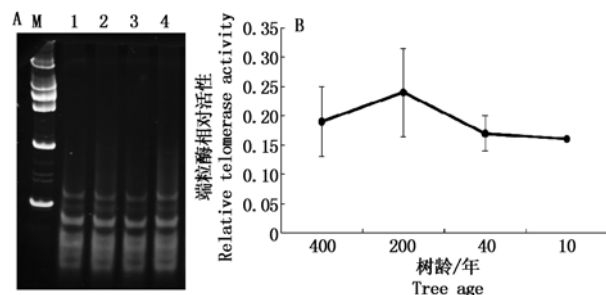
A: M. DNA Marker DL-50; 1~4. Indicate the telomerase activity in leaves of 10-to 700-year-old *Ginkgo biloba*, respectively; B: Relative telomerase activity in leaves of 10-to 700-year-old *Ginkgo biloba*.

图2 不同树龄银杏端粒酶活性的变化

Fig. 2 Leaf telomerase activity of *Ginkgo biloba* trees at different ages

2.1.3 不同树龄楸树端粒酶活性 图3表明,树龄为400年的楸树相对端粒酶活性为0.19,树龄为200年的楸树相对端粒酶活性为0.24,树龄为40年的楸树相对端粒酶活性为0.17,树龄为10年的楸

树相对端粒酶活性为0.16。总的趋势是,随树龄增加,端粒酶活性增加。



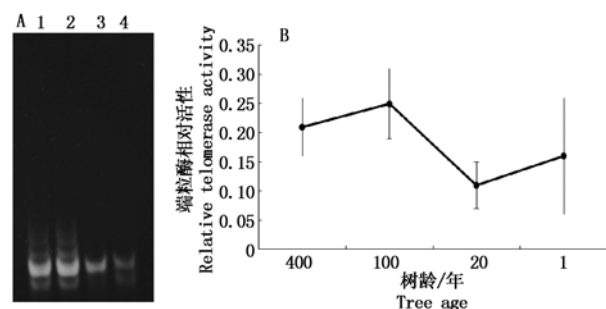
A: M. DNA Marker DL-50; 1~4. 树龄为400, 200, 40, 10年的楸树端粒酶活性; B: 四个不同树龄楸树的相对端粒酶活性的统计图。

A: M. DNA Marker DL-50; 1~4. Indicate the telomerase activity in leaves of 10-to 400-year-old *Catalpa bungei* C. A. Mey, respectively; B: Relative telomerase activity in leaves of 10-to 400-year-old *Catalpa bungei* C. A. Mey.

图3 不同树龄楸树端粒酶活性

Fig. 3 Leaf telomerase activity of *Catalpa bungei* C. A. Mey trees at different ages

2.1.4 不同树龄国槐端粒酶活性 树龄为400年的国槐相对端粒酶活性为0.21,树龄为100年的国槐相对端粒酶活性为0.25,树龄为20年的国槐相对端粒酶活性为0.11,树龄为1年的国槐相对端粒酶活性为0.16(图4)。总的趋势是,随着国槐年龄的减小端粒酶活性也减小。



A: 1~4. 树龄为400, 100, 20, 1年的国槐端粒酶活性; B: 四个不同树龄国槐的相对端粒酶活性的统计图。

A: 1~4. Indicate the telomerase activity in leaves of 1-to 400-year-old *Sophora japonica*, respectively; B: Relative telomerase activity in leaves of 1-to 400-year-old *Sophora japonica*.

图4 不同树龄国槐端粒酶活性

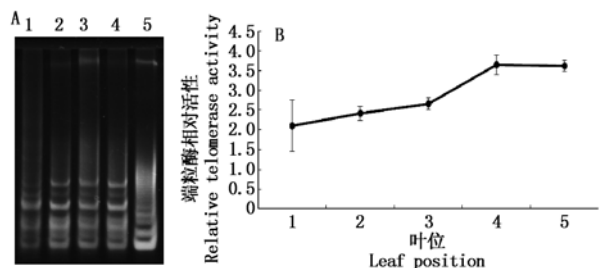
Fig. 4 Leaf telomerase activity of *Sophora japonica* trees at different ages

2.2 不同叶位端粒酶活性比较

2.2.1 油松不同叶位针叶端粒酶活性 油松叶位从下到上的相对端粒酶活性为2.10, 2.41, 2.66, 3.65, 3.62(图5)。综合图5-A, B, 同一棵树, 随着叶位的上升, 端粒酶活性也在增加。这可能是由于在同一棵树上不同部位的叶片生理年龄不同的结果。

2.2.2 银杏不同叶位叶片端粒酶活性 从下到上银杏叶位的相对端粒酶活性为0.20, 0.25, 0.26, 0.31, 0.95(图6)。综合图6-A, B, 同一棵树, 随着叶位的上升, 端粒酶活性也在增加。虽然银杏相对

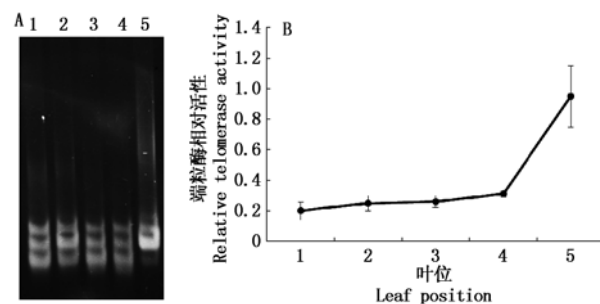
端粒酶活性比油松的低,但这个结果跟油松中的趋势基本相同,端粒酶活性可能与叶片生长的枝条生理年龄有关。



A: 1~5. 油松从下到上不同叶位 (即茎基部、茎 1/4 高度、茎 1/2 高度、茎 3/4 高度、茎顶端) 的端粒酶活性变化; B: 油松不同叶位的相对端粒酶活性的统计图。

A: 1~5. Indicate the sampling position (base, 1/4, 1/2, 3/4 on the stem, and top of the stem) of *Pinus tabulaeformis*; B: Relative telomerase activity in leaves of *Pinus tabulaeformis* sampled from different position of the tree.

图 5 油松不同叶位针叶端粒酶活性的变化 (树龄为 20 年)
Fig. 5 Effect of sampling position on telomerase activity in the leaf of the 20-year-old *Pinus tabulaeformis* tree



A: 1~5. 银杏从下到上不同叶位 (即茎基部、茎 1/4 高度、茎 1/2 高度、茎 3/4 高度、茎顶端) 的端粒酶活性变化; B: 银杏不同叶位的相对端粒酶活性的统计图。

A: 1~5. Indicate the sampling position (base, 1/4, 1/2, 3/4 on the stem, and top of the stem) of *Ginkgo biloba*; B: Relative telomerase activity in leaves of *Ginkgo biloba* sampled from different position of the tree.

图 6 银杏不同叶位端粒酶活性的变化 (树龄为 100 年)
Fig 6 Effect of sampling position on telomerase activity in the leaf of the 100-year-old *Ginkgo biloba* tree

3 讨论

3.1 树龄与端粒酶活性的关系

关于端粒、端粒酶在木本植物生长发育中调控作用的报道还比较少见。Flanary 等^[10]通过对不同年龄狐尾松针叶的端粒酶活性测定,发现树龄长的树木较树龄短的树木端粒酶活性高,并推测端粒酶活性的增强或者减弱与松树寿命的长短可能有直接或间接的关系。本研究对楸树、国槐端粒酶活性测定结果表现为随着树龄增加端粒酶活性呈增加的趋势。而 10 年树龄银杏端粒酶活性明显高于 700, 100, 50 年树龄。这与 Song 等^[12]的研究结果相一致,其研究也表明银杏树端粒酶活性随树龄 (10 ~ 700 年) 增加呈下降的趋势。

已有文献和本研究结果均表明,在所研究的

100 年以上树龄的古树样品中,端粒酶活性都能被检测得到,对于树龄达 3 500 年的狐尾松也不例外^[10]。端粒酶活性的稳定性存在可能会减低/阻止细胞进入衰老状态;相反,在缺少端粒酶活性的情况下,随着细胞的不断分裂端粒逐渐缩短,细胞进入衰老状态。因此,端粒酶活性及端粒长度在调节某些树种的生命进程及树木的长寿中可能起着关键性的作用。

3.2 叶位与端粒酶活性的关系

关于树木端粒长度与组织在树干不同位置关系的研究仅见于 Aronen 等^[15]的报道,他们的检测结果表明,欧洲赤松老树 (50 ~ 200 年) 从树干基部到顶端,端粒逐渐缩短,但作者没有同时检测欧洲赤松端粒酶活性变化的位置效应。本研究表明,同一棵油松不同叶位的端粒酶活性具有一定的规律性,在同一棵树上,端粒酶活性随着叶位的上升而增加。银杏 10 年生幼树的端粒酶活性明显高于其他树龄;但是之后,随着树龄的增长,端粒酶活性变化不大。而不同叶位的银杏端粒酶活性则随着叶位的上升逐渐增加。

不同于草本植物,大多数木本植物由幼年期转变到成年期时才能获得成花能力。当树木上部已到成熟期时,下部常常仍处于幼年期^[16]。基于此,欧洲赤松从树干基部到顶端端粒逐渐缩短,可能是由于上部组织生理年龄高,已到成熟期。而本研究的结果似乎在显示端粒酶活动的另一规律。2004 年,Shakirov 和 Shippen^[17]建立了一个端粒长度动态平衡的模型,即每一个物种有一特异的端粒长度范围,在此范围内有一最适的端粒长度。当端粒长度较最适长度短时,会优先被端粒酶延长;而长的端粒则不被端粒酶延长。随着细胞分裂,复制不断缩短的 DNA,其端粒逐渐缩短为最适长度。在最适长度时,端粒的缩短与延伸达到平衡。因此,树木顶部端粒较短,而端粒酶活性则较高,这可能有益于较短长度端粒的维护或延伸,是树木的一种生存对策。

总之,植物端粒和端粒酶方面的研究主要见于草本植物,如拟南芥 (*Arabidopsis*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等,而关于木本植物端粒酶参与端粒修复机制方面的报道仅有很少的报道。随着对端粒结构、端粒维持机制的深入研究,端粒长度、端粒酶活性、细胞分裂、植物生长发育之间更深层次的相关关系会逐渐被揭示出来。

参考文献:

[1] Blackburn E H. Structure and function of telomeres[J].

- Nature, 1991, 350(6319): 569 – 573.
- [2] Dore E, Pace T, Picci L, *et al.* Dynamics of telomere turnover in *Plasmodium berghei* [J]. Molecular Biology Reports, 1994, 20(1): 27 – 33.
- [3] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. Science, 1998, 279(5349): 349 – 352.
- [4] Killan A, Heller K, Kleinhofs A. Development patterns of telomerase activity in barley and maize [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(4): 621 – 628.
- [5] Fitzgerald M S, Mcknight T D, Shippen D E. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(25): 14422 – 14427.
- [6] Heller K, Kilian A, Kleinhofs A, *et al.* Telomerase activity in plant extracts [J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1996, 252(3): 342 – 345.
- [7] Fitzgerald M S, Mcknight T D, Shippen D E. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(25): 14422 – 14427.
- [8] 王渭霞, 刘小川, 朱廷恒. 高等植物端粒和端粒酶的研究进展 [J]. 遗传, 2003, 25(1): 113 – 118.
- [9] 刘 頔, 宋 涵, 李凤兰, 等. 植物端粒与端粒酶研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(5): 163 – 167.
- [10] Flanary B E, Kletetschka G. Analysis of telomere length and telomerase activity in tree species of various life-spans, and with age in the bristlecone pine *Pinus longaeva* [J]. Biogerontology, 2005, 6(2): 101 – 111.
- [11] Liu D, Qiao N, Song H, *et al.* Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age [J]. Journal of Plant Research, 2007, 120(4): 523 – 528.
- [12] Song H, Liu D, Li F, *et al.* Season-and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(3): 1799 – 1805.
- [13] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science, 1994, 266(5193): 2011 – 2015.
- [14] 王瑾瑜, 张徐俞, 王雅群, 等. 用改进的 TRAP 法测定树木端粒酶活性 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(4): 682 – 686.
- [15] Aronen T, Rynänen L. Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2012, 8(2): 267 – 275.
- [16] 全国高等林业院校教材——植物生理学 [M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [17] Shakirov E V, Shippen D E. Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 1959 – 1967.