

He-Ne 激光对小麦 DNA UV-B 损伤修复的影响

韩榕^{1,2}, 王勋陵^{*1,3}, 岳明¹

(¹西北大学生命科学学院, 陕西西安 710069; ²山西师范大学生命科学院, 山西临汾 041004; ³兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000)

摘要 研究并分析了 He-Ne 激光对小麦 DNA UV-B 损伤修复的影响和机理, 以探明激光对 UV-B 损伤修复的影响途径及机制。结果表明, 小麦对增强 UV-B 辐射损伤具有一定的切除修复能力, 切除修复的高峰期发生在 UV-B 辐射后 4~6 h 内; He-Ne 激光主要通过促进小麦的切除修复途径影响小麦对 UV-B 损伤的修复。在对损伤 DNA 的切除及 DNA 的修复合成两方面均有不同程度的促进作用, 其切除高峰期发生在 UV-B 辐射后 4~6 h; DNA 的修复合成高峰期在辐射后 6~7 h。

关键词 小麦, UV-B, He-Ne 激光, DNA 损伤修复

中图分类号 Q 631; TN 249 文献标识码 A

Influence of He-Ne Laser Irradiation on the Damage and Repair of Wheat Seedling by Enhanced UV-B Radiation

HAN Rong^{1,2}, WANG Xun-ling^{1,3}, YUE Ming¹

(¹Institute of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shanxi 710069; ²Institute of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004; ³Institute of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract The result shows that the wheat seedling has partly ability of excision repair, and the time of repair peak is about from four to six hours after the UV-B radiation. By excision repair pathway, the repair for the removal of damage induced by UV-B radiation from cellular DNA of the wheat can be influenced by He-Ne laser irradiation. The ability of excision repair of the wheat can be enhanced by He-Ne laser irradiation, and the excision effect of the He-Ne laser irradiation is obviously at the excision peak (at five hours). The peak of DNA repair synthesis was from six to seven hours after treated by He-Ne laser and UV-B irradiation.

Key words wheat, ultraviolet-B, He-Ne laser, DNA damage and repair

1 引言

大气臭氧层的不断损耗将带来 UV-B (280~320 nm) 对地面辐射的增强。由此, 将威胁地球上的动植物乃至人类的生存及生活^[1]。因而, 揭示 UV-B 对生物尤其是对农作物的损伤及修复机理就显得尤为迫切和重要。

对 DNA 损伤修复的研究大多集中在哺乳动物

和微生物细胞上, 对其机理的研究也较为深入^[2]。但对高等植物 DNA UV-B 损伤修复的研究显得较为薄弱^[3]。植物可通过光修复和暗修复等多种途径修复 UV-B 造成的损伤。在切除修复过程中由核酸内切酶 (UV-endonuclease) 切去包括损伤碱基在内的一段 DNA 链, 使 DNA 中形成一定数量的单链区段, 然后再由 DNA 连接酶和聚合酶修复切去的 DNA 链, 完成修复过程^[4,5]。有些植物经 UV 辐射后 4~6 h

收稿日期 2001-04-27; 收到修改稿日期 2002-03-05

基金项目 国家自然科学基金 (编号 39970126) 资助项目。

作者简介 韩榕 (1962—) 男, 山西省人, 副教授, 博士, 研究方向 环境植物学。E-mail: hanrong@public.lf.sx.cn

* 通信联系人, E-mail: wangxl@nwu.edu.cn

单链断裂达到最多,是其切除修复的高峰期,照射后 8h 单链 DNA 断裂重新接合,双链 DNA(dsDNA)恢复到对照水平^[6]。

激光在植物方面的应用较为广泛,适当剂量的激光辐照可提高种子的萌发力^[7],酶活性提高,叶绿素含量增加,抗逆性增强^[8]。但激光对 UV-B 损伤的修复作用至今在国内外尚未见有报道。本文采用 He-Ne 激光(10 mW/mm²)来处理经 UV-B 辐射(10.08 kJ·m⁻²·d⁻¹)损伤的小麦幼苗和种子,通过荧光分析和同位素标记方法,测定了其双链 DNA 及非按期 DNA 的合成,研究分析了 He-Ne 激光对小麦 DNA 切除修复的影响和机理。

2 材料和方法

2.1 材料

材料为冬小麦 93-473(山西省农科院小麦研究所提供)。

2.2 方法

2.2.1 种子萌发

共设对照(CK),UV-B 处理(B),激光处理(L),UV-B 和激光复合处理(BL),红光处理组(R),UV-B 和红光复合处理(BR)6 组。选取籽粒饱满,大小均一的小麦种子,培养于盛有湿滤纸的培养皿内,30 粒/盘,每组三次重复,25℃ 培养,种子露白时待处理。

2.2.2 UV-B 辐射处理

紫外 B 发生用紫外灯 - H(297 nm)辐照处理按 Feng Huyuan 等方法进行^[9]。剂量采用 10.08 kJ·m⁻²·d⁻¹,相当于臭氧(O₃)下降 20% 即 UV-B 增强 40% 的强度(RAF = 2.0)^[10]。光合有效辐射(PAR)为 220 μmol·m⁻²·d⁻¹(CI301PS,CID,USA)^[9]。每天处理 8 h,然后转入暗处培养,共处理 4 天。

2.2.3 He-Ne 激光辐照

He-Ne 激光器波长为 632.8 nm,光斑直径 5 mm。通过可溶性蛋白含量的测定选用较大刺激效应剂量 10 mW/mm²,120 s,25℃^[8]。激光辐照处理安排在夜间进行,以排除杂光影响。为研究激光的作用机理,其中一组(BR)经 UV-B 辐射后,在暗处用同等波长和功率的红光(630 nm,10 mW/mm²)X CI-700,CID,USA)照射 120 s,25℃。激光及红光照射后立即转入暗处 25℃ 培养。

2.2.4 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取 DNA 并进行改进(1)分别

称取各处理组暗修复 0.5,2.5,5,6.5 和 8 h 的新鲜组织各 0.5 g,放入预冷的研钵中,同时加入液氮研成细粉。(2)加入 65℃,4% β-巯基乙醇/CTAB 抽提液 4 ml,65℃ 温浴 30 min。(3)加等体积氯仿/异戊醇 24:1 混合液,轻轻摇匀后静置 10 min,8000 × g 离心 5 min,回收上层水箱,重复一次。(4)加等体积异丙醇,静置 10 min,8000 × g 离心 5 min。(5)取沉淀用 80% 乙醇洗涤 2 次,干燥后溶于 TE。(6)加 RNase(1 μg/μl)使 RNase 终浓度为 30 μg/ml,37℃ 温浴 20 min,冷却后冰箱 4℃ 贮存备用。

2.2.5 DNA 浓度测定

用紫外分光光度计(752C)分别测定各样品 A₂₆₀/A₂₈₀,若比值不在 1.8 附近,用 NH₄Ac 对样品进行纯化,并计算各样品 DNA 的含量(μg/ml)。

2.2.6 荧光光谱法测定 dsDNA 含量

将各样品 DNA 用双蒸水稀释使其浓度均为 0.5 μg/ml。荧光测定前 1 h 加入溴化乙啶溶液(5 μg/ml),使样品中溴化乙啶的终浓度为 0.5 μg/ml,同时配制标准溶液。采用日立 F-4500 荧光分光光度仪进行测定。对 EX 和 EM 进行扫描确定激发波长(EX)为 483.0 nm,发射波长(EM)为 600.0 nm,狭缝(EX/EM)为 10.0 nm/10.0 nm,扫描速度为 1200 nm/min。通过测定标准样,由仪器自动给出各样品荧光值,并由标准曲线给出双链 DNA 浓度。每种样品重复三次测量以求其平均值。

2.2.7 非按期 DNA 合成的测定

小麦干种子经氯化汞表面消毒后进行 UV-B 辐射和 He-Ne 激光辐照处理,方法,剂量同上。辐照处理后的种子立即于含蔗糖 2%,氯霉素 10 μg/ml,及所需浓度的羟基脲培养液中进行萌发。分别在萌发后 0.5,2.5,5,6.5 及 8 h 取小麦胚,每次 8 粒,称重,重复三次。³H-TdR(3.2 × 10⁵ Bq/ml)(Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, England)标记 4 h(25℃)烘干,用高氯酸:双氧水 = 1:1 的消化液消化 5~6 h(80~90℃)后加入以二甲苯,PPO,POPOP 配成的闪烁剂 6 ml,100% 乙醇 4 ml,在 FJ-2100 双道液闪计数器上计数,以³H-TdR 的渗入量表示其 DNA 修复合成(UDS)能力。

3 结果及分析

3.1 对 DNA 损伤切除的影响

由图 1 可看出在暗培养 30 min 时,各组中除 B 组 dsDNA 浓度较低外,其余各组差别均不是很大,

结果说明此时细胞中 DNA 的切除还未真正开始。

在暗修复 2.5 h 时 ,B ,BR 及 BL 组 dsDNA 含量开始降低 ,其中 BL 组降幅最大 ,dsDNA 为 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。BR 与 B 的含量接近。其他各组(CK ,R ,L)与 0.5 h 时差别不大。

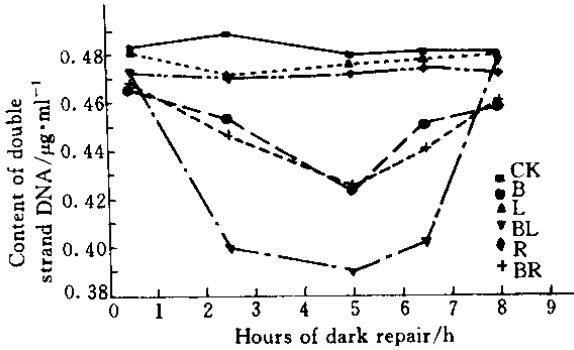


图 1 UV-B 和 He-Ne 激光辐照后经不同时间暗培养后 各组 dsDNA 的含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fig.1 After cultured in different time under dark condition , the content of double stranded DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) among each group of cellular DNA by UV-B radiation and He-Ne laser irradiation

到达暗修复 5 h 时各组 dsDNA 含量差别达到最大。其中 BL 组降至最低 ,dsDNA 仅为 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$;其次为 B 组(0.423 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 BR 组(0.425 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ;R ,L 组与对照差别不大 ,其 dsDNA 含量变化也很小。BL 组 dsDNA 含量的降低说明 He-Ne 激光的辐照明显地促进了 UV-B 辐射后细胞中对 DNA 损伤链的切除 ,造成细胞中大量单链 DNA(ssDNA)的形成而使得细胞中 dsDNA 的含量急剧减少。与对照相比 ,B 组虽高于 BL 组但低于 CK ,说明 UV-B 辐射后细胞中自身修复系统的启动 ,造成了一定数量的 dsDNA ,但它对损伤链的切除率低于 BL 组。在暗培养 6.5 h 后 ,BL ,B 及 BR 组的 dsDNA 含量均有一定程度的恢复并与 2.5 h 的含量接近。CK ,L 及 R 等组仍变化不大。在暗修复 8 h 时 ,BL 组 dsDNA 含量大幅增加到 0.476 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并高于 B 组(0.457 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ,接近 CK 水平(0.479 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。B 组的值虽有增加但仍低于对照与 BR 值接近。dsDNA 含量的增加说明细胞中单链 DNA 的减少 ,一些被切除的损伤链已被合成的 DNA 所取代。BL 组 dsDNA 的含量变化与 B 组相比 ,说明在这一过程中 He-Ne 激光的辐照处理能极大地促进细胞对 DNA 损伤链的切除并合成新链。比较暗修复 5 h 和 8 h 时 ,B 组与 BL 组 dsDNA 的差值 ,5 h 时差值为 0.033 $\mu\text{g}/\text{ml}$,8 h 时差值为

0.019 $\mu\text{g}/\text{ml}$,可见 He-Ne 激光在对小麦切除修复过程中促进切除与修复合成的作用是不同的。

3.2 对 DNA 修复合成的影响

为进一步揭示激光的作用机理 ,又采用同位素标记的办法研究了对 DNA 修复合成的影响。研究中采用羟基脲抑制细胞 S 期 DNA 复制 ,它能将种胚细胞几乎全部阻滞在 G_1 期 ,但对非按期 DNA 的修复合成没有抑制作用^[11]。

3.2.1 不同浓度羟基脲对小麦种胚 DNA 合成活性的影响

把未经处理的小麦种子浸在不同浓度的羟基脲溶液中 ,经 25 $^{\circ}\text{C}$ 萌发 10 h 后 ,同位素标记($^3\text{H-TdR}$) 4 h 检测其种胚 DNA 合成活性 ,并绘制 DNA 羟基脲剂量效应曲线 ,如图 2 所示。结果显示 :在 0 ~ 15 mmol/L 的羟基脲浓度范围内 ,DNA 合成活性随羟基脲浓度的增加呈下降趋势 ;浓度高于 15 mmol/L 以后 ,其对 DNA 合成活性的抑制作用不再增强。羟基脲对小麦种胚 DNA 合成的抑制作用在 15 mmol/L 时达到最高。

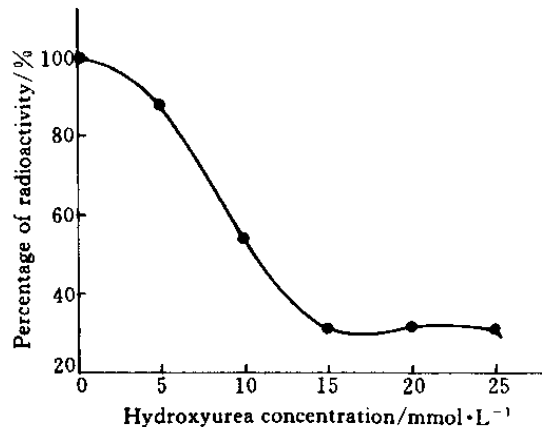


图 2 小麦种胚 DNA 合成的羟基脲剂量效应曲线
Fig.2 Dosage-response curve of the DNA replication activity in wheat embryos

3.2.2 对 UDS 的影响

采用 15 mmol/L 的羟基脲抑制 S 期 DNA 的合成 , $^3\text{H-TdR}$ 标记不同萌发时间后的种胚 ,测得各组 DNA 合成的动态结果如图 3 所示。

结果表明 ,B ,BR 及 BL 组 UDS 在萌发后 5 h 达到最低 ,远低于 CK 组。5 h 以后 UDS 开始增加 ,6.5 h 时 UDS 达到峰值 ,其后又开始下降。此时 BL 组 UDS 水平接近对照。与 BL 相比 ,B 组 UDS 的峰值虽也在 6.5 h ,但其 UDS 水平远低于 BL 组 ,BR 组与 B 组接近 ,其余各组(CK ,L ,R)变化不大。从图中还

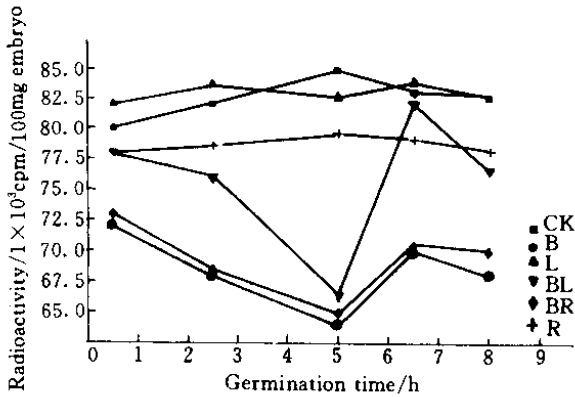


图3 不同处理对小麦种胚非按期 DNA 合成的影响

Fig.3 Effects of different treatment on unscheduled DNA synthesis in wheat embryos

可以看出在萌发后 5 h 以内, B, BL, BR 组 UDS 均呈下降趋势, 5 h 以后才开始增加, 说明在 5 h 以内是细胞对损伤链进行切除修复阶段, 因而 DNA 合成减少。在此以后细胞对被损伤链进行修复合成, 所以 DNA 合成增加, 8 h 以后修复合成结束。这一结果与我们早期用重离子对小麦注入的研究结果基本一致^[12]。从对 UDS 的影响结果可看出, He-Ne 激光同样促进了细胞对 DNA 损伤链的修复合成, 其修复合成高峰值在种子萌发后 6~7 h。

综上所述, He-Ne 激光对 UV-B 损伤修复的促进作用在切除阶段和修复合成阶段同时存在, 但切除高峰值发生在辐射后 4~6 h, 修复合成高峰较切除晚 1 h, 在 6~7 h; BR 与 B 相比差别不大, 说明同等波长、功率的红光对 DNA 的切除修复影响很小。可见, He-Ne 激光的促进修复作用并非是由激光的光效应引起的。

4 讨论

4.1 切除修复

植物主要通过光复活作用、核苷酸切除修复、碱基切除修复、重组修复(或复制后修复)等方式修复由 UV-B 造成的损伤^[3]。紫外线对细胞 DNA 的损伤主要是使同一条链上相邻的两个嘧啶碱基形成环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs)和 6-4 光产物(phrimidine 6-4 pyrimidine photoproducts, 6-4 PPS)^[3, 4]。这些损伤的形成直接影响细胞的复制、转录和翻译。光复活作用是利用蓝紫光(310~500 nm)作为能源在光复活酶的作用下将二聚体单

体化。其间不发生或极少发生单链的形成。重组修复并没有切除二聚体而只是通过重组复制使二聚体相对被“稀释”而已, 也没有发生单链的切除与形成。而无论是核苷酸切除修复还是碱基切除修复都要切除一段受损的 DNA, 在母链上形成一段单链区。由此可见, 能否在 DNA 上形成单链区就成为切除修复区别于其他修复的一个重要标志。激光对 UV-B 损伤的修复如果是通过光修复途径进行, 那么在细胞 DNA 中就不会形成单链区段, dsDNA 的含量也就不会有变化。而本研究结果证明在暗修复 5 h 后, BL 组 dsDNA 含量变化很大, 其值远低于 UV-B 组, 说明 He-Ne 激光显著地促进了 DNA 上单链区段的形成。加之红光处理组(BR) dsDNA 含量未变化, 这都说明激光的修复作用不是通过光修复途径或重组修复, 而是通过促进切除修复的方式来进行的。

4.2 激光作用的机制

激光对生物体的作用主要表现为光效应、电磁效应、热效应和压力效应^[13]。已有研究表明, 低功率的激光特别是可见光范围的激光, 其产生的热和压力很少。我们曾对 He-Ne 激光(10 mW/mm²) 辐照点的叶温进行了测定; 发现辐照 30 min 时, 辐照点的叶温升高不会超过 2℃。因此, 激光对生物体的影响就主要表现为光效应和电磁效应。然而, 产生光效应的光源必须是线性偏振光, 用非相干的热光源($\lambda = 630 \text{ nm}$) 辐照时无效^[13]。本文采用同波长、同功率密度的红光研究结果证明了这一点。那么, 起作用的就只有激光的电磁效应。可能是由激光的磁场效应通过激活细胞中的 DNA 糖苷酶, AP 核酸内切酶和 DNA 连接酶活性而促进了 DNA 的切除修复。

4.3 荧光光谱测定法

荧光显色剂溴化乙啶在单链 DNA 存在时能选择性地同双链 DNA 结合^[14], 可以检测纳克水平的 dsDNA。DNA 切除修复时, 要切去受损伤的一段单链 DNA, 这样就会在 DNA 上形成很多单链区段, DNA 中的双链 DNA 含量就会随之减少, 那么溴化乙啶插入的量也就会减少。与检测 DNA 损伤修复的其他方法比较, 荧光检测法具有灵敏度高、准确性好、操作简单等特点, 已在许多动、植物细胞 DNA 损伤修复的研究中得到了应用^[14, 15]。

4.4 非按期 DNA 合成(UDS)——修复合成

DNA 的复制合成绝大部分集中在 S 期, 所以称之为按期 DNA 合成。当细胞受到环境因子的胁迫产生 DNA 损伤并修复时, 就会在 S 期之前进行 DNA

的修复合成,故称为非按期 DNA 合成。我们早期研究结果显示小麦种胚 DNA 的 S 期是在萌发后 10 h 以内,受辐射损伤后形成的 UDS 是在萌发后 6 h 左右。本研究结果显示 UV-B 造成 UDS 与重离子注入造成的 UDS 的时期基本相同^[12]。

参 考 文 献

- 1 D. J. Allen, S. Noguez, N. Baker. Ozone depletion and increased UV-B radiation. Increased UV-B radiation is there a real threat to photosynthesis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1998, **49**(328):1775 ~ 1788
- 2 E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede. DNA Repair and Mutagenesis [M]. Washington DC : ASM Press, 1995
- 3 A. B. Britt. DNA damage and repair in plants [J]. *Ann. Rev. Plant Physiol Mol. Biol.*, 1996, **47**:75 ~ 100
- 4 A. Sancar. Structure and function of DNA photo-lyase [J]. *Biochemistry*, 1994, **33**:2 ~ 9
- 5 E. Seeberg, L. Eide, M. Bjoras. The base excision repair pathway [J]. *Trends in Biochemical Science*, 1995, **20**:391 ~ 397
- 6 R. D. Wood. DNA repair in eukaryotes [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, **65**:137 ~ 139
- 7 Qi Zhi, Yue Ming, Han Rong. The damage repair role of He-Ne laser in plant exposed to different intensities of ultraviolet-B irradiation [J]. *Photochem and Photobiol*, 2002, **75**(6):680 ~ 687
- 8 Cai Suwen, Qi Zhi, Ma Xiaolai *et al.*. Effect of He-Ne laser irradiation on soluble protein synthesis of corn seedlings [J]. *Chinese J. Lasers* (中国激光), 2000, **27**(3):284 ~ 288 (in Chinese)
- 9 Feng Huyuan, An Lizhe, Tan Lingling *et al.*. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on pollen germination and tube growth of 19 taxa *in vitro* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2000, **43**:45 ~ 43
- 10 Yue Ming, Li Yuan, Wang Xunling. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on plant nutrients and decomposition of spring wheat under field conditions [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1998, **40**:187 ~ 196
- 11 Liu Xiao, Zhao Yufang, Ling Beibei. Unscheduled DNA synthesis induced by electron beam and γ irradiation in berley embryos [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica* (核农学报), 2000, **14**(2):65 ~ 71 (in Chinese)
- 12 Han Rong, Yang Hanmin, Gao Qingxiang *et al.*. The comparison of unscheduled DNA synthesis in germinating wheat embryos treated by Fe^{1+} ions implantation and ^{60}Co γ -rays irradiation [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica* (核农学报), 1994, **8**(3):135 ~ 140 (in Chinese)
- 13 Xiang Yang, Ding Zhibao. The inquiry in effect mechanism of laser biology [J]. *Optoelectronics · Laser* (光电子 · 激光), 1997, **8**(6):475 ~ 478 (in Chinese)
- 14 Cao Shengfeng. Fluorometric analysis of DNA unwinding method [J]. *Chemistry of Life* (生命的化学), 1993, **13**(4):38 ~ 39 (in Chinese)
- 15 Zhang Peng, Zheng Xiulong. Fluorometric analysis of DNA unwinding method and its application in studies of DNA damage and repair [J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing* (辐射研究与辐射工艺学报), 1989, **7**(3):54 ~ 59 (in Chinese)