

# He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗 同工酶基因表达的影响

张美萍<sup>1</sup> 王小花<sup>2</sup> 陕永杰<sup>3</sup> 石昌静<sup>1</sup> 韩 榕<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004  
<sup>2</sup> 牡丹江医学院病原生物学与免疫学实验室, 黑龙江 牡丹江 157011  
<sup>3</sup> 山西师范大学城市与环境科学院, 山西 临汾 041004

**摘要** 采用 He-Ne 激光辐照 (5 mW/mm<sup>2</sup>) 和增强紫外线 B (UV-B) 辐射处理“晋麦 8 号”小麦, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术分析 UV-B 和 He-Ne 激光辐照后小麦叶片的过氧化物 (POD) 同工酶、过氧化氢 (CAT) 同工酶、酯酶 (EST) 同工酶、三磷酸腺苷酶 (ATPase) 同工酶、苹果酸脱氢酶 (MDH) 同工酶各种酶谱的变化情况。PAGE 结果显示, 小麦叶片经 UV-B 辐照后诱导出 2 条新 POD 同工酶谱带, 但明显降低了总的 POD 活性, 对 CAT, EST, ATPase 和 MDH 同工酶谱数目影响不大, 但酶带强度减弱, 同工酶活性明显下降, 说明 UV-B 辐射抑制了植物的基因表达; He-Ne 激光处理可促进同工酶的基因表达, 使酶带增强; UV-B 辐射后再用 He-Ne 激光处理, 激活了 UV-B 辐射钝化的基因, 促进了同工酶的基因表达, 使酶活性增强。研究发现, 一定剂量的 He-Ne 激光辐照可以通过促进小麦叶片中同工酶的基因表达来增强植物的抗逆性。

**关键词** 放射生物学; 抗逆性; 小麦同工酶; He-Ne 激光; 紫外线 B; 基因表达

**中图分类号** Q631; Q691.9 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201138.0504002

## Effects of He-Ne Laser and Enhanced Ultraviolet-B Radiation on the Isozymes Gene Expression of Wheat Seedlings

Zhang Meiping<sup>1</sup> Wang Xiaohua<sup>2</sup> Shan Yongjie<sup>3</sup> Shi Changjing<sup>1</sup> Han Rong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Engineering, College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China

<sup>2</sup> Laboratory of Medical Immunology and Pathogen Biology, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China

<sup>3</sup> College of Urban and Environment Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China

**Abstract** The seedlings of wheat (Jinmai No. 8) are exposed to He-Ne laser irradiation (5 mW/mm<sup>2</sup>) and enhanced UV-B radiation [10.08 kJ/(m<sup>2</sup>·d)], the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is used to analyze the patterns of peroxidase (POD), catalase (CAT), esterase (EST), adenosine triphosphatase (ATPase), and malate dehydrogenase (MDH). The results have shown that two new bands of POD zymogram appear under enhanced UV-B radiation, but the activities of the total POD isoenzymes decrease. However, there is no difference among isoenzyme bands of CAT, EST, ATPase, and MDH, but the activity of the isoenzymes decreases obviously. Our study find that the gene expression and activities of plant are weakened by UV-B radiation, but the ability of plant stress resistance is enhanced by He-Ne laser irradiation.

**Key words** radiobiology; resistance; wheat isoenzymes; He-Ne laser; ultraviolet-B; gene expression

**OCIS codes** 140.1340; 040.7190; 170.0170; 170.1420

收稿日期: 2011-01-05; 收到修改稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(30671061)和山西省青年基金(2009021030-2)资助课题。

作者简介: 张美萍(1975—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物衰老的机理与防治等方面的研究。

E-mail: zhangmp2006@yahoo.com.cn

\* 通信联系人。E-mail: hanrong@dns.sxnu.edu.cn

## 1 引言

大量研究表明,气污染加剧了臭氧层的破坏,导致到达地面的太阳紫外线辐射增强,主要是紫外线B(UV-B,280~320 nm)辐射增强,给地球上的动植物及人类本身造成严重危害,并导致作物减产<sup>[1~4]</sup>。同工酶作为生物机体中的天然标记,可以反应出机体内的各种变化。通过对同工酶谱的分析,能够识别基因的存在和表达。目前同工酶分析技术已经成为研究逆境下植物基因表达变化的常用技术。研究表明,植物在逆境胁迫下,植物体内的一些同工酶会发生变化<sup>[5~7]</sup>,能够反映出植物生长过程中对逆境所做的基因调控。因此,同工酶的变化规律对揭示不同抗性基因作用的生化本质具有十分重要的意义,同时也可以作为一种认识基因表达的生化指标。由于适宜剂量的 He-Ne 激光辐照可提高植物的代谢水平,增强机体的抗逆性<sup>[8,9]</sup>,诱导某些同工酶酶谱发生改变<sup>[10]</sup>。本文对 He-Ne 激光辐照和增强 UV-B 辐射下的小麦叶片同工酶谱的变化进行分析,试图来研究其对同工酶基因表达的影响,为进一步探讨 He-Ne 激光辐照和增强 UV-B 辐射调控酶的基因表达提供一定的理论依据,同时也为今后研究抗紫外辐射基因的分选和克隆提供参考。

## 2 材料与方 法

供试材料为“晋麦 8 号”(Triticum aestivum)小麦品种,由山西省农业科学院小麦研究所提供。选取籽粒饱满、大小均匀的小麦种子,经质量分数 0.1% HgCl<sub>2</sub> 表面消毒后,培养于盛有湿滤纸的培养皿内,30 粒/盘,每组重复 3 次,25 ℃ 培养,种子露白时待处理。

共设对照组(CK)、UV-B 处理组(B)、He-Ne 激光处理组(L)、紫外+激光复合处理组(BL)4 组。每天日光照射 8 h 后,暗培养约 16 h。CK 组为日光照射后进行暗培养;L 组在日光照射后用 He-Ne 激光辐照 2 min 后进行暗培养;B 组日光与 UV-B 同时照射 8 h 后进入暗培养;BL 组在日光照射与 UV-B 辐照 8 h 后,马上进行 He-Ne 激光处理 2 min,然后进行暗培养。共处理 5 d。

### 1) UV-B 辐射

UV-B 辐射强度为 10.08 kJ/(m<sup>2</sup>·d)<sup>[11,12]</sup>。UV-B 发生用 UV-B 灯(30 W,297 nm),将其垂直悬于培养皿的上方,用 0.13 mm 醋酸纤维滤膜将 290 nm 以下的 UV 过滤。采用紫外辐照计(UV-B

型,北师大光电仪器厂)对 UV-B 辐射功率密度进行测定,测定精度通过辐射测定仪(742 型,FL Optronics Laboratories Orlando, USA)校正。调整 UV-B 灯与培养皿间距来控制 UV-B 辐射的强度,距离为 25 cm 时达到强度要求。

### 2) 激光辐照

激光辐照采用西安激光仪器厂生产的大功率 He-Ne 激光生物辐照仪,波长选择为 632.8 nm,辐照剂量选择 5 mW/mm<sup>2</sup>,每天 2 min<sup>[12]</sup>。所有激光处理安排在夜间进行,以排除杂光影响。从种子露白时开始处理,直至小麦幼苗长出 2 片真叶,共处理 5 d。然后摘取各处理小麦真叶进行同工酶的凝胶电泳分析。

### 3) 酶液的提取

称取各处理组新鲜的小麦叶片 1 g,加入 3 mL 酶提取液,酶液由三羟甲基氨基甲-盐酸缓冲液(Tris-HCl),浓度为 50 mmol/L,乙二胺四乙酸(EDTA)1 mmol/L,甘油 10%(体积分数),pH 8.0 所组成;冰浴研磨,用高速冷冻离心机离心 20 min(离心速度 12000×g,温度 4 ℃),上清液保存在-20 ℃ 冰箱中备用。

### 4) 同工酶电泳

采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,用质量分数 4%的浓缩胶及质量分数 8%的分离胶作为电泳介质;酶样与上样缓冲液(质量分数 40%的蔗糖,少许溴酚兰)按质量比 1:1 混合,每孔上样 40 μL;初始电泳稳压 100 V,样品进入分离胶后加大电压到 150 V,4 ℃ 下电泳 3~4 h。当指示剂达到凝胶底部 0.5 cm 时,停止电泳。

同工酶电泳染色参照胡能书等<sup>[13,14]</sup>的方法。显色后的凝胶在凝胶分析系统上进行拍照分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同处理组小麦叶片过氧化物同工酶电泳凝胶图谱

不同处理小麦叶片过氧化物(POD)同工酶酶谱如图 1 所示,其迁移率  $R_f$  值和表达量积分光密度(IOD)值如表 1 所示。从图 1 和表 1 可知,CK 组出现 7 条 POD 同工酶谱带;B 组同工酶组分发生了变异,在  $R_f=0.10$  和  $R_f=0.75$  新增两条谱带,其余谱带 IOD 值都较 CK 组低,酶带颜色较浅,酶活性小;L 组与 CK 组相比,在  $R_f=0.75$  处增加了一条弱活性酶带,IOD 值较 CK 组大,颜色较深,酶活性强;而 BL 组与 B 组酶带数均为 9 条,由于 IOD 值大多数比 B 组大,酶带颜色深,酶活性高。说明 He-Ne 激

光能有效地促进基因的表达和代谢过程。

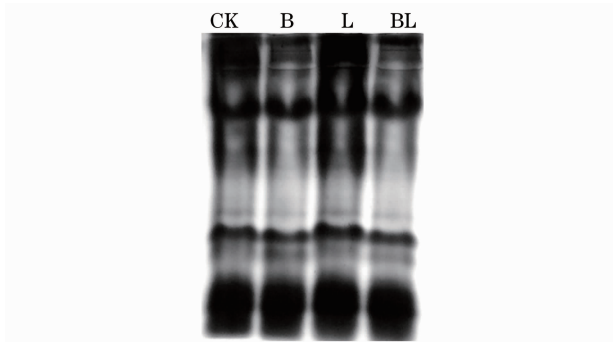


图 1 不同处理小麦叶片 POD 同工酶酶谱  
Fig. 1 Peroxidase isoenzymes patterns of wheat leaves under different treatments

表 1 不同处理小麦叶片 POD 同工酶酶谱的扫描分析  
Table 1 Peroxidase isoenzymes analyses of wheat leaves under different treatments

Number	Mobility $R_f$	IOD			
		CK	B	L	BL
1	0.10		377		470
2	0.15	1209	278	393	431
3	0.18	523	246	451	242
4	0.29	1091	882	377	1235
5	0.43	830	337	1090	425
6	0.62	153	77	950	79
7	0.69	721	508	138	540
8	0.75		331	774	220
9	0.90	2425	2227	2490	2359

### 3.2 不同处理组小麦叶片过氧化氢同工酶电泳凝胶图谱

对小麦叶片过氧化氢 (CAT) 同工酶酶谱测试结果表明 (图 2 和表 2), 4 组处理出现 3 条 CAT 同工酶谱带, 谱带数没有变化。与 CK 组相比, B 组 IOD 值变小, 酶带着色较浅, 活性就弱; L 组 IOD 值都升高, 酶活性增大; BL 组 IOD 值明显高于 B 组,

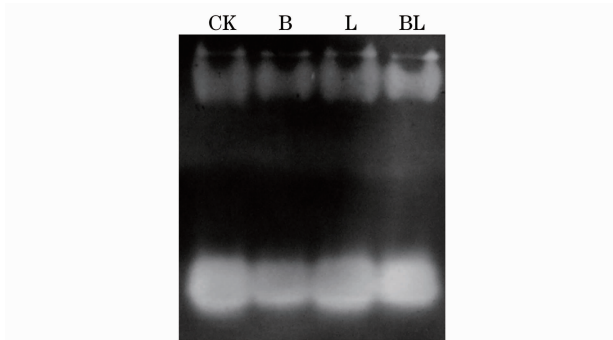


图 2 不同处理小麦叶片 CAT 同工酶酶谱  
Fig. 2 Catalase isoenzymes patterns of wheat leaves under different treatments

酶带着色深, 酶活性大, 这是生物体为了适应逆境所做生理调控, 最终反映在分子水平上, 因此同工酶的基因表达就会有所变化, UV-B 处理后基因表达受到抑制, 而一定剂量的 He-Ne 激光辐照又解除了这种抑制。

表 2 不同处理小麦叶片 CAT 同工酶酶谱扫描分析  
Table 2 Catalase isozymes analyses of wheat leaves under different treatments

Number	Mobility $R_f$	IOD			
		CK	B	L	BL
1	0.12	58	46	104	86
2	0.20	428	412	489	661
3	0.75	2071	1534	2044	1944

### 3.3 不同处理组小麦叶片酯酶同工酶电泳凝胶图谱

进一步分析小麦幼苗的酯酶 (EST) 同工酶酶谱变化情况 (图 3) 和  $R_f$  及 IOD 值 (如表 3 所示)。结果表明, 4 组处理均出现了 5 条同工酶谱带, EST 酶谱趋于相同。与 CK 组相比, B 组各酶带 IOD 值均低, 酶带着色较浅, 说明经 UV-B 辐射处理后, EST 酶活性大大减弱; 而 L 组各酶带 IOD 值均高于 CK 组, 酶活性增强。BL 组 IOD 值与 B 组相比, 部分酶

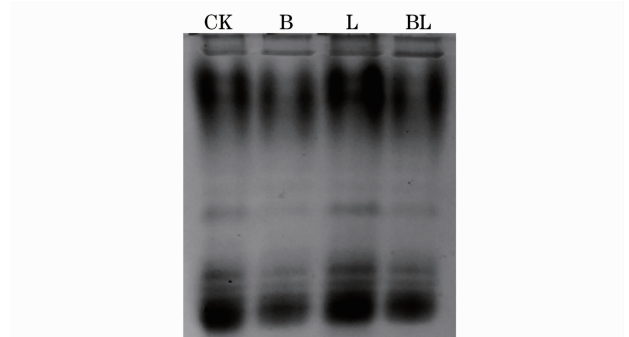


图 3 不同处理小麦叶片 EST 同工酶酶谱  
Fig. 3 Esterase isozymes patterns of wheat leaves under different treatments

表 3 不同处理小麦叶片 EST 同工酶酶谱扫描分析  
Table 3 Esterase isozymes analyses of wheat leaves under different treatments

Number	Mobility $R_f$	IOD			
		CK	B	L	BL
1	0.13	81	52	69	98
2	0.26	1243	947	1479	1192
3	0.60	78	22	86	47
4	0.78	200	94	248	111
5	0.86	770	495	797	491

带活性增强,仅有  $R_f=0.86$  的酶带变化不明显,  $R_f=0.13$  的酶带 IOD 值大,且较所有处理组的都强。

### 3.4 不同处理组小麦叶片三磷酸腺苷酶同工酶电泳凝胶图谱

由表 4 可知,各处理组都有 3 条酶带,谱带数量相同。但各处理组小麦叶片三磷酸腺苷酶(ATPase)同工酶谱间存在明显的差异(图 4),B 组和 BL 组的酶带强度都较对照弱;L 组酶带强度增加。就其 IOD 值分析可以看出, B 组和 BL 组的 IOD 值均较对照低,但 BL 组的 IOD 值略高于 B 组,酶带颜色加深。L 组 IOD 值高于 CK 组,酶带颜色加深。

表 4 不同处理小麦叶片 ATPase 同工酶酶谱扫描分析

Table 4 ATPase isozymes analyses of wheat leaves under different treatments

Number	Mobility $R_f$	CK	B	L	BL
		IOD			
1	0.17	1463	543	1480	966
2	0.36	401	19	690	74
3	0.55	816	124	868	228

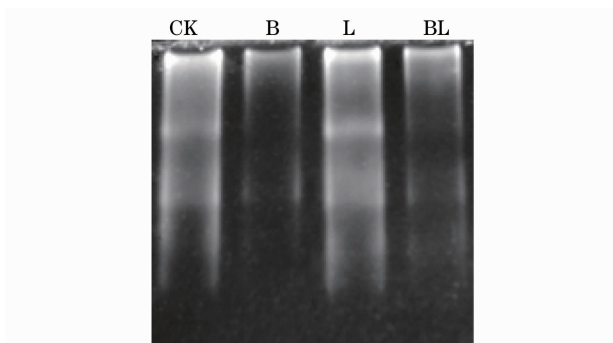


图 4 不同处理小麦叶片 ATPase 同工酶酶谱  
Fig. 4 ATPase isozymes patterns of wheat leaves under different treatments

### 3.5 不同处理组小麦叶片苹果酸脱氢酶同工酶电泳凝胶图谱

图 5 是各组处理下小麦叶片苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶的电泳图谱。结果表明,各处理组均有 4 条 MDH 同工酶谱带,与对照无明显差异。与 CK 组相比,B 组辐射处理后,部分酶带减弱,少数酶带增强。经 He-Ne 激光处理的小麦 IOD 值与对照 CK 组比较可知,都比 CK 组大,MDH 同工酶酶带均着色深,酶活性增强。复合处理后,在  $R_f=0.51$  处的酶带活性表达较强,  $R_f=0.65$  酶带次之,另外两组酶带均较弱,激光辐照过程,有可能促进了同工酶基因表达,这有待于进一步讨论。

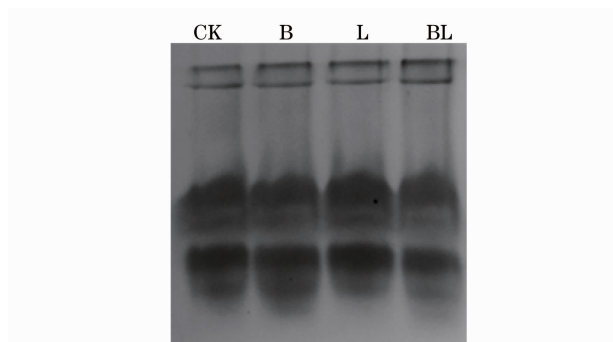


图 5 不同处理小麦叶片 MDH 同工酶酶谱  
Fig. 5 Malate dehydrogenas isozymes patterns of wheat leaves under different treatments

表 5 不同处理小麦叶片 MDH 同工酶酶谱扫描分析

Table 5 Malate dehydrogenas isozymes analyses of wheat leaves under different treatments

Number	Mobility $R_f$	CK	B	L	BL
		IOD			
1	0.15	54	76	85	104
2	0.20	51	51	59	69
3	0.51	615	533	713	502
4	0.65	553	659	600	478

同工酶是基因表达的产物,因而利用同工酶分析能够比较直接地判断基因的存在及其表达规律<sup>[15]</sup>。同工酶作为植物体内最活跃酶之一,它的合成和活性始终受到体内遗传基因的控制和调节。不良环境的影响常引起基因的变异而导致酶结构及其活性的改变,这种改变反映在同工酶的酶谱上便出现了不同数量及不同迁移率的谱带。因此,从同工酶的分析中可以初步了解各种植物对不良环境的适应情况及基因的变异情况<sup>[16]</sup>。

UV-B 照射后导致小麦叶片中 CAT, CET, ATPase, MDH 同工酶的表达量减少,酶活性减弱,但未诱导出新的同工酶类型,这可能是由于 UV-B 辐射控制了这些酶的基因表达,使这些酶的基因被抑制而合成减弱。POD 同工酶被认为是对环境条件变化反应最为灵敏的一种酶,当植物受病菌、高浓度盐和射线等不良环境因子伤害时,会诱导产生新的同工酶谱带或使同工酶带减少。研究发现,小麦叶片经 UV-B 照射后,POD 同工酶的组分发生了变化,新增了两条酶带,而其他酶带的强度减弱,说明 UV-B 照射使 POD 同工酶的基因发生了变异,影响了正常基因的转录和表达。产生新酶带的原因可能是 UV-B 辐射增强导致某些基因的表达减弱而产生的暂时性补偿,以适应不良的环境;也可能是 UV-B 辐射增强影响了合成酶的调节基因,使酶的合成过

程发生改变;也可能是它有多多个同工酶基因位点,在一般情况下部分位点不表达,而在遭遇逆境(如 UV-B 辐射)时这些位点的基因被激活表达而产生新酶带。

He-Ne 激光辐射植物可能通过热效应、光效应、电磁效应和压力效应等多种效应的协同作用改变植物体内基因表达。小麦经过 He-Ne 激光处理后,POD 同工酶增加了一条弱活性酶带,说明 He-Ne 激光促进了植物体内 POD 同工酶的基因表达,而其他同工酶的谱带数目没有变化,但这些同工酶的活性都明显增强,说明基因表达也明显增强。复合处理后这些同工酶的谱带加深,活性也大大增强,增强了植物的抗逆性。说明 UV-B 辐射抑制了这些酶相关基因的表达,而经过一定剂量的 He-Ne 激光辐照又激活了这些基因而使其大量表达。可见,He-Ne 激光可以通过改变某些酶的基因表达调控,促进植物体内同工酶合成,来提高植物体的代谢水平,增强植物的抗逆性。

## 4 结 论

通过研究 He-Ne 激光辐照和增强 UV-B 辐射下的小麦叶片同工酶谱的变化,发现 UV-B 照射引起小麦叶片某些基因表达改变,可能是植物体在逆境环境中诱导了某些基因的表达而相应关闭了部分基因的表达,以提高植物的抗逆性来适应逆境环境下细胞内特殊的代谢反应。一定剂量的 He-Ne 激光辐射可调控植物的基因表达,并诱导相关基因的大量表达来提高酶的活性,以达到防护 UV-B 辐射对植物的伤害。

## 参 考 文 献

- M. C. Carlos, J. M. Moutinho-pereira, J. F. Coutinho *et al.*. Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a mediterranean field study [J]. *Europe J. Agronomy*, 2005, **22**(3): 337~347
- P. H. Donat, P. S. Rajeshwar. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact [J]. *Mutation Research*, 2005, **571**(11): 221~233
- Y. Wang, N. Zhang, W. Y. Qiang *et al.*. Effects of reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation on pollen germination and pollen tube growth of six alpine meadow annual species [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, **57**(6): 296~302
- Wang Xunling. Research advances about effects of enhanced UV-B radiation on plants and ecosystems [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, **22**(3): 670~681  
王勋陵. 增强紫外 B 辐射对植物及生态系统影响研究的发展趋势[J]. *西北植物学报*, 2002, **22**(3): 670~681
- Zhao Binqun, Li Qiaoying, Yan Yuntong *et al.*. The effects of the POD activity and isoenzymes in mung bean seedlings after by pergravity treatment[J]. *J. Shanxi Agricultural Sciences*, 2008, **36**(8): 36~37  
赵彬全, 李巧英, 杨运通等. 超重力处理对绿豆幼苗过氧化物酶活力及同工酶的影响[J]. *山西农业科学*, 2008, **36**(8): 36~37
- Tian Jiang, Liao Hong, Wang Xiurong *et al.*. Phosphorus starvation-induced expression of leaf acid phosphatase isoforms in soybean[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(9): 1037~1042
- Qi Zhi, Yue Ming, Wang Xunling *et al.*. Protect effect of He-Ne laser pretreatment on broad bean seeding damage by UV-B radiation[J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(1): 91~94  
齐智, 岳明, 王勋陵等. 激光对蚕豆幼苗紫外线 B 辐射损伤的防护作用[J]. *中国激光*, 2002, **A29**(1): 91~94
- Chen Yiping, Yue Ming, Wang Xunling. Influence of He-Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of isatis indogotica [J]. *Plant Science*, 2005, **168**(9): 601~606
- Xu Li, Cai Suwen, Zhao Guifang *et al.*. Research on the effect of He-Ne laser irradiation on  $\alpha$ -amylase and phosphorylase of corn seedlings[J]. *Applied Laser*, 2002, **22**(6): 569~572  
徐莉, 蔡素雯, 赵桂仿等. He-Ne 激光辐射对玉米幼苗  $\alpha$ -淀粉酶和磷酸化酶的影响[J]. *应用激光*, 2002, **22**(6): 569~572
- Zhang Juan, Han Rong. Study on the nuclease of wheat seedling under He-Ne laser and ultraviolet-B radiation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2619~2624  
张娟, 韩榕. He-Ne 激光和 UV-B 辐射对小麦幼苗核酸酶的影响 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2619~2624
- Guo Junyu, Han Rong. Effects of He-Ne laser on thylakoid membrane characteristic of wheat seedling exposed to enhanced UV-B radiation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(3): 758~764  
郭君瑜, 韩榕. He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射小麦类囊体膜特性的影响 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(3): 758~764
- Han Rong, Wang Xunling, Yue Ming *et al.*. The influence of He-Ne laser irradiation on the damage and repair of wheat seedling by enhanced UV-B radiation [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2001, **30**(10): 1182~1187  
韩榕, 王勋陵, 岳明等. He-Ne 激光对小麦幼苗增强 UV-B 辐射损伤修复的影响[J]. *光子学报*, 2001, **30**(10): 1182~1187
- Hu Nengshu, Wan Guoxian. Isozyme Electrophoretic Techniques and Applications [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1985  
胡能书, 万国贤. 同工酶电泳技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985
- Peng Yongkang, Hao Sicheng. The changes in ATPase isozymes and relationship to low temperature injury in maize sorghum and brassia seedlings[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 1995, **15**(4): 294~300  
彭永康, 郝泗城. 低温对玉米、高粱和白菜幼苗生长的伤害与 ATPase 同工酶变化的关系[J]. *西北植物学报*, 1995, **15**(4): 294~300
- Yang Xuefeng, Chen Fengzeng. Effect of cadmium on crop seed germination and young seedling growth and two isozymes [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, **35**(20): 6034~6035  
杨学峰, 陈凤曾. 镉对农作物种子萌发, 幼苗生长及 2 种氧化酶同工酶的影响[J]. *安徽农业科学*, 2007, **35**(20): 6034~6035
- Zhang Meiping, Shan Yongjie, Wang Xiaohua *et al.*. Influence of He-Ne laser radiation on the ATPase activity of wheat seedling by enhanced ultraviolet-B radiation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(9): 2455~2459  
张美萍, 陕永杰, 王小花等. He-Ne 激光对增强紫外线-B 辐射小麦叶片胞质 ATP 酶活性的影响[J]. *中国激光*, 2009, **36**(9): 2455~2459