

文章编号: 1000-3142(2000)02-0172-05

离子注入对萝卜过氧化物酶、淀粉酶 和蛋白酶同工酶的影响

S631.103.6

李金亭, 朱命炜[✓], 魏明卉, 徐润华, 王林嵩

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002)

摘要: 研究了氮离子和氩离子注入萝卜种子对萝卜幼苗蛋白含量、过氧化物酶活性及过氧化物酶、淀粉酶和蛋白酶同工酶的影响。结果表明: 离子注入后, 减低萝卜过氧化物酶活性和蛋白含量。萝卜不同生长期同工酶变化不一样。在子叶时期, 过氧化物酶同工酶谱带无明显变化, 淀粉酶同工酶有酶带的消失; 而在真叶时期, 过氧化物酶在负极区减少一条酶带, Rf 为 0.22, 正极区增加一条酶带, Rf 为 0.6, 且随剂量增加, 酶带着色增强; 淀粉酶同工酶在注入剂量为 $5 \times 10^5 \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时, 有同工酶带增加, Rf 为 0.61。低剂量时蛋白酶活性增强, 谱带增多, 大剂量则减弱。因此, N^+ 和 Ar^+ 注入后, 可影响萝卜过氧化物酶和淀粉酶的表达及蛋白质的合成或降解。

关键词: 离子注入; 萝卜; 可溶性蛋白; 过氧化物酶; 淀粉酶; 蛋白酶

品种改良, 同工酶分析

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A

Effects of ion implantation on peroxidase, amylase and protease isoenzyme in radish

LI Jin-ting, ZHU Ming-wei, WEI Ming-hui,
XU Run-hua, WANG Lin-song

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, 453002, China)

Abstract: The effects of ion implantation on contents of soluble protein, activities of peroxidase and peroxidase, amylase and protease isoenzyme pattern in radish were studied. The results show that: after ion implantation, contents of soluble protein and activities of peroxidase in the experimental group are apparently lower than in the control group. Besides, there are differences of isoenzyme pattern during different growth period. During cotyledon period, peroxidase isoenzyme pattern had not obviously changed, but a band of amylase isoenzyme pattern disappeared. During euphyllis period, a band (Rf 0.22) of peroxidase isoenzyme disappeared in the positive electrode area, and the intensity of peroxidase isoenzyme band is enhanced as the ion implantation dose increased. A new band (Rf: 0.61) of amylase isoenzyme has been occupied at the ion implantation dose of $5 \times 10^5 \text{ N}^+/\text{cm}^2$. Low dose of ion

收稿日期: 1999-10-08

作者简介: 李金亭 (1962-), 女, 实验师, 在中心实验室从事生物科研工作。魏明卉现工作单位: 南阳师专。

基金项目: 河南省教委自然科学基金资助项目 (1999180016)

implantation could enhance activity and increase bands of protease isoenzyme. These suggest that, N^+ and Ar^+ ion implantation can affect the expression of peroxidase or amylase and the synthesis and degradation of proteins.

Key words: Radish; ion implantation; soluble protein; peroxidase; amylase; protease.

同工酶分析是现代遗传、生理生化研究的重要手段之一, 大量研究已证实过氧化物酶作为一种适应性酶, 能反映植物生长发育的特点、体内状况以及对外界环境的适应性^[1]。离子束作为一种新技术应用于生物品种改良的研究是由中国科学院等离子体物理研究所于 1986 年开创的, 这些年来, 这方面的研究在理论和实际应用上都取得了一定进展, 研究对象包括植物、动物、微生物^[2]。将离子注入应用于水稻、蕃茄、小麦、棉花、玉米、烟草、等品种改良, 取得了不同程度的进展^[3], 但离子注入萝卜种子引起诱变在国内尚未报道。

本实验是用 N^+ 和 Ar^+ 注入萝卜种子对其进行研究, 以观察离子注入对蔬菜产生的生物学效应, 为蔬菜品种改良提供科学依据。

1 材料及方法

1.1 样品制备

所用材料为辽宁蔬菜种子子公司产的 501 水萝卜。经郑州大学离子束生物工程实验室用 TTTAN 离子注入机对 501 水萝卜种子进行 N^+ 和 Ar^+ 注入处理。处理剂量详见表 1。

以未经处理的萝卜种子作为对照, 处理后种子分别进行室内培养及大田种植。

1.1.1 室内培养 将对照和离子束处理的种子分别放置以沙石作为培养基的培养皿中, 保持一定的湿度, 温度维持在 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 左右, 培养 10 d, 幼苗长至 $6\sim 7\text{ cm}$, 子叶完全伸展, 分别取各培养皿中的子叶 3 g 和茎

6 g, 按 3:1 比例加入 $\text{pH}7.0$ (0.01 mol/L) PBS 缓冲液, 加石英砂后冰浴研磨成匀浆, $1\ 000\text{ r/min}$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液放入 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.1.2 大田种植 待种子萌发长至 5 片真叶时, 取对照及 N^+ 离子注入组的样品各 5 个样品, 样品与缓冲液比例为 3:1, 加石英砂后, 冰浴研磨成匀浆, $1\ 000\text{ r/min}$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液放入 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 过氧化物酶及淀粉酶同工酶测定

过氧化物酶、淀粉酶同工酶分析采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 8%。过氧化物酶同工酶分析时, 加样量为 $120\ \mu\text{L}$ (鲜重), 淀粉酶同工酶分析加样量为 $140\ \mu\text{L}$ (鲜重)。电泳开始时电压为 100 V, 待指示剂进入分离胶后, 电压调至 200 V, 指示剂距胶板前沿 1 cm 左右时, 停止电泳。过氧化物酶、淀粉酶同工酶染色方法参照胡能书^[4]方法并做改进。

1.3 蛋白含量、酶活测定

可溶性蛋白含量及过氧化物酶酶活测定方法参照张龙^[5]方法并做改进。

1.4 蛋白酶同工酶测定

按 Neuhaus-Steinmetz^[6]等的活性电泳 (G-PAGE) 方法进行。将 0.083% 的明胶共聚于

表 1 不同离子注入剂量
Table 1 Dose of different ion beam implantation

离子种类 Ion kind	能量 Endrgy	离子注入剂量 (N^+ (Ar^+)/ cm^2) Ion implantation dose		
N^+	30 KeV	5×10^5	10×10^5	15×10^5
Ar^+	30 KeV	5×10^5	10×10^5	15×10^5

10%聚丙烯酰胺凝胶里,在4℃进行电泳。电泳毕,将胶板放入洗涤液中(3.03g Tris-base, 12 mL TritonX-100, 500 mL 双蒸水, pH7.0) 30 min, 每5 min 振荡1次, 然后用双蒸水洗3次。洗毕将胶板放入孵育液中(0.1 mol/L glycine, 5 mmol/L CaCl₂, pH 分别为4.0、7.0、8.5) 37℃ 24 h, 按 Laemmli^[7]方法固定、染色、脱色。

2 结果

2.1 离子注入对萝卜幼苗可溶性蛋白含量的影响

离子注入后,室内培养和大田种植的各处理组可溶性蛋白含量均比正常对照组蛋白含量显著降低。随剂量增加,各处理组蛋白含量变化不明显。详见图1。

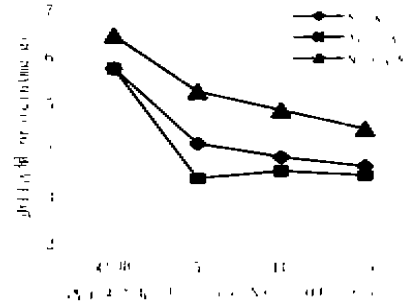


图1 不同离子束处理对萝卜蛋白含量的影响
Fig.1 Effect of treatment of different ionic bunch on the contents of protein in radish

2.2 离子注入对过氧化物酶活性的影响

离子注入随剂量的增加过氧化物酶比活逐渐降低, 5 × 10⁵ N⁺/cm² 剂量注入引起酶比活下降了34.2%, 10 × 10⁵ N⁺/cm² 剂量注入引起酶比活下降了35.1%, 15 × 10⁵ N⁺/cm² 剂量注入引起酶比活下降了35.9%。详见图2。

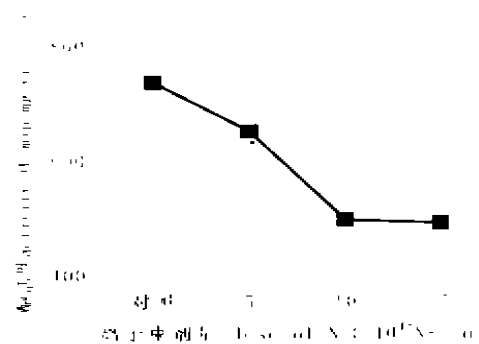


图2 N⁺处理对POD活性影响
Fig.2 Effect of N⁺ treatment on activity of POD in radish

2.3 离子注入对过氧化物酶和淀粉酶同工酶谱的影响

2.3.1 离子注入对淀粉酶同工酶谱和影响 室内培养:由淀粉酶同工酶电泳染色结果来看,在子叶酶谱中,与对照相比,离子束处理后消失一条酶带, Rf 为 0.22, 茎酶谱变化则不明显。大田种植:与对照相比,低剂量离子束处理后在该区出现一条新的同工酶带, Rf 为 0.61。详见图3、图4。

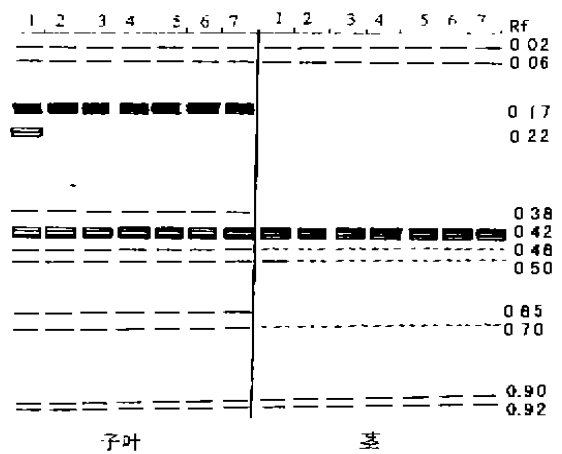


图3 离子注入后萝卜子叶淀粉酶同工酶谱
Fig.3 Amylase isoenzyme pattern of PAGE in cotyledon of radish after ionic treatment

2.3.2 离子注入对过氧化物酶同工酶谱的影响 室内培养:子叶、茎过氧化物酶同工酶谱均有不同程度的变化。离子注入后, Rf 为 0.3 的子叶酶带除 5 × 10⁵ N⁺/cm² 和 10 × 10⁵ Ar⁺/cm² 外均比对照着色浅, 15 × 10⁵ N⁺/cm² 和 10 × 10⁵ Ar⁺/cm² 两个剂量注入后, Rf 为 0.37 的子叶酶带比对照及其他处理着色深。茎同工酶中, Rf 为 0.3 的茎酶带中除 5 × 10⁵ N⁺/cm² 和 10 × 10⁵ Ar⁺/cm² 处理外, 其他处理着色与对照相比无明显变化。详见图5。

大田种植:经离子注入后, Rf 为 0.22 酶带消失, 增加一条新同工酶带, Rf 为 0.6, 且

随剂量增加，该酶带酶活有增加趋势。详见图 6。

2.4 离子注入对蛋白酶同工酶的影响

氮离子注入后，经大田种植的萝卜真叶的蛋白酶同工酶谱与淀粉酶同工酶谱变化类似，即小剂量注入可以引起酶活性增加，谱带增多；随剂量增加，酶活性降低，谱带减少；蛋白酶同工酶的最适 pH 为 7.0。详见图 7。

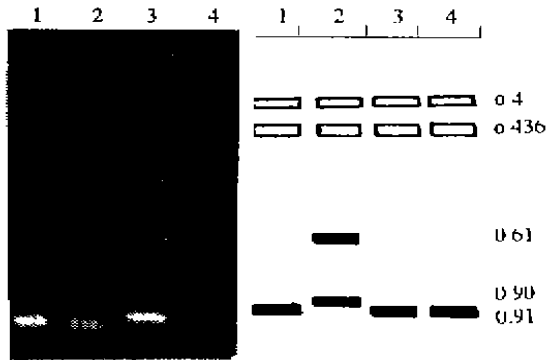


图 4 离子注入后萝卜真叶淀粉酶同工酶谱
Fig. 4 Amylase isoenzyme pattern of PAGE in euphyllis of radish after ionic treatment

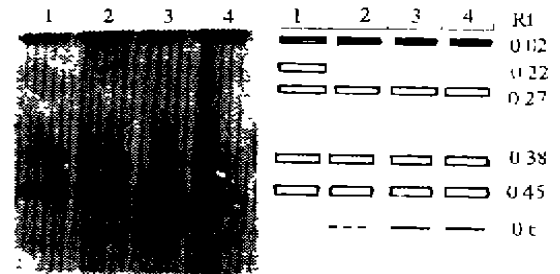


图 5 离子注入后萝卜子叶过氧化物酶同工酶谱
Fig. 5 Peroxidase isoenzyme pattern of PAGE in euphyllis of radish after ionic treatment

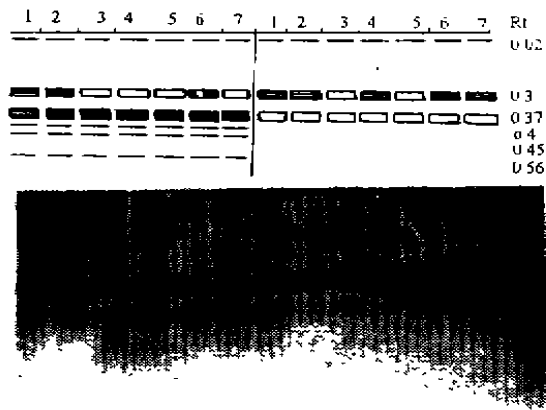


图 6 离子注入后萝卜真叶过氧化物酶同工酶谱
Fig. 6 Peroxidase isoenzyme pattern of PAGE in euphyllis of radish after ionic treatment

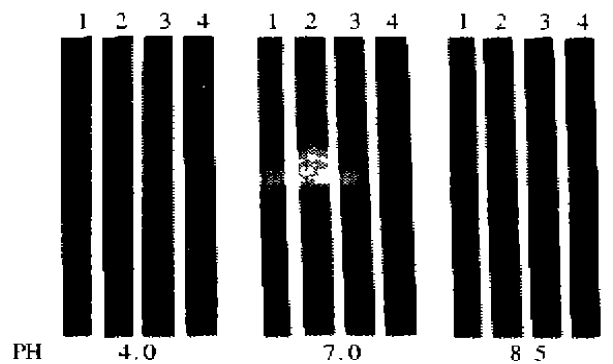


图 7 离子注入后萝卜真叶蛋白酶同工酶谱
Fig. 7 Protease isoenzyme pattern of PAGE in euphyllis of radish after ionic treatment

3 讨 论

利用离子注入的生物效应用于诱变育种，已在我国取得长足进展。低能离子在与靶分子作用时，可由于碰撞将电荷传递给靶分子，引起其化学结构变化，从而导致 DNA 突变和防止 DNA 双链断裂，产生基因表达的变化^[8]，这种变异表现在子代可以产生新的品种，在受照射的当代可以引起蛋白质生物学性质的改变。本实验表明：在离子注入后，实验组蛋白含量明显低于对照组，有可能是由于离子注入后使蛋白质合成减少或分解增强，同样我们也发现过氧化物酶活性在处理组明显低于对照组。离子注入造成的是局部损伤^[9]，因此照射部位对引起

生化、遗传变化应是举足轻重的。程备久等人^[10]报道：经离子注入的花粉管出现畸形，过氧化物酶活性增强与注入剂量成正比，而在本实验中，过氧化物酶活性在不同个体间存在明显差异，总趋势是在离子注入后不同生长时期表现不一样。不同离子注入也不同，在子叶时期，在 $15 \times 10^5 \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量有增强过氧化物酶活性，而在 $10 \times 10^5 \text{ Ar}^+/\text{cm}^2$ 有增加过氧化物酶活性，对同工酶谱带数且无影响，而在真叶时期表现为负极区消失一条酶带，正极区增加一条酶带，并随剂量的增加而活性增强。淀粉酶同工酶则表现为子叶时期有同工酶带的消失，而真叶时期在 $5 \times 10^5 \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量时有同工酶带的增加。蛋白酶也有类似变化，表明氮离子注入后对萝卜体内的水解代谢有显著影响，低剂量的氮离子注入可引起淀粉酶和蛋白酶同工酶谱带增多和活性增加，大剂量可使谱带减少、活性减弱的现象说明低剂量的氮离子注入对萝卜体内分解代谢有促进作用，有可能为损伤修复提供能量及清除变性之蛋白质。已有报道^[11]，只有在离子注入达种子胚后才能产生诱变，本实验也证明离子注入后由于注入部位不同，不同个体之间产生的变化不一，产生酶谱带变化的则有可能是离子注入引起 DNA 的变化，而仅有酶活性改变的则有可能是离子注入所导致的蛋白质结构与生物功能的变化。若要达到诱变育种的目的，则需用大剂量的离子注入，而小剂量离子注入则有可能为改善植物生长发育提供新途径。

由于离子注入是一门新技术，其作用机理尚未完全清楚，同时在生物体发育的不同时期同工酶谱本身存在着差异，而且离子注入在不同个体之间存在差异，因此在以同工酶作指标时，其取材时间及部位均需精确确定。

参考文献：

- [1] 慎 玫, 王彩莲, 徐 刚等. 辐射对大麦过氧化物酶同工酶影响的初步研究 [J]. 遗传, 1991, 13 (1): 7~9
- [2] 江泽慧, 彭镇华. 离子束应用于生物品种改良的研究进展 [J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21 (3): 295~298
- [3] 李 圣, 赵 环, 吴 健等. 低能氮离子注入诱变在家蚕育种上应用研究初报 [J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21 (3): 326~329
- [4] 胡能书, 万国贤. 同工酶技术及其应用 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 150~154
- [5] 张龙翔等, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 (第二版) [M]. 高等教育出版社, 1997, 178~180
- [6] Neuhaus-Steinmetz U, Xu C-S, Fracella F *et al.* Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cell: structure-activity relationship in different alcohol [J]. *Molecular Pharmacology*, 1994, 45 (1): 36
- [7] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227 (august): 680
- [8] 安道昌, 徐新来, 李 青等. 生物技术在 21 世纪农业发展中的地位 and 作用 [J]. 高技术通讯, 1997, 10
- [9] 余增亮, 邱勋俭, 霍裕平. 离子注入生物效应及育种研究进展 [J]. 安徽农学院学报, 1991, 18 (4): 251~257
- [10] 程备久, 李 展, 田秋元等. 氮离子注入对棉花花粉形态和生活力及育性的影响 [J]. 西北植物学报, 1994, 14 (2): 85~89
- [11] 余增亮. 离子束与生命科学一个新的研究领域 [J]. 物理, 1997, 26 (6): 333