

# N<sup>+</sup> 离子注入对小麦不同部位 POD 同工酶的影响

赵俊杰<sup>1</sup>, 黄中文<sup>1</sup>, 姬生栋<sup>2</sup>, 赵元增<sup>1</sup>, 李友勇<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院 生命科技学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453002)

**摘要:** 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 研究了离子注入处理后的小麦种子抗白-781 萌发时期根、叶片、胚、胚乳中 POD 同工酶的变化。结果表明: 离子注入可引起小麦抗白-781 的不同器官中 POD 酶带与酶活性的不同变化。其中, 根中 POD 同工酶变化最为明显。

**关键词:** N<sup>+</sup> 离子注入; 小麦; POD 同工酶

**中图分类号:** S512.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0035-03

自从 1986 年中国科学院等离子体研究所首次将离子束应用于生物品种的改良后, 离子注入技术以其损伤轻、突变率高、突变谱广等特点越来越受到人们的重视, 不断为农业生产提供高产、优质、多抗的新品种和新基因材料<sup>[1]</sup>。离子注入技术成功地应用于作物的遗传改良, 吸引了大量科技工作者进行此方面的研究, 在水稻<sup>[2,3]</sup>、玉米<sup>[4]</sup>、棉花<sup>[5,6]</sup>、小麦<sup>[7,8]</sup>已取得了一定的成绩, 但是从分子水平和细胞水平研究的报道还较少。离子诱变的原因都基于离子注入引起的核苷酸中碱基的损伤和磷酸戊糖键的断裂, 从而导致 DNA 遗传密码的改变和 DNA 双链的

断裂<sup>[9]</sup>。同工酶作为基因功能的直接表达者, 能够反映出遗传信息的改变, 从而可从分子水平鉴别许多从外部形态难以鉴别的遗传突变。本研究利用同工酶技术, 研究了离子注入后小麦不同部位 POD (过氧化物酶)同工酶的变化, 旨在为离子注入技术应用于小麦的诱变育种提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试小麦材料为抗白-781, 由河南科技学院小麦育种研究中心茹振钢教授提供。

收稿日期: 2008-06-15

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0511020600); 河南科技学院重点资助项目(020018)

作者简介: 赵俊杰(1974-), 女, 河南新乡人, 讲师, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究工作。

- [7] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA[J]. 棉花学报, 2007, 19(1): 69-70.
- [8] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 1039-1044.
- [9] 梁德勇, 王晓民, 崔振中, 等. 银染 mRNA 差异显示方法的条件优化[J]. 中国神经科学杂志, 1999, 15(2): 151-155.
- [10] 胡根海. 棉花 Cu/Zn-SOD 基因的克隆与表达的初步研究[D]. 安阳: 中国农业科学院棉花研究所, 2006.
- [11] Lohmann J, Schickle H, Bosch T C. REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation[J]. Bio Techniques, 1995, 18(2): 200-202.
- [12] Doss R P. Differential display without radioactivity—a modified procedure[J]. Bio Techniques, 1996, 21(3): 408-410, 412.
- [13] Liang P, Zhu W, Zhang X, et al. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 5763-5764.
- [14] Simon H G, Oppenheimer S. Advanced mRNA differential display: isolation of a new differentially regulated myosin heavy chain-encoding gene in amphibian limb regeneration[J]. Gene, 1996, 172(2): 175-181.
- [15] Schlegel J, Vogt T, Munkel K, et al. DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR)[J]. Bio Techniques, 1996, 21(2): 178-180.
- [16] Murray V. Improved double stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(21): 88-89.
- [17] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196(1): 80-83.

1.2 方法

1.2.1  $N^+$  离子束注入  $N^+$  离子束注入在郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室进行, 选用 30 keV 的  $N^+$  离子处理小麦干种子, 注入剂量为  $5 \times 10^{17} N^+ / cm^2$ 。每份材料处理 1000 粒种子, 以未处理的种子作为对照。

1.2.2 种子消毒 将选好的小麦籽粒放入 0.1% 的氯化汞溶液中浸泡 15 min 进行消毒处理, 用双蒸水冲洗干净, 然后放在盛有双蒸水的烧杯中浸泡 12 h。

1.2.3 种子培养 将浸泡好的小麦籽粒均匀摆放在洁净的培养皿内的滤纸上, 每天浇适量双蒸水使滤纸保持一定的水分, 然后在室温下培养。

1.2.4 取材 小麦培养 5 d 后, 当叶片刚展开, 根长到 3 cm 左右时, 分别剪去根和叶片, 剥取胚和胚乳。

1.2.5 酶液的提取 将所取材料称重, 置一预冷的研钵中, 加入 5 倍体积预冷的 0.1 mol/L (pH 8.2) 的 Tris-柠檬酸缓冲提取液, 在冰浴 (4℃) 上研磨成匀浆。4℃下, 以 12 000 r/min 的速度离心 15 min 后, 取上清液分装于 EP 管中, 放入 -20℃ 的冰箱中保存备用。

1.2.6 同工酶分离 采用垂直板聚丙烯酰胺不连续非变性电泳技术分离同工酶。用 0.5 mol/L (pH 8.8) Tris-Gly 作缓冲系统。分离胶浓度 8%, 浓缩胶浓度 4%, 制备方法参考郭尧君著的《蛋白质电泳实验技术》<sup>[19]</sup>。点样量: 胚为 20 μL, 叶片和根为 30 μL, 胚乳为 40 μL。采用稳压式电泳, 电泳开始时电压为 100 V, 溴酚蓝跑过浓缩胶时, 将电压调至 200 V, 待前沿指示剂溴酚蓝距离分离胶下缘 1~2 cm 时, 停止电泳, 去掉浓缩胶, 切除溴酚蓝以下部分, 用双蒸水冲洗胶板 1~2 次。

1.2.7 染色 用醋酸联苯胺法染色, 方法参照胡能书等的《同工酶技术及应用》<sup>[11]</sup>, 略有改动。

1.2.8 酶谱记录 凝胶板染色后立即照相, 根据胶板计算迁移率, 迁移率 = 固定染色后凝胶中酶蛋白区带的迁移距离 / 固定染色中指示剂的迁移距离, 然后根据记录进行分析。

2 结果与分析

2.1 胚中 POD 酶谱变化

由图 1 可知, 在胚中, POD 活性很强。共有 9 条酶带, 其中 Rf 值为 0.06, 0.12, 0.20, 0.74, 0.78 的 5 条酶带活性非常强, Rf 值为 0.40, 0.52, 0.60

的酶带活性稍弱, Rf 值为 0.28 的酶带活性最弱。与对照相比, 经离子注入处理后, Rf 值为 0.28, 0.52 的 2 条酶带活性稍有增强, 其余酶带活性变化不大 (图 1-1, 2)。

2.2 叶片中 POD 酶谱变化

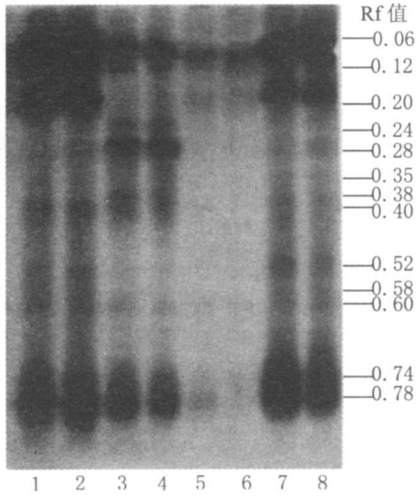
在叶片中, 共有 8 条酶带, Rf 值为 0.06, 0.12, 0.28, 0.74, 0.78 的 5 条酶带活性较强, 其余酶带活性较弱。与对照相比, 经离子注入后, 各酶带活性变化不明显, 且酶带数目没有变化 (图 1-3, 4)。

2.3 胚乳中 POD 酶谱变化

在胚乳中, 共有 Rf 值为 0.06, 0.20, 0.60, 0.78 的 4 条酶带, 与其他部位相比, 各酶带活性均较弱。与对照相比, 经离子注入后, Rf 值为 0.20, 0.78 的酶带活性减弱, 其中 Rf 值为 0.78 的酶带活性几乎消失, 另外 2 条酶带活性无明显变化 (图 1-5, 6)。

2.4 根中 POD 酶谱变化

在根中, 共有 11 条酶带, Rf 值为 0.06, 0.12, 0.20, 0.74, 0.78 的 5 条酶带活性最强, Rf 值为 0.38, 0.40, 0.52 的 3 条酶带活性次之, 其余 3 条酶带活性较弱。与对照相比, 经离子注入后, Rf 值为 0.36, 0.40 的 2 条酶带活性减弱, Rf 值为 0.28 的酶带活性增强, 且出现了一条 Rf 值为 0.58 的活性较弱的新酶带 (图 1-7, 8)。



1. 对照胚中 POD; 2. 离子注入处理的胚中 POD; 3. 对照叶片中 POD; 4. 离子注入处理的叶片中 POD; 5. 对照胚乳中 POD; 6. 离子注入处理的胚乳中 POD; 7. 对照根中 POD; 8. 离子注入处理的根中 POD

图 1 抗白 781 不同器官中 POD 酶谱的变化

3 讨论

由以上结果可知, 离子注入处理的确引起了小

麦体内 POD 同工酶的变化,这与谷运红<sup>[12]</sup>的报道是一致的。本试验中离子注入引起了发芽期抗白—781 小麦体内 POD 同工酶的变化,且对各部位产生的影响不同。经离子注入处理后,各器官 POD 同工酶变化主要表现为活性的增强或减弱,其中对叶的影响最小,叶中 POD 同工酶几乎没有什么变化;对根的影响最大,根中的 POD 同工酶不仅表现为活性的增减,而且出现了一条 Rf 值为 0.58 的新酶带。POD 同工酶广泛存在于植物体内,是一种活性较强的清除自由基的酶,与作物的生长代谢有密切关系。小麦幼苗期不同器官的功能各不相同,其代谢能力也有所不同,这可能是离子注入处理后各器官中 POD 同工酶变化存在差异的原因。离子束技术应用用于小麦诱变育种已有很多报道,但多是从外部形态或细胞水平进行的研究<sup>[13,14]</sup>,对离子注入后小麦体内分子水平变化的报道还很少<sup>[12]</sup>。过氧化酶是植物体内的抗氧化酶之一,能消除活性氧和超氧阴离子自由基对细胞造成的伤害,过氧化物酶活性的高低可以反映植物生长发育及内在代谢情况,同时也是植物抗性好坏的标志之一<sup>[15]</sup>。因此,同工酶的变化就从一个侧面反映了植物体内基因表达的改变。与通过核酸技术来对 DNA 序列变化进行精确测定相比,同工酶技术具有经济、简单等优点。离子注入后,能量的传递、原子的解离以及入射离子的沉积可导致 DNA 遗传密码的改变和 DNA 双链的断裂,从而就有可能使基因表达的产物——酶发生相应的变化。因此,同工酶技术就有可能成为从分子水平上鉴别离子注入处理后发生的真假突变的有效手段,为作物的遗传育种提供有利的帮助。

# 参考文献:

[ 1 ] 陈慧选,余增亮,陈慧平.浅谈离子束在生物品种改良上的应用[J].山西农业科学,1989,26(1):83—84.  
[ 2 ] 吴跃进,吴敬德,刘贵富,等.离子注入水稻种子萌发过

程中的自由基和 SOD 酶研究[J].作物学报,1996,22(3):320—324.  
[ 3 ] 杨美英,杨福,武志海,等.氩离子束注入对水稻幼苗生长及过氧化物酶同工酶的影响[J].吉林农业大学学报,2001,23(3):37—40.  
[ 4 ] 魏良明,蒋鸿勋,胡学安,等.植物诱变新技术及其在玉米育种上的应用[J].玉米科学,2000,8(1):19—20.  
[ 5 ] 方其英,郑冬官,黄德祥,等.棉花离子束育种 M1 成苗率的研究[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):318—320.  
[ 6 ] 周立人,范军,程备久.不同能量的氮离子注入棉花种子的诱变效应研究[J].安徽农业大学学报,1998,25(4):371—374.  
[ 7 ] 雍志华,林锡刚,汪仕元,等.利用超低能离子束处理小麦种子及其增产效应的研究[J].四川大学学报(自然科学版),2001,38(3):446—448.  
[ 8 ] 雍志华,林锡刚,汪仕元,等.超低能离子束处理小麦种子生物学效应的初步分析[J].西南农业学报,2002,15(4):119—121.  
[ 9 ] 余增亮.离子注入生物研究评述[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):221—225.  
[ 10 ] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999.  
[ 11 ] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科技出版社,1985.  
[ 12 ] 谷运红,秦广雍,霍裕平,等.低能离子注入过程中真空和注入对小麦过氧化物酶同工酶的影响[J].核技术,2005,28(6):441—444.  
[ 13 ] 卫增泉,颜红梅,张金莲,等.氮离子束对小麦种子不同部位作用的突变效应[J].激光生物学报,2003,12(1):33—42.  
[ 14 ] 柳学余,崔叶龙,陈礼文,等.离子注入小麦 M1 代形态生理效应研究初报[J].核农学报,1995,9(2):125—128.  
[ 15 ] 罗立新,孙铁珩,靳月华,等.镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累[J].环境科学学报,1998,18(5):495—498.