

激光辐照 DNA 导入番茄应用研究

邵耀椿, 杨晓锋, 丁海东

(扬州大学物理科学与技术学院, 扬州 江苏 225002)

摘要: 激光与 DNA 作用将产生非线性共振、混沌、随机共振和随机混沌等非线性现象, 使 DNA 变异、断裂。因此激光辐照 DNA 导入番茄, 有益于供体的一些显性基因性状在受体后代得到表达, 品质得到改善。对过氧化物酶同工酶的分析表明, 受体后代与受体对照的同工酶图谱差异较大而与供体对照的同工酶图谱差异较小, 这与它们在叶形与生长型表达上的差异是吻合的。这些表明了激光辐照 DNA 已经导入受体, 并得到整合表达。

关键词: 生物物理学; DNA 导入; 激光; 非线性; 性状表达; 同工酶

中图分类号: O59; Q631 **文献标识码:** A

STUDY ON INTRODUCING LASER RADIATED DNA INTO TOMATO

SHAO Yao-Chun, YANG Xiao-Feng, DING Hai-Dong

(The Physical Science and Technical College of Yangzhou University, Yangzhou 225002, China)

Abstract: Some nonlinear phenomena of nonlinear resonance, chaos, stochastic resonance and stochastic chaos occur in the laser-DNA interactive system, which make DNA mutated and broken up. The laser-radiated exogenous DNA was introduced into the tomato. It is beneficial to the expression of some characters of dominant genes of the donor and the improvement of the descendents qualities of receptors. The peroxidase isoenzyme of the donor, the receptor, and their descendents were analyzed. Our result shows that the peroxidase isoenzyme zymograms of most descendents are very similar to the donor but rather different from the receptor. The similarity of isoenzyme zymograms between descendents and donor, and the expression of external characters of donor in descendents indicate that the exogenous DNA has been successfully introduced into the receptor with the expression of exogenous DNA in descendents.

Key words: biophysics; introducing DNA; laser; nonlinear; expression of characters; isoenzyme

引言

Yomosa 等人由 DNA 分子双螺旋结构的基转子模型, 研究了 DNA 分子的孤子理论, 对 DNA 的复制、转录等遗传功能作了解释^[1]。我们也曾对 Yomosa DNA 分子的基转子模型的激光与 DNA 分子相互作用的非线性动力学方程:

$$\varphi_{tt} + \gamma\varphi_t + b \sin\varphi = E \cos\omega t \quad (1)$$

进行了非线性共振和混沌的研究^[2-3]。并对激光与 DNA 相互作用的随机动力学方程:

$$\varphi_{tt} + \gamma\varphi_t + b \sin\varphi + E \cos\omega t = \Gamma(t) \quad (2)$$

进行了势函数、遗传信息态、随机共振和随机混沌的研究^[4-5]。研究表明激光与 DNA 作用系统是非线性系统, 存在非线性共振、混沌、随机共振和随机混沌

等非线性现象。且与一些参数有关, 如激光频率、激光强度以及环境条件等。表明合宜的激光波长与剂量辐照能使 DNA 变异, 使其断裂。并用光谱分析作进一步研究, 发现理论分析得到的 632.8nm 和 660nm 波长激光辐照, 确能使 DNA 的紫外吸收峰值发生变化, 产生增色效应。而峰值波长 254nm 的紫外线辐照 DNA 产生减色效应。表明合宜波长激光能使 DNA 构型变化, DNA 发生断裂。这研究结果的实践应用有两个方面: 一个是激光直接辐照生物, 研究激光生物效应; 另一个为激光辐照外源 DNA, 导入到生物体研究生物变异, 进行选优。

花粉管通道技术是一种快速、简便、不受宿主范围限制的无载体导入法。但整体导入后的基因表达几率较低, 应用受到局限。将激光与 DNA 非线性相

收稿日期: 2003-11-11, 修回日期: 2004-02-11

基金项目: 江苏省科技攻关资助项目(BG99501-2)

作者简介: 邵耀椿(1943-), 男, 浙江绍兴人, 扬州大学物理科学与技术学院教授, 从事激光生物物理学的理论与实验研究。

Received Date: 2003-11-11, revised Date: 2004-02-11

相互作用理论,与花粉管 DNA 导入法两者相结合,既是对激光与 DNA 非线性相互作用的理论在实践上应用,也是对花粉管 DNA 通道技术的改进.激光辐照外源 DNA 导入技术,用选择合适波长和剂量的激光,辐照供体 DNA 后,由于非线性作用, DNA 断裂成片段,使得带有目的基因的 DNA 片段易于导入,导入后能利于与受体靶基因的整合和表达几率的提高.改进了原方法的缺陷,可获得更好的效果.

1 材料与方法

1.1 材料

选择哈师 5 号为受体,特性:薯叶(隐性基因,以下简称“隐”)、有限生长型(隐)、幼苗茎秆绿色(隐),单果重 120g 左右.供体为荷兰引进优良品种 EA:正常叶(显性基因,以下简称“显”)、无限生长型(显)、红果(显)、幼苗茎秆紫色(显),单果重 150-180g 左右.通过重组优良基因,使荷兰的优良品种性状转移到我国品种上来,克服荷兰优良品种不适应在我国气候和栽培条件的缺陷.同时供体的许多显性基因与受体的隐性基因正好互补,可从性状上观察到供体的显性基因性状,是否在受体上表达,能初步检察外源 DNA 导入的成功率.

1.2 DNA 导入

采用液氮冷冻法,使用氯仿和异丙醇提取 EA 幼苗茎尖生长点的 DNA,经波长为 660nm,功率为 2mw 的半导体激光辐照后作为供体.辐照时间分别为 5、10、15min,以未辐照过的 DNA 作对照,同时用 ^{60}Co 的 γ 射线辐照的 DNA 作比较.试验在 2000 年春季进行,对受体哈师 5 号花粉管,用人工注入供体 DNA.分别观察和统计后代的座果率、果形变异和结籽数等.并对各种处理所收获的种子于 2000 年秋季再分类播种,对 D_1 代的幼苗叶形进行观察和统计,以及 V_c 含量的品质指标测定.

1.3 过氧化物酶同工酶分析

电泳分析按文献^[6]所述方法进行,采取聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE),酶液制备是取番茄嫩叶 0.3g 放入预先冷却的研钵,加入提取介质($0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris - Hcl, pH7.4, 含 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cys) 1ml, 在冰浴中研磨成匀浆, 12000r/min 于 4°C 离心 10min, 上清液即为粗酶液.电极缓冲液为 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris - Hcl (pH8.0, 含 $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA), 点样量 $20\mu\text{l}$, 维持恒压于 4°C 条件下电泳,使最终达到 4000Vh. 过氧化物酶用醋酸-联苯胺液染色, 细胞色素氧化酶用二甲基对苯

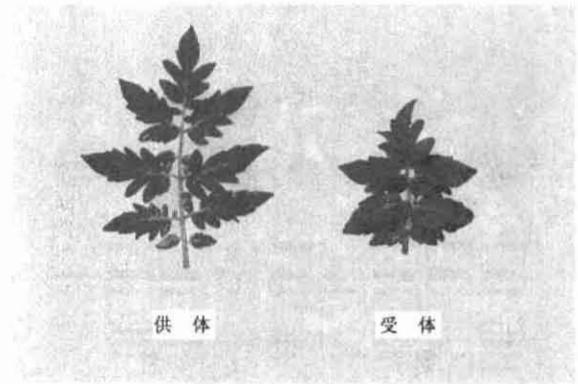


图 1 供体与受体的叶形

Fig. 1 The leaf shape of donor and receptor

二胺-萘酚液染色,脱色,扫描和拍照.

2 试验结果

2.1 激光处理对 D_0 代影响

实验表明, DNA 经激光处理导入, D_0 代的辐照时间为 5、10min 的座果率平均比对照提高 5%; 比 ^{60}Co 的 γ 射线辐照的要低 5%, 而激光处理 15min 的没有结果. 激光处理的 D_0 代结籽数很少, 为 4-8 粒左右; 对照为 2-5 粒左右; ^{60}Co γ 射线辐照的结籽数 10-20 粒左右; 自然结果的结籽数平均为 150 粒. ^{60}Co 的 γ 射线辐照的有畸形果, 如裂脐等, 而激光处理无此现象. 原因可能为高能的 ^{60}Co γ 射线照射 DNA 产生伤害, 进而对生物体造成损伤. 而红色激光波长在生物的红光效应范围内, 对生物有良好的刺激和修复作用, 因而造成了两者畸果差异.

2.2 激光处理对 D_1 代影响

从试验结果可以看出, 供体的一些显性基因性状在受体上表达出来, 如 EA 的正常叶形(显性)在

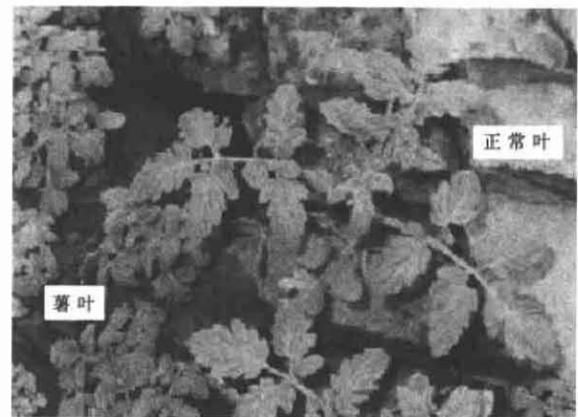


图 2 在受体群中出现了供体叶形的表达植株

Fig. 2 The appearing of the expressing plans of leaf shape of donor in receptor

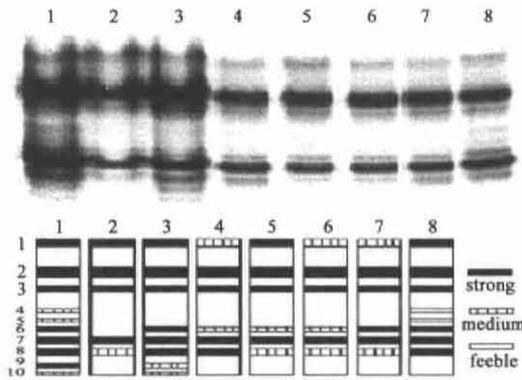


图3 供、受体及受体后代过氧化物酶同工酶电泳图谱和电泳模式图

Fig. 3 The electrophoretograms and sketch map of peroxidase isoenzymes of donor, receptor and descendants

受体上得到表达,并且EA的无限生长型(显性)也在受体上得到了表达,生长明显高于自然生长(见图1、2)。而对照虽然也有个别显性性状得到表达,但没有观察到各显性性状整体得到表达的植株,而且表达数仅为激光处理的20%。说明激光处理DNA导入后,容易被整合到受体基因中去,并得到表达。对其品质指标测试, V_c 含量提高30%左右;而经 ^{60}Co 的 γ 射线辐照的 D_1 代平均提高25%。说明激光处理和 ^{60}Co 的 γ 射线辐照的 D_1 代的 V_c 含量品质均有了较大改善。这除了外源基因导入起作用外,可能还有激光与DNA的非线性作用促成DNA变异的原因。

2.3 激光处理对 D_2 代影响

激光处理DNA导入番茄后,在 D_1 代上所表现出来的一些性状,如叶形、无限生长型(显性基因)以及 V_c 含量的品质指标等,在 D_2 代上仍能正常表达出来。说明导入的一些性状能够遗传,如正常叶的表达数与出苗数之比最少为60%,其余为87%—93%,表明导入的基因能被遗传。同时也表明存在遗传分离现象,但遗传情况是好的。这是仅从叶形来观察,如果结合其它性状来分析,分离是交叉的。有研究者指出,单基因或单片段控制的性状要到 D_3 — D_4 稳定,因而在 D_2 代上出现分离是正常的。

2.4 供、受体及受体 D_3 与 D_4 代的过氧化物酶同工酶分析

因为酶是基因表达的产物,对同工酶进行分析是从基因产物的角度认识基因的存在与表达,酶谱的差异反映了基因的表达差异。因而用同工酶作遗传标记被广泛用于植物的遗传、发育、亲缘关系、雄性不育、种子纯度检测等研究中。我们从筛选出的受体后代及供、受体对照进行了过氧化物

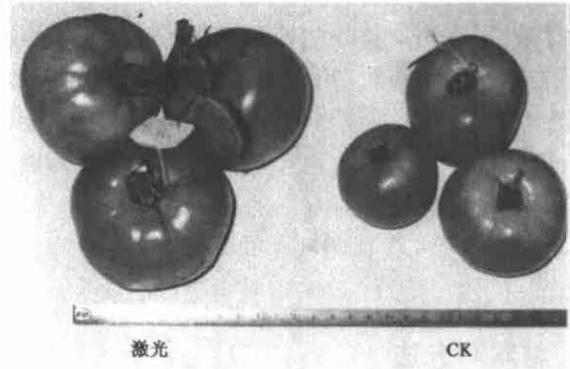


图4 获得的新材料与受体品种的比较

Fig. 4 The comparison in new material of tomato and species of receptor

酶同工酶的酶谱分析,是为了从分子水平揭示其遗传与变异,检测外源基因在受体中的表达水平。图3是 D_4 代的过氧化物酶同工酶的电泳图谱和电泳模式图,其中R1、R2和R3为 γ 射线辐照(400Gy),R1的田间性状(叶形、生长型等)与受体相似,而R2和R3的田间性状(叶形、生长型等)与供体相同;L1、L2和L3为激光照射处理(波长660nm,时间为10min),它们的田间性状(叶形、生长型等)有供体的特点。

从图3可看出不同处理所得的受体后代与供、受体在过氧化物酶同工酶酶谱上均有不同程度的差异。受体酶带条数多活性就强,而供体酶带条数少些活性就较弱。L1、L2和L3与供、受体过氧化物酶同工酶酶谱相比较,L1、L2较接近于供体,只比供体多第6条带,而比受体少4、5、9、10四条带;L3比供体多4、5和6三条带,而比受体少9、10两条带。R1、R2和R3中,R1过氧化物酶同工酶酶谱与供体差异大而与受体较相似,比供体多6、9、10三条酶带,比受体少4、5两条带;R2和R3则与供体较接近都只比供体多出第6条带,而比受体少4、5、9、10四条带。实验表明不同处理所得的受体后代之间在过氧化物酶同工酶酶谱上的差异与它们在叶形表达上的差异及生长型差异是相吻合。

从 D_3 与 D_4 代的过氧化物酶同工酶酶谱分析的一致性,表明了激光作用DNA导入番茄效果较好,遗传稳定,获得了较理想的受体后代。经对优势植株的多代选育和同工酶分析,并且经两年抗病田间鉴定而获得了一份结果多、果形好、果重180g、 V_c 含量高的育种新材料,见图4(CK为受体哈师5号)。

3 结语

由于激光与 DNA 的非线性作用,可把 DNA 打成许多片段,使得表达基因易于导入、整合、配对;并且在把 DNA 打成碎片同时,还具有诱变作用,可获得更广泛选择余地;红色激光有红光效应,能促进植物生长,有利于获得良好性状.对受体后代及供、受体进行过氧化物酶同工酶的酶谱研究表明,多数受体后代的酶谱与供体较为相似而与受体差异较大.与供体酶谱相比较,除个别外多数受体后代酶带数略多于供体,酶活性也略强于供体;而与受体相比,多数受体后代酶带数少于受体,酶活性也普遍地弱于受体.同工酶谱图上的差异与在田间观察性状的差异结果是一致的.并且 D₃代与 D₄代的同工酶谱分析结果一致,表明了本研究外源 DNA 导入效果较好,遗传稳定,获得了较理想的受体后代.酶是基因表达的产物,是一种重要的遗传标志,可从分子水平揭示其遗传与变异.同工酶的酶谱研究,在分子水平上证明了外源 DNA 已导入番茄受体,被整合得到表达,并能遗传.受体后代还大幅度地提高 V_c的含量,这除了供体因素外,可能与激光与 DNA 非线性作用引起 DNA 变异有关.

(上接第 379 页)由参考文献^[7]可得导引头辐射计探测距离公式:

$$R = \left\{ \frac{bA_T |T_T|}{\pi |T_A| \ln 2} \right\}^{1/2} \quad (10)$$

设被动式毫米波导引头辐射计灵敏度 $\Delta T_{\min} = 2\text{K}$,装甲目标辐射面积 $A_T = 21\text{m}^2$ 为有效探测和识别目标,要求天线输入的信噪比 $S/N \geq 10\text{dB}$ 以上,天线半功率波束宽度为 4.8° 时, $b = 400$, 及 $T_T = 123$, $T_A = 122$, 将这些值代入式(10),可得毫米波导引头辐射计近感探测距离为 $R = 62\text{m}$.

7 结语

在毫米波辐射无源被动探测中,为得到真实的各种目标的辐射温度,从测得的天线温度中反演目标的亮温,有着重要的作用.本文我们给出了毫米波装甲目标辐射亮温的样条平滑内插解及计算方法,以及探测距离.

REFERENCES

[1] Holmes J T, Balanis C A, Truman W M. Application of

REFERENCES

- [1] Yomosa S. Solitary excitations in deoxyribonucleic acid (DNA) double helices [J]. *Phys. Rev. A*, 1984, **30**: 474—480.
- [2] SHAO Yao-Chun, FENG Guo-Lin. Study of the influence of laser frequency on DNA chaos [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (邵耀椿,封国林,激光频率对 DNA 分子混沌态影响的研究, *红外与毫米波学报*), 1995, **14**(6): 456—460.
- [3] SHAO Yao-Chun, FENG Guo-Lin. Study on stochastic resonance of the laser-DNA interaction system [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (邵耀椿,封国林,激光与 DNA 作用系统的随机共振研究, *红外与毫米波学报*), 1996, **15**(6): 450—454.
- [4] FENG Guo-Lin, SHAO Yao-Chun, Study on the stochastic resonance chaos in laser-DNA interactive system [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (封国林,邵耀椿,激光与 DNA 作用系统的随机混沌研究, *红外与毫米波学报*), 2000, **19**(3): 169—173.
- [5] FENG Guo-Lin, DAI Xin-Gang, WANG Ai-Hui, et al. On numerical predictability in the chaos system [J]. *Acta Physica Sinica* (封国林,戴新刚,王爱慧等,混沌系统中可预报性的研究, *物理学报*), 2001, **50**(4): 606—611.
- [6] HU Neng-Shu, WAN Xian-Guo. *Technology and application of isoenzyme* [M]. Changsha: Hunan scientific and technical publishers (胡能书,万贤国,同工酶技术及磷应用,长沙,湖南科学技术出版社), 1985.
- [7] Fourier transforms for microwave radiometric inversions [J]. *IEEE Trans. on A. P.* 1975, **23**(6): 797—806.
- [2] Truman W M, Balanis C A, Holmes J T, Three-dimensional vector modeling and restoration of flat finite wave tank radiometric measurements [J], *IEEE Trans. on A. P.*, 1977, **25**(1): 95—104.
- [3] Stogryn A. Estimates of brightness temperatures from scanning radiometer data [J], *IEEE Trans. on A. P.*, 1978, **26**(5): 720—726.
- [4] Claassn J P, Fung A K. The recovery of polarized apparent temperature distributions of flat scenes from antenna temperature measurements [J], *IEEE Trans. on A. P.*, 1974, **22**(3): 433—442.
- [5] Troisky A V, Gajkovich K P, Thermal sounding of the atmospheric boundary layer in the oxygen absorption band center at 60 GHz [J], *IEEE Trans. on Geosci. Remote Sensing*, 1993, **31**(1): 116—119.
- [6] Petrnko B Z, Retrieval of parameters of a horizontal hydro-meteor distribution within the field of view of a satellite microwave radiometer [J], *IEEE trans. on Geosci. Remote Sensing*, 2001, **39**(9): 1871—1878.
- [7] Li Xin-Guo, *Millimeter Wave Near-Sensing Technique and Application* [M]. Beijing: National Defense Industry Publishing House, (李兴国.毫米波近感技术及其应用.北京:国防工业出版社), 1989.