

- 11 Buisine E, Wieruszkeski J-M, Lippens G, et al. Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. J Peptide Res, 1997, 49: 545~ 555
- 12 Zerrouk H, Larabardjebari F, Fremont V, et al. Characterization of P01, a new peptide ligand of the apamin-sensitive Ca^{2+} activated K^{+} channel. Int J Peptide Protein Res, 1996, 48: 514~ 521
- 13 Feramisco J R, Smart J E, Burrige K. Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. J Biol Chem, 1982, 257(18): 11024~ 11031
- 14 Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. Anal Biochem, 1993, 212: 394~ 401
- 15 Becerril B, Vazquez A, Garcia C, et al. Cloning and characterization of cDNA that code for Na^{+} -channel blocking toxins of the scorpion *Centruroides naxius* Hoffmann. Gene, 1993, 128: 165~ 171
- 16 Delabre M L, Pasero P, Marilley M, et al. Promoter structure and intron/exon organization of a scorpion α -toxin gene. Biochemistry, 1995, 34: 6729~ 6736
- 17 沈翊珩. 真核生物基因表达调控. 北京: 高等教育出版社, 1996
- 18 Legros C, Feyfant E, Sampieri F, et al. Influence of a NH_2 -terminal extension on the activity of KTX2, a K^{+} channel blocker purified from *Androctonus australis* scorpion venom. FEBS, 1997, 417: 123~ 129

(1998-12-17 收稿, 1999-08-02 收修改稿)

植物体应激反应中生物光子发射的实验观测

邢 达 谭石慈 唐永红 何永红 李德红

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘要 用高灵敏度的 ICCD 图象探测系统, 对萌发期大豆受到外界刺激后的生物光子发射进行探测. 实验发现, 大豆子叶受到创伤后, 创伤部位的生物光子发射明显增强. 另外, 大豆干旱复水过程中, 在根尖也测到了很强的发光. 创伤引起的发光可能与植物的防御反应有关. 受到创伤后植物体内会产生茉莉酮酸, 诱导防御基因的表达, 产生防御反应而发光. 干旱复水过程中的发光可能是细胞氧化代谢活动的变化所致. 正常情况下, 机体的氧化代谢活动处于稳定状态. 受到外界刺激后, 平衡被打破, 活性氧积累, 导致发光增强.

关键词 超微弱发光 创伤 生物光子发射 防御反应 活性氧

生物体在生长发育过程中, 当受到外界刺激或侵害时, 本能地会做出反应, 以防御外界侵害来保护生命安全. 如动物体中白细胞的吞噬作用就是一种重要的免疫功能, 它可以吞噬和杀灭细菌, 防御细菌的感染. 当受到细菌的刺激后, 白细胞通过己糖磷酸支路代谢途径的活化, 发生呼吸“爆发”, 在增加氧耗的同时, 产生许多种活性氧基团, 这些活性氧具有强烈的杀菌作用. 产生活性氧的同时, 常常伴有微弱的闪光现象^[1]. 在植物体中也存在类似的现象, 如 Takahiro 等人^[2]用甘薯和非病原细菌相互作用获得了自发光子发射图象^[2]. 我们^[3, 4]也曾对各种植物样品的延迟发光及自发光子发射进行探测和研究, 其结果显示, 植物在生长发育过程中新陈代谢的旺盛程度以及叶绿体的形成和含量影响超微弱发光的强度.

本工作利用高灵敏度的 ICCD(Intensified Charge Couple Device)图象探测系统, 对萌发期大豆受到刺激(创伤和干旱复水)后的生物光子发射进行探测. 其超弱发光图象清晰地表明, 外

界刺激会引起创伤组织生物光子发射强度明显升高. 这些现象可能与生物体在应激反应过程中局部代谢的改变密切相关.

1 材料与方法

() 材料. 挑选颗粒均匀的大豆(*Glycine max* L. Merr.)种子, 清水洗净后, 分为2份, 浅埋于干净的湿沙中. 1份放在暗室(约25℃)培养, 另1份放在窗台上(自然光照, 约22~27℃)培养. 3~7 d后, 得到初期萌发大豆的黄花苗(暗室)和绿苗(窗台). 此时, 种皮已经破裂脱落, 胚根伸出但未长出根毛, 胚芽仍与子叶相连, 尚未长大.

() 方法. 实验前将大豆芽从培养皿中取出, 放入盛水的玻璃杯中置于暗室, 暗适应约0.5~1 h后备用. 将大豆芽摘掉1片子叶, 在留下的另1片子叶上, 用小刀刻上“十”字(长约4 mm, 深约0.5 mm, 刀痕截面为“V”字形), 放入样品暗箱中进行测量. 实验装置如图1所示. 该装置是以 ICCD (576-S/1 型, 美国 PI 公司产品) 为核心的光电探测系统, 其中象增强器(MCP, microchannel plate)的输出端通过光纤以1:1的尺寸耦合到 CCD 的输入端, 有效直径为18 mm. ICCD 致冷时, 在入射窗口外吹干燥氮气, 防止空气中的水凝结其上, 致冷温度最低可达到-45℃, 大大降低了系统噪声. 象增强器的增益可通过调节加在 MCP 上的电压来改变, 光谱接收范围360~930 nm. CCD 规格为576×384 像素. 为了充分收集生物样品的超微弱光, 我们使用焦距为50 mm, F1.4 的大孔径物镜镜头与 ICCD 连接, 改变近距接圈可在屏上看到不同尺寸的物象.

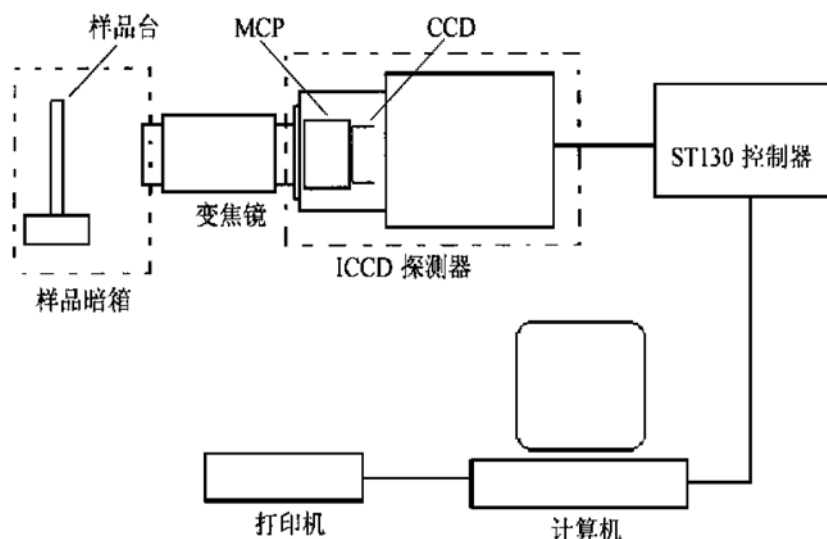


图1 超微弱发光图像探测系统

由于动植物的自发超微弱发光强度很低, 探测系统采集到的光电信号必然也很弱. 为了获得必要的信号强度必须进行长时间的信号积累或叠加, 与此同时也积累了背景噪声, 使超微弱发光图象变得模糊不清. 因此, 很好地扣除背景噪声, 拾出所需要的信号是至关重要的. 我们以50幅(每幅曝光5 min)背景噪声图象进行平均后得到的平均背景噪声图象作为本底, 将连续探测到的12幅(每幅曝光5 min)超微弱发光图象分别扣除这个本底后进行叠加, 可获得清晰的图象.

2 结果

大豆(绿苗)子叶刻伤后的超微弱发光如图2(b)所示. 可见刀痕处发光较强, 形如“十”

字. 刀痕深处发光强度的信噪比为 1.42, 而未刻伤部分的发光强度信噪比只有 1.06. 虽然子叶的发光强度信噪比很小, 但从发光图象上仍能看出子叶的轮廓来. 可见探测系统的灵敏度和分辨率比较高.

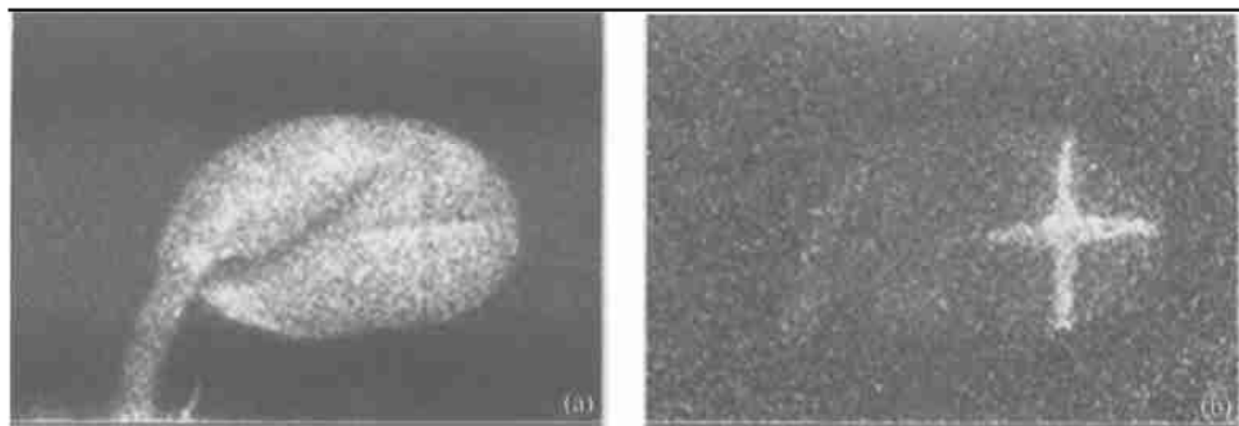


图2 大豆芽外形图(a)与子叶刻伤后的超微弱发光图(b)

大豆的黄化苗与绿苗比较, 子叶的超微弱发光更弱, 从图象上难以分辨出来. 但子叶上的“十”字刀痕处和子叶折断处也有光子发射, 而未刻伤部分看不到明显的发光(图象未给出).

大豆芽缺水后复水, 根尖会出现很强的光子发射. 初期萌发的黄化苗(根长约 1 cm)从水中取出后立即探测其根部, 未能探测到发光. 由于缺水(约 1 h), 胚轴和胚根已经有点萎缩. 此时向根尖滴水, 再马上探测, 则在根的尖端处探测到清晰的发光图象(图 3(b)).

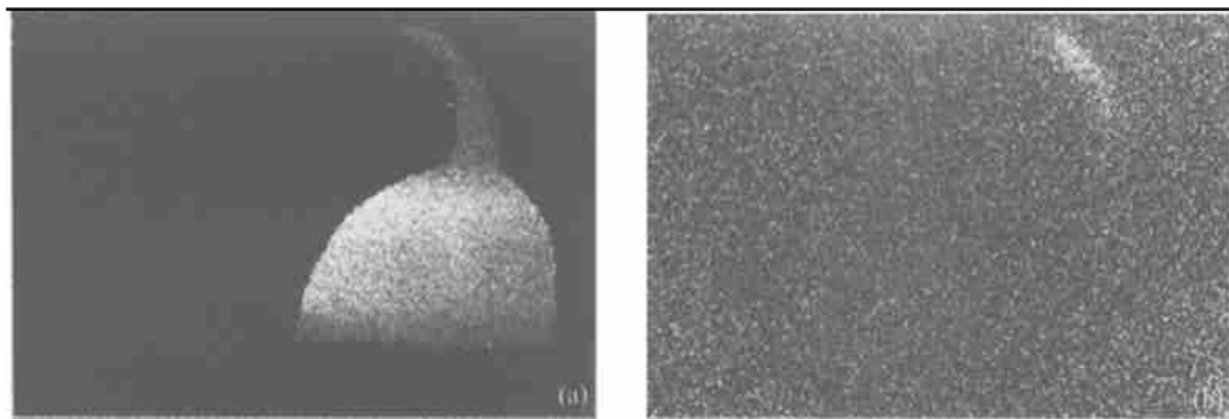


图3 大豆芽外形图(a)与缺水后复水时的超微弱发光图(b)

3 讨论

Takahiro 等人^[2]曾报道甘薯在受到细菌 *F. oxysporum* 感染时会产生防御反应, 大量分泌抗毒素黑巴霉酮而导致较强的生物光子辐射. 根据 Farmer 等人^[5]的研究知道, 植物体内存在着由虫害等创伤(wounding)引发的生化报警系统, 能对创伤做出反应. 当植物受到外界刺激时, 会产生一种激素, 这种激素把植物体内的亚麻酸转化为茉莉酮酸(3-氧-2'-顺-戊烯基-环戊烷-1-乙酸, JA), JA 能够诱导植物防御基因的表达^[6]. Pearce 等人^[7]的研究表明, 植物受到创伤后茉莉酮酸会迅速产生, 从而有效地刺激防御基因的表达, 产生防御反应. 我们的实验结果表明, 植物在生长发育过程中受到创伤时, 会产生较强的生物光子发射. 这一现象可能与植物受到外界刺激后产生的防御反应有关. 当动物受到创伤后会引发防御反应, 其中最主要的过程为白细胞大量聚集于创伤部位, 产生“呼吸爆发”: 白细胞通过活化己糖磷酸支路代谢途径, 氧

化代谢急剧增加,产生大量的活性氧基团,如超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、羟自由基 $OH^{\cdot}$ 、单线态氧 1O_2 等. 它们具有强烈的杀菌作用,以预防细菌侵入感染. 这些高能态物质退激时,会产生光子发射,而使创伤部位发光增强^[1]. 我们在近期的动物实验中也观测到了这一现象(另文报道). 植物受到创伤时发光增强的现象似乎也表明,植物体内存在着类似动物体的防御反应,但具体过程如何还有待于进一步的研究.

Eva 等人^[8]的研究发现,类囊体膜光合磷酸化电子传递链上的电子泄露能产生大量活性氧基团而导致叶绿素分子被激发,产生生物光子发射. 我们以往的实验^[3,4]也发现,绿苗的超弱发光强于黄化苗. 由于暗处培养的黄化苗叶绿体未发育,无法进行与叶绿体结构功能密切相关的代谢活动,故生物光子发射更弱. 另外,黄化苗受到创伤后的发光弱于绿苗,是否也表明机体的应激能力与个体的生长发育程度有关.

在给水情况下,我们未能测到大豆芽根部的发光(图象未给出). 在干旱胁迫下,胚根缺水萎缩,细胞代谢活动减缓,生长受到抑制. 此时若恢复给水,根部吸水后细胞代谢活动迅速加剧,而导致较强的光子发射. 如果对不同品种的种子进行研究,可能会发现发光与品种抗旱能力的内在联系,从而为筛选抗旱品种提供依据.

总之,在正常情况下,生物体内的氧化代谢活动处于稳定状态,此时活性氧的产生和清除之间存在着平衡. 当机体受到外界刺激(如创伤、细菌感染或逆境胁迫)时,会产生各种应激反应,原有的平衡被破坏,致使细胞内活性氧等自由基增多,导致生物光子发射增强. 因此,生物光子发射的变化能够反映生物体内部代谢活动的变化. 生物光子形态学检测能获取光子发射强度的空间分布信息,具有实时、无损伤、动态影象等特点,如果加上光谱分析可成为评价生物体的应激能力及代谢变化的一项稳定可靠的指标,预期在 21 世纪的农业、医学等领域将得到广泛的应用.

致谢 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号:69725009)和广东省自然科学基金(批准号:970315)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Allen R C. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 47: 679~ 684
- 2 Takahiro M, Kimihiko K, Hiroyuki L, et al. Utraweak luminescence generated by sweet potato and *Fusarium oxysporum* interactions associated with a defense response. *Photochemistry and Photobiology*, 1996, 64(6): 953~ 956
- 3 谭石慈,邢达. 生物超微弱发光图象的观测. *科学通报*, 1997, 42(6): 643~ 646
- 4 王维江,邢达,谭石慈,等. 生物样品超微弱发光图象的探测与分析. *生物物理学报*, 1997, 13(4): 677~ 682
- 5 Farmer E E, Johnson R R, Ryan C A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 1992, 98: 995~ 1002
- 6 Farmer E E. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26: 1423~ 1437
- 7 Pearce G, Strydom D, Johnson S, et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 1991, 253: 895~ 897
- 8 Eva H, Humio T. Dark adapted leaves of paraquat-resistant tobacco plants emit less utraweak light than susceptible ones. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 178(2): 438~ 443

(1998-09-24 收稿, 1998-12-18 收修改稿)