

紫外线照射对棉铃虫成虫几种同工酶的影响

孟建玉^{1,2} 张长禹² 雷朝亮²

1. 贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550081;

2. 华中农业大学植物科学技术学院/湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用同工酶电泳的方法,研究了紫外(ultraviolet, UV)胁迫条件下对棉铃虫体内酯酶、过氧化物酶(peroxidase, POX)及过氧化氢酶(catalase, CAT)等同工酶的影响。结果表明:与对照相比,紫外线照射处理组酯酶同工酶谱带发生了质和量的变化,照射时间为30 min和60 min时,谱带E4、E9、E10增强,谱带E2、E8减弱,谱带E1、E5、E7、E11消失,新增了谱带E3、E6;照射时间延长至90 min时,谱带E4、E9增强,谱带E2、E8减弱,谱带E1、E5、E7消失,新增了谱带E3、E6。紫外线照射处理下,棉铃虫POX同工酶谱带P5有所增强,CAT同工酶谱带的变化因照射时间不同而有所差异。与对照相比,紫外线照射处理组的C1谱带增强,但C2谱带在30 min时减弱,60 min时恢复到对照水平,90 min时与对照相比又有所减弱。

关键词 棉铃虫; 紫外光; 照射; 同工酶

中图分类号 S 435.622⁺.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0069-04

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hüber) 隶属于鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae),是我国乃至世界上重要农业害虫。棉铃虫成虫是一种典型的趋光性昆虫,对刺激光源表现出很强的趋性,对紫外(ultraviolet, UV)光谱尤为敏感^[1-2]。由于紫外线符合多数夜行性昆虫的趋光反应曲线,已被制作成诱虫灯进行害虫测报和防控,并得到广泛应用。然而,越来越多的研究证实,紫外线照射是一种普遍存在的、能对所有生物造成影响的环境胁迫因子^[3-4]。已有的研究表明,紫外线照射能够对昆虫造成高水平的氧化胁迫,改变昆虫体内保护酶活性,对蛋白质造成氧化损伤;UV胁迫还可能导致蛋白质的生理功能改变,以及蛋白质的氧化进程加快^[5-7]。

同工酶是指催化反应相同而结构和理化性质不同的酶的分子类型,几乎存在于所有生物中,是基因表达之后分子水平的表型,其结构和活性始终受体内遗传基因的调节和控制。这种不同的分子形式执行同一种功能是对不同环境条件的适应,它强调了外部环境因素的作用^[8]。不良的环境常会影响基因的变异,从而导致酶结构及其活性的改变,反映在同工酶谱上便会出现数量及迁移率不同的谱带的产生^[9-10]。

目前,对昆虫胁迫相关酶的研究主要集中于抗氧化系统中某些保护酶或抗氧化剂活性的变化,而对同工酶的研究较少,关于UV胁迫与同工酶基因表达趋势及调控之间相关性的研究也未见报道。为更好地揭示棉铃虫对紫外线刺激的应答机制,笔者采用同工酶电泳方法,对棉铃虫体内酯酶、POX和CAT同工酶与UV胁迫之间的关系进行了研究,分析了紫外线照射不同时间对棉铃虫造成的各种同工酶表达特性的差异,旨在为进一步阐明棉铃虫对紫外线照射的生理生化响应机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试棉铃虫为笔者所在实验室长期喂养的虫系。幼虫用人工饲料饲养,饲料配方参考Wu和Gong的配方^[11];成虫羽化后雌雄虫单独饲养,饲喂10%的蜂蜜水,室内饲养条件:温度(27±1)℃、相对湿度70%±10%、光周期L/D=14/10 h。选3日龄未交配的棉铃虫成虫供试。

1.2 主要仪器和试剂

UV灯(320~390 nm, 20 W)购自江苏华东电子管厂;UV照度计(TN-2340)购自TAINA公

收稿日期: 2011-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871639)

孟建玉, 博士研究生, 研究方向: 昆虫生理生化. E-mail: mjj0417@yahoo.com.cn

通讯作者: 雷朝亮, 教授, 研究方向: 农业昆虫与害虫防治. E-mail: ioir@mail.hzau.edu.cn

司; 醋酸- α -萘酯、醋酸- β -萘酯、坚牢蓝、联苯胺、醋酸钠、 H_2O_2 、硫代硫酸钠、碘化钾等均为国产分析纯试剂。

1.3 紫外线照射处理

为了模拟田间诱虫灯对棉铃虫的影响,在暗期开始后使棉铃虫成虫暗适应 2 h 之后进行紫外线照射处理。照射强度为 $300 \mu W/cm^2$,照射时间分别为 0(对照组)、30、60、90 min。试验过程中保持试虫所处的温度、湿度和室内饲养条件一致。将紫外线照射处理后的成虫立即置于液氮中冷冻,然后保存于 $-80^\circ C$ 冰箱备用。

1.4 样品制备

取出超低温保存的棉铃虫成虫去翅,称质量后置于预冷的玻璃匀浆器中,以 1:10(mg:mL)比例加入磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)在冰上充分匀浆,然后在 $4^\circ C$ 、10 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液为酶液,分装后于 $-80^\circ C$ 冰箱备用。

1.5 同工酶谱分析

采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。分离胶浓度 7.5%, pH 8.8; 浓缩胶浓度 3%, pH 6.8,电泳缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液。样品与 50% 甘油-0.01% 溴酚蓝以体积比 5:1 混匀,并在恒压(浓缩胶 100 V, 分离胶 120 V)条件下电泳。

1) 酯酶同工酶染色。称取醋酸- α -萘酯和醋酸- β -萘酯各 0.125 g, 坚牢蓝 0.5 g, 加 20 mL 丙酮溶解,用 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液定容至 500 mL,完全溶解后过滤,作为酯酶染液。电泳完毕,将凝胶立即放入染液中,在 $37^\circ C$ 水浴中显色 30 min 后用蒸馏水漂洗,再移入 7% 醋酸中脱色至酶带清晰。

2) POX 同工酶染色。采用醋酸联苯胺法,在 75 mL 双蒸水中加入 0.1 g 联苯胺、5 mL 无水乙醇、10 mL 1.5 mol/L 醋酸钠和 10 mL 1.5 mol/L 醋酸,使其充分溶解后过滤,作为 POX 染液。电泳完毕,用双蒸水漂洗凝胶 3 次,在染液中加入 7 滴 H_2O_2 迅速摇匀后倒在凝胶上,直至褐色酶带出现。

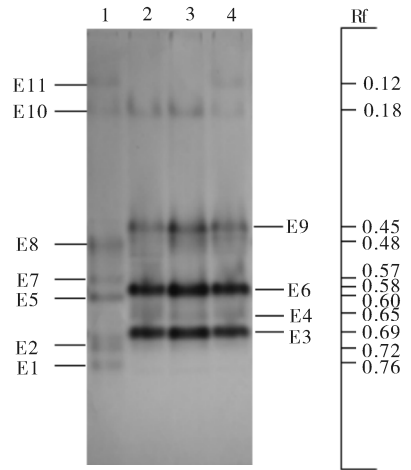
3) CAT 同工酶染色。A 液配制,将 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液、3.5 mL 0.1 mol/L 硫代硫酸钠和 25 mL 3% H_2O_2 混匀; B 液配制,将 25 mL 0.01 mol/L 碘化钾和 25 mL H_2O_2 混匀。电泳完毕,先用 A 液浸泡凝胶 15 min,然后用双蒸水漂洗 3 次,最后放入 B 液中摇动至亮白色条带出现。

酶带的相对迁移率 $Rf = \frac{\text{酶带迁移的距离}}{\text{指示剂迁移的距离}}$

2 结果与分析

2.1 紫外线照射对棉铃虫酯酶同工酶的影响

试验结果表明,与对照相比,紫外线处理组棉铃虫成虫同工酶谱带发生了质和量的变化(图 1)。紫外线照射 30 min 和 60 min 时,谱带 E4、E9、E10 增强,谱带 E2、E8 减弱,谱带 E1、E5、E7、E11 消失,并新增了 E3、E6 谱带;紫外线照射时间为 90 min 时,谱带 E4、E9 增强,谱带 E2、E8 减弱,谱带 E1、E5、E7 消失,并新增了 E3、E6 谱带。新增谱带的 Rf 分别为 0.69 和 0.60。



1: 对照 Control; 2~4: 紫外线照射 30、60、90 min。UV light irradiation for 30, 60, 90 min.

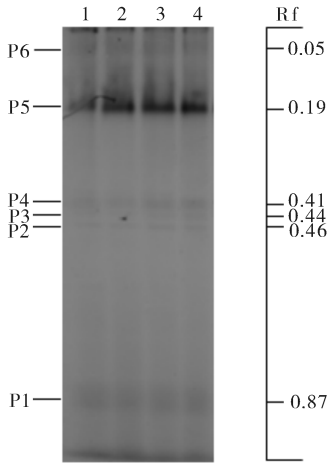
图 1 紫外线照射不同时间对棉铃成虫酯酶同工酶的影响
Fig. 1 Effects of UV light irradiation on esterase isozyme of *H. armigera* adults for different lengths of time

2.2 紫外线照射对棉铃虫 POX 同工酶的影响

试验结果表明,棉铃虫成虫 POX 同工酶主要有 6 条谱带,从下至上分别表示为 P1~P6(图 2)。与对照组相比,棉铃虫成虫 P5 谱带在紫外线照射处理下增强,Rf 为 0.19,其余谱带则无明显的增强或减弱趋势。

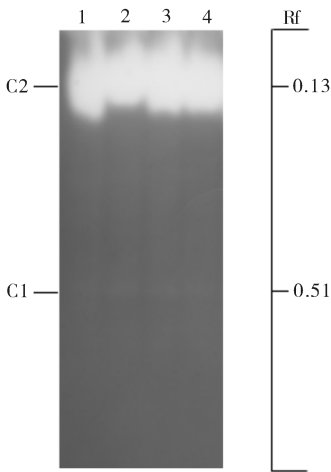
2.3 紫外线照射对棉铃虫 CAT 同工酶的影响

试验结果表明,棉铃虫成虫 CAT 同工酶主要有 2 条谱带,从下至上分别表示为 C1 和 C2,Rf 分别为 0.51 和 0.13(图 3)。棉铃虫成虫 CAT 同工酶在受到不同照射时间 UV 胁迫后其谱带变化有所不同。与对照组相比,紫外线处理组的 C1 谱带增强,但 C2 谱带在紫外线照射 30 min 时减弱,紫外线照射 60 min 时恢复到对照水平,90 min 时与对照相比又有所减弱。



1: 对照 Control; 2~4: 紫外线照射 30、60、90 min。UV light irradiation for 30,60,90 min.

图 2 紫外线照射不同时间对棉铃成虫 POX 同工酶的影响
Fig.2 Effects of UV light irradiation on POX isozyme of *H. armigera* adults for different lengths of time



1: 对照 Control; 2~4: 紫外线照射 30、60、90 min。UV light irradiation for 30,60,90 min.

图 3 紫外线照射不同时间对棉铃成虫 CAT 同工酶的影响
Fig.3 Effects of UV light irradiation on CAT isozyme of *H. armigera* adults for different lengths of time

3 讨论

同工酶是基因表达的产物,同工酶谱带的变化反映了基因表达的改变。目前已有研究证实许多酶的同工酶会受到胁迫条件的影响,深入分析昆虫在特定处理条件下体内同工酶的种类及表达强弱的变化,有利于从基因和功能的角度阐明其生理机能、代谢过程与环境胁迫之间的关系。

本试验结果显示 UV 胁迫能够引起棉铃虫酯

酶同工酶的明显变化,表现在同工酶谱的量或质上。在紫外线照射下,有些谱带减弱或增强,有些谱带消失,还有些谱带是新产生的。目前,酯酶同工酶在昆虫中的研究主要集中在物种鉴定及系统发育上,在环境胁迫中的研究还未见报道。笔者推测酯酶同工酶某些谱带的增加或消失,是昆虫对 UV 胁迫条件的一种适应性反应,是昆虫为了适应紫外线照射而诱导体内酯酶系统代谢改组的结果。

POX 和 CAT 是酶促抗氧化系统中 2 种重要的保护酶,广泛存在于昆虫中^[12]。POX 是一类酶的总称,其基本结构是血红蛋白,血红蛋白与脱辅基蛋白结合构成全酶。CAT 是一种含有亚铁血红素的四聚体酶。两者都可以消除昆虫体内过量的 H₂O₂,保持细胞内活性氧产生与清除的动态平衡^[13-14],减少自由基对昆虫的伤害,在维持体内正常生理代谢过程中扮演重要角色。POX 和 CAT 很容易受到外界不良环境的影响,通过研究两者的活性及同工酶谱的变化,可以更好地了解不良环境对昆虫造成的影响以及昆虫对不良环境的应答反应。已有研究报道,棉铃虫体内的抗氧化系统会对 UV 胁迫作出应答反应,POX 和 CAT 活性随着紫外线照射时间的变化而变化^[6]。本试验则从同工酶谱的角度出发,分析了紫外线照射对棉铃虫 POX 和 CAT 的影响。结果表明:在紫外线照射下棉铃虫 POX 同工酶中的 1 条谱带发生了变化,与对照相比有所增强;CAT 同工酶的 2 条谱带也受到了紫外线照射的影响,其中 1 条谱带在紫外线照射下增强,另外 1 条谱带的变化规律与照射时间相关。这些可能是棉铃虫适应 UV 胁迫的一种保护性响应。

本试验结果表明,昆虫的向灯飞行可以被看作是刺激光源对昆虫正常活动的干扰,其实质不仅局限于其行为和视觉生理,有可能涉及一个更复杂更微妙的生理过程。棉铃虫在 UV 胁迫条件下酯酶、POX 和 CAT 同工酶谱带发生的变化,可能是昆虫对胁迫环境的一种适应性反应,但具体的调控机制仍有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 丁岩钦,高慰曾,李典谟.夜蛾趋光特性的研究:棉铃虫和烟青虫成虫对单色光的反应[J].昆虫学报,1974,17(3):307-317.
 [2] 魏国树,张青文,周明群,等.不同光波及光强度下棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)成虫的行为反应[J].生物物理学报,2000,16(1):89-95.
 [3] URBACH F. The biological effects of increased ultraviolet ra-

- diation: an update[J]. *Photochem Photobiol*, 1989, 50: 439-441.
- [4] SCHAUEN M, HORNIG-DO H T, SCHOMBERG S, et al. Mitochondrial electron transport chain activity is not involved in ultraviolet A (UVA)-induced cell death[J]. *Free Radical Bio Med*, 2007, 42: 499-509.
- [5] LOPEZ-MARTINEZ G, ELNITSKY M A, BENOIT J B, et al. High resistance to oxidative damage in the *Antarctic midge* *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38: 796-804.
- [6] MENG J Y, ZHANG C Y, ZHU F, et al. Ultraviolet light-induced oxidative stress; effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults [J]. *J Insect Physiol*, 2009, 55: 588-592.
- [7] MENG J Y, ZHANG C Y, LEI C L. A proteomic analysis of *Helicoverpa armigera* adults after exposure to UV light irradiation[J]. *J Insect Physiol*, 2010, 56: 405-411.
- [8] 夏明, 刘亚学, 阿拉木斯, 等. 苜蓿叶片过氧化物同工酶与抗冷性的关系[J]. *中国草地*, 2003, 25(4): 41-45.
- [9] TOYOMASU T, ZENNYOZI A. On the application of isozyme electrophoresis to identification of strains in *Leirinus edodes* [J]. *Mushroom Sci*, 1981, 11: 675-684.
- [10] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 1-11.
- [11] WU K J, GONG P Y. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm[J]. *Entomologia Sinica*, 1997, 4: 277-282.
- [12] AHMAD S. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects[J]. *Biochem Syst Ecol*, 1992, 20: 269-296.
- [13] BAUER H, KANZOK S M, SCHIRMER R H. Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster* [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 17457-17463.
- [14] SWITALA J, LOEWEN P C. Diversity of properties among catalases[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 401: 145-154.

Effects of ultraviolet light irradiation on several isozymes in *Helicoverpa armigera* (Hüber) adults

MENG Jian-yu^{1,2} ZHANG Chang-yu² LEI Chao-liang²

1. *Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang 550081, China;*

2. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University/Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, Wuhan 430070, China*

Abstract The effects of ultraviolet (UV) light stress on esterase, peroxidases (POX), and catalase (CAT) isozymes in *Helicoverpa armigera* (Hüber) adults were studied by isozyme electrophoresis. When exposed to UV light irradiation, zymogram of esterase isozyme changed mainly in number and activity of isozyme. After 30 min and 60 min exposure, the intensity of isozyme bands E4, E9 and E10 were enhanced, E2 and E8 were weakened. The bands E1, E5, E7 and E11 disappeared after UV light irradiation, while E3 and E6 newly emerged. At the longest exposure time (90 min), the intensity of isozyme bands E4 and E9 was enhanced, while the intensity of E2 and E8 was weakened. The bands E1, E5 and E7 disappeared after UV light irradiation, whereas E3 and E6 newly emerged. The intensity of POX band P5 was enhanced in adults following the exposure to UV light for 30, 60, 90 minutes. The intensity of CAT band C1 was enhanced in adults following the exposure to UV light for 30, 60, 90 minutes, but that of band C2 was weakened after 30 min and 90 min exposure in comparison with the control.

Key words *Helicoverpa armigera* (Hüber); ultraviolet light; irradiation; isozyme

(责任编辑: 陈红叶)