

Cu 胁迫对大麦幼苗生长及 DNA 损伤效应的研究

齐雪梅^{1,2}, 李培军², 刘 宛²

(1.上海电力学院能源与环境工程学院, 上海 200090;2.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 100016)

摘 要:通过石英砂培养试验,采用 AFLP 分子标记技术研究 Cu 胁迫对大麦幼苗根系基因组 DNA 的损伤效应,同时比较基因组 DNA 损伤与幼苗根系生长、可溶性蛋白含量变化对 Cu 污染胁迫的敏感性。结果表明,12.5~50 mg·L⁻¹ Cu 处理 8 d 后,与对照相比根长显著变短,根系内的可溶性蛋白含量显著降低;基因组 DNA 的 AFLP 图谱与对照相比发生显著变化,具体表现为谱带的消失、新谱带的出现以及谱带荧光强度的改变。三者均对低浓度的 Cu 污染胁迫响应敏感,其中 AFLP 图谱变化是对 Cu 胁迫响应最为敏感的生物标记物,可用于土壤 Cu 污染的早期诊断和生态风险评价。

关键词:AFLP;生态毒性;生物标记物

中图分类号:X503.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1925-04

Plantlets Growth and DNA Damage of Barley (*Hordeum Vulgare* L) Under Copper Stress

QI Xue-mei^{1,2}, LI Pei-jun², LIU Wan²

(1.Department of Energy Sources and Environment Engineering, Shanghai University of Electric Power, Shanghai 200090, China; 2.Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: DNA damage effects of copper stress on the genome of barley seedlings(*Hordeum vulgare* L) were studied using amplified fragment length polymorphic(AFLP) technique under quartz sand culture. The sensitivity of DNA effects in the genome, root growth and total soluble protein level in root-tips to copper stress was compared. The results showed that significant inhibition of root growth and reduction of total soluble protein content in root tips of barley seedlings occurred in the range of 12.5~50 mg·L⁻¹ Cu after 8 d compared to that of the normal seedlings ($P<0.05$). The changes occurring in AFLP profiles of root tips following Cu treatment included loss of normal bands and appearance of new bands and variation in band intensity in comparison to that of the normal seedlings. The three above index were all sensitive to low does Cu stress, especially AFLP profiles changes and could be used as a useful biomarker for the detection of genotoxic effects of Cu pollution on organisms in soil system.

Keywords: AFLP; eco-toxicological effects; biomarker

随着现代社会工业的发展,越来越多的有害物质如农药、多环芳烃、多氯联苯及重金属等进入到土壤环境中,这些污染物可积累在生物体内并通过食物链威胁人体健康。Cu 是植物生长所必需的微量元素,但过量的 Cu 却有着很高的植物毒性,目前由于铜矿的开采,冶炼厂三废的排放,含 Cu 农业化学物质和有机肥的施用使得土壤 Cu 污染现象越来越严重。过量

的 Cu 能够阻碍植物的生长发育及光合作用^[1],严重时可导致植物细胞死亡。因此研究 Cu 对陆地生态系统可能带来的负面影响及其机理具有重要的理论和现实意义。

分子生物学的发展为环境科学工作者提供了新的思路及技术保障,使得环境污染对生物体中某个特定基因的检测与研究成为可能,许多分子标记技术被用于污染物质的毒性检测领域^[2-5]。本文以大麦幼苗为材料,采用 AFLP 分子标记技术,研究 Cu 胁迫对大麦幼苗基因组 DNA 的损伤效应,并比较分析大麦幼苗根系 AFLP 指纹图谱与幼苗根系生长、可溶性蛋白含量变化对 Cu 污染胁迫反应敏感性的关系,旨在为环

收稿日期:2007-11-15

基金项目:上海市重点学科建设项目(P1304);国家“973”项目(2004CB418506)

作者简介:齐雪梅(1980—),女,硕士研究生,主要从事污染生态学和水处理方面的研究。E-mail:meizibaby1013@163.com

境监测中 Cu 污染预警与评价提供理论指导与科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设计

Cu²⁺由 CuSO₄·5H₂O 提供,分析纯,沈阳试剂二厂生产。供试大麦为垦啤 3 号,购自黑龙江农科院;Cu²⁺由蒸馏水分别配置成浓度为:0、12.5、25、50 mg·L⁻¹。

种子首先经 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,蒸馏水冲洗干净后置于 23 ℃避光发芽,初生根长至 1.5~2 mm 时,选择发芽一致的种子,播种于装有石英砂的培养盆内,培养盆放置于装有一定 Cu²⁺浓度的容器内,光照培养箱内培养 8 d,培养温度为(20±2)℃,光强为 7 000 lx,每日定时定量补加蒸馏水。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 植株生长情况的观察

Cu 处理 8 d,选取幼苗 10 株,用直尺测定其初生根的长度及其植株高度。

1.2.2 幼苗根尖可溶性蛋白质含量测定

参照 Bradford 方法,以牛血清蛋白为标准^[6]。

1.2.3 幼苗根尖基因组 DNA 的提取

采用传统的 CTAB 法^[7]。

AFLP 分析参照 Vos et al.(1995)^[8],并稍加修改。AFLP 所用引物序列及接头序列见表 1。AFLP 的酶切采用 EcoRI 和 MseI 双酶切组合,内切酶购自 NEB 公司(美国),T4 连接酶、AFLP 反应接头、Taq DNA polymerase 和 dNTP 均购自宝生物工程技术有限公司(大连)。凝胶经硝酸银染色后,以生物成像分析(Vendor, Italy)系统进行处理及保存,并进行数据整理。

2 结果与讨论

2.1 Cu 胁迫对大麦幼苗形态和生理的影响

表 2 表明,Cu 处理对大麦幼苗生长产生不同程

度的抑制作用,初生根长度随着 Cu 浓度的增加而减少。Cu 处理 8 d 后统计,12.5、25 和 50 mg·L⁻¹Cu 胁迫下,大麦幼苗根系长度明显低于对照,幼苗根系生长的抑制率分别为 13.5%、32.6%和 48.5%,Cu 胁迫对大麦根尖细胞的抑制和毒害作用具有显著的积累效应,与前人报道基本一致^[9];但是幼苗株高的变化较小,与对照相比只有在 Cu 浓度为 50 mg·L⁻¹ 时显著降低($P<0.05$)。

植物体内可溶性蛋白的含量与其抗逆性的形成有关,可溶性蛋白有着很高的持水性,对作物起着有效的保护作用。但是在污染胁迫条件下,植物体内的可溶性蛋白合成受阻,含量降低。Cu 处理 8 d 后,随着 Cu 浓度的增加,幼苗根尖内可溶性蛋白含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),其含量分别为对照的 82.7%、72.3%和 65.8%。

表 2 Cu²⁺对大麦幼苗根长、株高及根系内可溶性蛋白含量的影响

Table 2 Effect of Cu ²⁺ on the root length, shoot size and total soluble protein content of barley			
Cu ²⁺ 浓度/mg·L ⁻¹	抑制率/%		
	根长	株高	可溶性蛋白
0	0	0	0
12.5	13.5	3.8	17.3
25	32.6	6.5	27.7
50	48.5	18.6	34.2

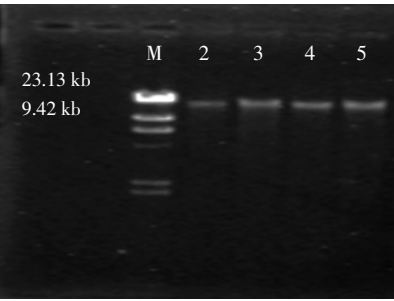
2.2 Cu 胁迫对大麦根系 DNA 损伤效应的影响

2.2.1 大麦基因组 DNA 提取纯化分析

采用 CTAB 方法提取的大麦幼苗根尖基因组 DNA,260 nm /280 nm 比值为 1.7~2.0,对照幼苗根尖中所获得的 DNA 产量为 4~5 μg·g⁻¹ (FW),电泳后经图像分析系统检测出单一的区带,没有拖尾现象,有利于后续实验,其相对分子量在 9.42~23.13 kb 之间(图 1)。

表 1 试验中所用的引物及接头序列

Table 1 Sequences of primers and adapters used for AFLP			
接头和引物	碱基序列	引物	碱基序列
EcoRI	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' 3'-CTG ACG CAT GGT TAA-5'	E34	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA-3'
MseI	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 3'-TAC TCA GGA CTC AT-5'	E45	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAT G-3'
E00	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'	M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC C-3'
M00	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	M38	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC T-3'
E37	5'-GACTGC GTA CCA ATT CAC G-3'	M48	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACC T-3'



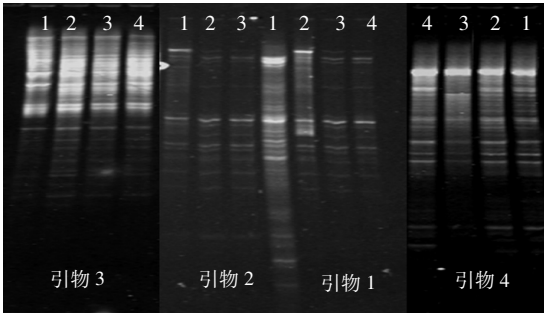
Lane 1 = control; 2 = 12.5 mg·L⁻¹; 3 = 25 mg·L⁻¹; 4 = 50 mg·L⁻¹
M: λ-hind III marker

图 1 大麦幼苗根尖基因组 DNA 的电泳图谱

Figure 1 Genomic DNA extracted by CTAB in root tips of barley

2.2.2 Cu 胁迫对大麦幼苗根系 DNA 损伤的影响

环境污染物诱导生物体细胞内的 DNA 损伤和突变, 后者导致引物结合位点的核苷酸缺失或增加, 最终影响 DNA 片段的 AFLP 图谱。同时认为, 不同 AFLP 谱带变化与 DNA 变化之间具有相互关系, AFLP 图谱多态性越高, 表明 DNA 受损伤越严重。由图 2 和表 3 可以看出, 在所用的 4 对引物中, 对照分别扩增出 25、17、17、21 条带, 12.5~50 mg·L⁻¹ Cu 处理大麦幼苗 8 d 后, 其根尖基因组 DNA 的 AFLP 图谱发生明显的变化, 表现为单条或多条 AFLP 谱带的缺失、增加, 或谱带荧光强度的改变。DNA 多态性(即 AFLP 图谱条带的消失和增加之和) 也随着 Cu 处理浓度的增大而增大。



Lane 1 = control; 2 = 12.5 mg·L⁻¹; 3 = 25 mg·L⁻¹; 4 = 50 mg·L⁻¹

图 2 暴露于不同 Cu 浓度条件下, 大麦幼苗根尖基因组的 AFLP 图谱

Figure 2 AFLP profiles of genomic DNA extracted from barley seedlings exposed to various copper concentration

2.2.3 Cu 胁迫下, 大麦幼苗根系生长、可溶性蛋白含量和 AFLP 图谱变化的比较

由表 4 可以看出, 随着 Cu 浓度的增大, 大麦幼苗根系的生长和根系内的可溶性蛋白含量逐渐降低,

表 3 Cu 胁迫下大麦幼苗根尖基因组的多态性变化
Table 3 Changes of polymorphic bands in root tips of barley seedlings exposed to copper

引物序号	对照总扩增带数	多态性带数			多态性带数百分比%		
		2	3	4	2	3	4
1	25	9	12	14	36	48	56
2	17	5	7	—	29	41	—
3	17	5	5	6	29	29	35
4	21	5	6	7	24	28	33
平均值	20	6	8	9	30	40	45

注: 引物 1=E37M48; 引物 2=E37M36; 引物 3=E34M36; 引物 4=E45M38; 图 2 与表 3 相同。

基因组 DNA 损伤也越来越严重。在低浓度 12.5 mg·L⁻¹ Cu 污染胁迫下, 根长与对照相比下降了 13.5%, 根系内的可溶性蛋白含量与对照相比降低了 17.3%, 而根系内基因组的 AFLP 图谱的多态性变化则达到了 30%。AFLP 图谱多态性变化可以反映基因组 DNA 受损伤的程度, 多态性变化越大, 基因组 DNA 受损伤越严重, 这说明对于低浓度的污染胁迫, 基因组的损伤比根长和根系内的可溶性蛋白含量对胁迫表现敏感, 是一种对低浓度污染胁迫反应敏感的生物标记物, 可用于环境污染的生态毒理诊断, 也可用于评价环境污染的修复效果。

表 4 大麦幼苗根系生长、可溶性蛋白及 AFLP 图谱对 Cu 胁迫敏感性的比较

Table 4 Comparison of sensitivity inhibition rate of root length, total protein content and AFLP profiles in root tips of barley plantlets exposed to copper

Cu ²⁺ 浓度/mg·L ⁻¹	对照百分比/%		
	根长	可溶性蛋白	AFLP图谱多态性
0	100	100	100
12.5	86.5	82.7	70
25	67.4	72.3	60
50	51.5	65.8	55

3 讨论

近几年来, 分子生物学研究领域的飞速发展, 相继出现了以 PCR 为基础的一系列用于检测基因损伤和突变的 DNA 技术如 RAPD、PCR-SSCP、AFLP 等, 这些新技术的出现为环境科学工作者提供了新的思路和研究工具, 使毒理学研究从经典的整体器官水平向分子水平飞跃。采用污染环境中生物体的 DNA 损伤作为生物标记物, 研究毒性物质对生物体产生的毒

性效应正成为生态毒理学家和环境风险评价研究中的一项重要技术手段。生物体经有毒化学物质处理后会 导致 DNA 的损伤和突变,一些突变可导致引物结合位点的核苷酸片段的丢失或增加;另一些突变可影响 DNA 聚合酶的活性,这些变化都可以通过生物体相关 DNA 图谱变化检测出来,通过比较分析处理组与对照组生物体的 DNA 指纹图谱变化并进行统计分析,可以得出 DNA 的受损情况。Atienzar 等^[10,11]研究表明,环境污染物诱导生物体细胞内的 DNA 损伤和突变,后者导致引物结合位点的核苷酸缺失或增加,最终影响 DNA 片段的图谱;同时认为不同 RAPD 谱带变化与 DNA 变化之间具有相互关系。Sandra C 等^[12]将 AFLP 与细胞流式仪(flow cytometry,FCM)这两种技术结合起来分析检测了 Novate Mezzola 铁矿 区被重金属 Cd、Ni 和 Cr 污染的土壤中各种重金属对高等植物白车轴草(*White clover*.,豆科)所产生的遗传毒性效应。结果表明,由不同浓度重金属作用所导致白车轴草的细胞内 DNA 含量和序列的变化都能够通过 AFLP 和 FCM 检测出来,甚至是极其微小的由污染物所导致的生物体 DNA 损伤。AFLP 技术不仅能够检测到由于污染胁迫所造成的生物体内 DNA 含量上的改变,而且能够检测到 DNA 结构和序列上的改变,更适用于检测污染物质的遗传毒性效应。同时使用多种类型的生物标记物有助于提高毒性效应检测的效率,因为不同的生物标记物反映了污染物在不同阶段、不同层次上的毒性效应^[13]。

通过本研究得出以下结论:①在 Cu 浓度为 12.5 mg·L⁻¹ 时,与对照相比,主根根长显著变短,抑制率为 13.5%,根尖中可溶性蛋白含量显著降低,抑制率为 17.3%;②在 Cu 浓度为 12.5 mg·L⁻¹ 时,与对照相比,大麦幼苗根系基因组 DNA 受到严重损伤,AFLP 指纹图谱发生显著变化,多态性百分比达到 30%;③AFLP 图谱改变是对 Cu 胁迫响应最为敏感的生物标记物;④利用 AFLP 分析获得的 DNA 多态性变化,并结合幼苗生长等指标,可进行环境 Cu 污染的早期诊断和生态风险评价。

参考文献:

[1] Ouzounidou G. Copper-induced changes on growth, metal content and

photosynthetic function of *Alyssum Montanan* plants [J]. *Environ Experi Botan*, 1994, 34 (2):165-172.

[2] Bagley M J, Anderson S L. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints [J]. *Ecotoxicology*, 2001, 10 (4): 239-244.

[3] Massimo L,Fabrizio G, Serena I,et al. Genetic and DNA-methylation change induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L [J]. *Chemosphere*, 2004, 54: 1049-1058.

[4] Massimo L, Fabrizio G, SerenaI, et al. AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants [J]. *Chemosphere*, 2003,52:1183-1188.

[5] Sandra C, Roberta A, Massimo L,et al. Soil genotoxicity assessment: A new strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36:2748-2753.

[6] Bradford A. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

[7] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from mollogram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue [J]. *Plant Molecular Biol*, 1985, 5(2): 69-76.

[8] VOS P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprints [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414

[9] 张义贤.重金属对大麦的毒性效应[J].环境科学学报,1997,17(2): 199-205.

ZHANG Yi xian. Toxicity of heavy metals to *Hordeum vulgare*[J].*ACTA Scientiae Circumstantiae*, 1997,17(2): 199-205

[10] Atienzar F A, Cordi B, Donkin M E. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palnaria palnata*[J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 50: 1-12.

[11] Atienzar F A, Venier P, Jha A N, et al. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations [J]. *Mutat Res*, 2002,521: 151-163.

[12] Sandra C, Roberta A, Massimo L, et al. Soil genotoxicity ssessment: A new strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 2748-2753.

[13] Besarati N A, Van Schooten F J, Schiderman P. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms[J].*Carcinogenesis*, 2001, 21: 395-401.