

运用 RAPD 技术检测除草剂对草鱼的致突变作用

陈家长¹, 董在杰¹, 胡庚东¹, 范立民¹, 吴进才²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 2. 扬州大学农学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 用使它隆和噻草酮注射草鱼, 抽取注射前后的草鱼血液提取基因组 DNA, 选用 20 个随机引物对草鱼基因组 DNA 进行 RAPD 扩增。结果表明, 11 个引物能产生 2~9 条扩增带, 扩增产物分子大小在 200~1 900 bp 之间。其中引物 S10 能检出用使它隆染毒前后草鱼基因组 DNA 的差异, 引物 S17 能检出用噻草酮染毒前后草鱼基因组 DNA 的差异。RAPD 技术可运用于环境水质监测。

关键词: 除草剂; 致突变; 草鱼; RAPD

中图分类号: X835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 2043(2004)05 - 1037 - 02

Detection on Mutagenicity of Herbicides to Grass Carp by RAPD Technique

CHEN Jia-zhang, Dong Zai-jie, HU Geng-dong, FAN Li-min, WU Jin-cai

(Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Two kinds of herbicides, Starane and metribuzin, were intraperitoneally injected into grass carps at the dosages of 24 mg · kg⁻¹ and 170 mg · kg⁻¹, respectively. Blood samples were drawn from caudal vein before and after injection with heparin sodium anti-coagulated syringes. Then 30 μL of blood were added to 470 μL of saline EDTA - Tris buffer. After adding final concentrations of 0.5% SDS and 200 μg · mL⁻¹ proteinase K, the mixture was incubated overnight at 55 °C. The DNA was extracted and purified by successive extractions with phenol, phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) and chloroform: isoamyl alcohol (24: 1). Then the DNA was precipitated with ice-cold absolute ethanol and washed with 70% ethanol. The DNA pellet was dried and re-suspended in Tris - EDTA buffer (pH 8.0). The DNAs in every experimental groups were mixed and diluted 80~100 times for PCR template. 20 arbitrary primers were used to amplify genomic DNA of grass carp. The amplification reaction was performed in 10 mmol · L⁻¹ Tris - HCl (pH 9.0), 50 mmol · L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X - 100, 2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 15 ng primer, 1.2 units Taq DNA polymerase and 20 ng template DNA in a final volume of 25 μL. The reaction parameters were: pre-denaturing for 3 min at 95 °C, then denaturing for 1 min at 94 °C, annealing for 1 min at 36 °C, prolonging for 2 min at 72 °C, reaction recycling 45 times, and finally prolonging for 10 min at 72 °C. The amplified products were separated on 1.4% agarose gel containing ethidium bromide, and were observed and photographed under UV light. The result showed that 2~9 amplification fragments were generated by using 11 primers. The molecular size of amplified products was between 200~1 900 bp. The primer S10 produced different amplified fragments of grass carp genomic DNA between before and after injection of Starane and S17 produced different amplified fragments of grass carp genomic DNA between before and after injection of metribuzin. The result indicated that the mutagenicity of herbicides could be detected by using RAPD technique. It was inferred that RAPD technique could be potentially used in monitoring of water quality.

Keywords: Herbicide; mutagenicity; grass carp; RAPD

化学药物残留对生物体的危害主要有致癌、致畸和致突变 3 个方面。除草剂对作物的毒性作用已有不少研究^[1,2], 但对水生动物, 尤其是鱼类的影响, 则报道不多, 只对鲫、黄鳝和泥鳅等做过有关研究^[3-6]。草鱼为我国主要的养殖鱼类之一, 除草剂对草鱼的遗传毒性还未见报道。本文通过随机扩增多态性

DNA(RAPD) 这一分子生物学技术, 检测了除草剂使它隆和噻草酮对草鱼的致突变作用。

1 材料与方法

1.1 实验草鱼

本实验所用的草鱼取自本中心试验场, 体长范围为 29.6~35.4 cm, 体重范围为 386.4~502.7 g。

1.2 实验处理

实验鱼分两组, 每组 5 尾, 分别用使它隆和噻草酮进行腹

收稿日期: 2004 - 03 - 27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170162)

作者简介: 陈家长(1964—), 男, 研究员, 从事渔业生态环境保护技术研究。E-mail: chenjz@ffrc.cn

腔注射,注射剂量分别为 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。注射前从尾静脉抽 0.5 mL 血用作对照。注射 24 h 后,再从尾静脉抽血。

1.3 实验鱼基因组 DNA 的提取

实验鱼尾静脉抽血,肝素钠抗凝。取 $30 \mu\text{L}$ 全血置于 $470 \mu\text{L}$ SET($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH8.0) 中,加 SDS 和蛋白酶 K 分别至终浓度 0.5% 和 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴消化过夜,用等体积饱和酚抽提 2 次,再分别用等体积酚/仿/醇、仿/醇各抽提 1 次,无水乙醇沉淀,加适量 TE($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH8.0) 于 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴溶解 DNA。每组各取 5 尾鱼的 DNA $5 \mu\text{L}$ 进行混合,用无菌水稀释 $80 \sim 100$ 倍后作为 PCR 反应模板。

1.4 随机引物

引物购自上海生工生物工程公司,产品编号为 S1 ~ S20。

1.5 PCR 反应

所用试剂均购自上海生工生物工程公司,反应总体积为 $25 \mu\text{L}$ 。其中含: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 9.0), $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 0.1% Triton X-100, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 15 ng 引物, 1.5 单位 Taq 酶, 20 ng 模板 DNA。阴性对照不加模板 DNA。于反应混合物上加约 $25 \mu\text{L}$ 矿物油,在 P. E. 480 上进行扩增反应。扩增反应参数为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min , 然后在 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min , $36 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min , 反应循环 45 次,最后在 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。扩增产物用含溴化乙锭的 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察拍照。

2 结果

2.1 引物筛选

在所用的 20 个随机引物中,有 11 个引物(S1、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S10、S13、S16 和 S17) 都有扩增产物,扩增产物的条带数在 $2 \sim 9$ 条之间,扩增产物的分子量在 $200 \sim 1900 \text{ bp}$ 之间。

2.2 突变检测

图 1 是草鱼基因组 DNA 的 RAPD 扩增图谱。

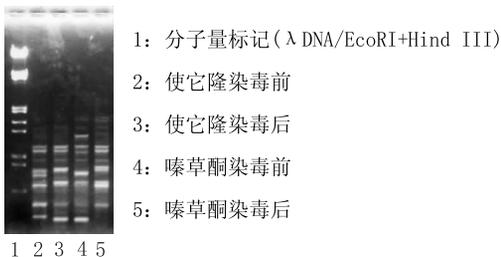


图 1 除草剂染毒前后草鱼基因组 DNA 的 RAPD 扩增图谱
Figure 1 RAPD patterns of grass carp genomic DNA before and after injection of herbicides

在 11 个能扩增草鱼基因组 DNA 的引物中,只存有 2 个引物能检出染毒前后草鱼基因组 DNA 的差异:引物 S10 可检出使它隆对草鱼的致突变性,见图 1 第 2、第 3 泳道;引物 S17 能检出噻草酮对草鱼的致突变性,见图 1 第 4、第 5 泳道。

3 讨论

化学诱变剂的致突变作用可导致染色体结构发生畸变,使细胞出现微核,这已在很多动物细胞中观察到^[3-5,7,8]。微核是由于染色体或纺锤丝断裂而产生的染色体断片,这种结构上的改变必然会引起其携带的遗传物质的改变,即 DNA 分子的序列发生改变。PCR 技术可以检测出这种改变。基因组 DNA 序列的改变会使引物与模板 DNA 的结合位点分布发生相应变化,从而导致 PCR 产物在数量和分子量上随着发生相应改变。本实验中各有 1 个引物能分别检出使它隆和噻草酮这 2 种除草剂引起的草鱼基因组 DNA 发生的突变。

检测污染物对生物体的诱变性的方法主要有 Ames 试验、检测细胞微核率及染色体畸变率等^[9],也有运用单细胞电泳来检测除草剂对 DNA 的损伤^[6]。本实验结果表明,运用 RAPD 技术也可以检测出诱变剂对鱼类的致突变作用。RAPD 技术比微核及染色体畸变能更灵敏地检测出动物体内的突变,因为即使基因组 DNA 上的某一个位点发生碱基突变,都可能导致引物与模板 DNA 的结合位点发生变化,从而引起 PCR 扩增产物的改变。

由于 RAPD 技术能够非常灵敏地扩增 DNA,而且极易受反应温度的影响,因此,RAPD 反应的稳定性及结果的可重复性一直是分子生物学工作者所关心的问题。现在运用该项 RAPD 技术在鲤鱼等上进行过多项研究^[10,11],也取得了理想的结果。只要操作过程规范、仔细,反应条件稳定,RAPD 技术具有良好的稳定性和可重复性。

因此,RAPD 这一分子生物学技术在环境水质监测方面具有应用潜力。

参考文献:

- [1] 黄河,熊治廷,刘杰,等. 除草剂在土壤-植物系统中的环境行为与毒性效应[J]. 湖北农学院学报,2002,22(3): 282-284.
- [2] 程景胜,陈宏,王振英,等. 有机磷除草剂毒性对作物蛋白质组分变化的研究[J]. 农业环境科学学报,2003,22(5): 614-616.
- [3] 楼允东,吴萍. 亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发[J]. 中国环境科学,1996,16(4): 275-278.
- [4] 耿德贵,王秀琴,刘士旺,等. 除草剂使它隆对黄鳝细胞的致突变作用研究[J]. 环境与健康杂志,2000,17(2): 103-105.
- [5] 南旭阳. 除草剂“草甘膦”对鲫鱼外周血红细胞微核及核异常的影响[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),2001,24(4): 329-331.
- [6] 张朝晖,陈锋,吴端生,等. 除草剂乐草隆对红鲫的遗传毒性研究[J]. 中国实验动物学报,2002,10(3): 185-187.
- [7] 陈军建,夏宜珍. 青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立[J]. 水生生物学报,1993,17(4): 298-308.
- [8] 汤新慧. 除草剂诱发蟾蜍蝌蚪红细胞微核的研究[J]. 中国环境科学,1998,18(2): 162-165.
- [9] Evans H J. Mutation cytogenetics for hazardous matters inspection[J]. *Mutat Res*, 1988, 240: 355-363.
- [10] Dong Z, Zhou E. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp *Cyprinus carpio* L. [J]. *Aquaculture Research*, 1998, 29: 595-600.
- [11] 董在杰,朱健,袁新华,等. 建鲤基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 湛江海洋大学学报,2002,22(1): 3-6.