

Cr⁶⁺污染致大麦幼苗基因组 DNA 损伤效应的研究

张义贤, 李向科

(山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要: 应用随机扩增 DNA 多态性(RAPD)技术,研究了 Cr⁶⁺胁迫对大麦幼苗 DNA 含量的影响及根系基因组 DNA 的损伤效应。结果表明,在 5~80 mg·L⁻¹ 的 Cr⁶⁺浓度范围内处理 7 d 后,大麦幼苗根系的 DNA 含量随 Cr⁶⁺处理浓度的增加明显降低,各处理组的 DNA 含量均低于对照,其中, 5~40 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺处理组的 DNA 含量降幅最大。Cr⁶⁺处理后大麦幼苗根系的 DNA 增色效应随浓度升高呈现先增后减的趋势,5~20 mg·L⁻¹ 的 Cr⁶⁺浓度范围内大麦 DNA 的增色效应明显高于对照,其中 10 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺的 DNA 增色效应最为显著,而 40 mg·L⁻¹ 以上的 Cr⁶⁺处理后增色效应下降。Cr⁶⁺胁迫使大麦基因组的 RAPD 图谱发生变化,包括 DNA 谱带的增加、减少及其荧光强度的改变,且 DNA 多态性谱带的变化与 Cr⁶⁺浓度具有正相关效应。通过对大麦基因组的 DNA 损伤的检测,可以评估 Cr⁶⁺污染对植物的遗传毒害效应。

关键词: RAPD; Cr⁶⁺ 胁迫; 大麦幼苗; DNA 损伤; 增色效应

中图分类号: X503.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0430-05

Effects of Cr⁶⁺ Stress on DNA Damage of Genome in *Hordeum vulgare* Seedlings

ZHANG Yi-xian, LI Xiang-ke

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The influence of Cr⁶⁺ stress on the content of DNA of the *Hordeum vulgare* seedling and its damaging effect of the DNA in the root of seedlings through random amplified polymorphic DNA technique were studied. The results indicated that the content of DNA in the root of seedling decreased greatly with the increasing of Cr⁶⁺ concentrations of 5~80 mg·L⁻¹ after 7 d, and the content of DNA in every group was lower than that in the control. The DNA content of the seedling decreased rapidly at 5~40 mg·L⁻¹ of Cr⁶⁺, but slowly decreased at more than 40 mg·L⁻¹ of Cr⁶⁺. The DNA hyperchromic effects tended to increase first, then decrease, obviously higher than those of the control at 5~20 mg·L⁻¹ of Cr⁶⁺ and was most remarkable at 10 mg·L⁻¹. The DNA hyperchromic effect was lower than those in the control at 40~80 mg·L⁻¹ of Cr⁶⁺. The random amplified polymorphic DNA(RAPD)profiles of root tips changed under Cr⁶⁺ treatments, with new bands occurrence and normal bands loss and variation in band intensity compared with the normal seedlings. These changes of DNA polymorphisms positively correlated with the Cr⁶⁺ concentration. It is helpful for the detection of genotoxic effects of Cr⁶⁺ pollution on plants through testing the damage of DNA in the barley.

Keywords: RAPD; Cr⁶⁺ stress; *Hordeum vulgare* seedling; DNA damage; hyperchromic effect

铬(Cr)是自然界中广泛存在的重金属元素,也是一种重要的环境污染物质,被列为工业“五毒”之一。铬在环境中以不同价态的化合物存在,其中 Cr³⁺ 是人体和动物必需的微量元素,而 Cr⁶⁺ 因其强氧化性和对皮肤的高渗透性,对动物和人体具有毒害效应,能引起肾脏、肝脏、神经系统和血液的广泛病变,并诱发肺癌,被国际癌症研究机构(IARC)及美国政府工业卫

生学家协会(ACGIH)确定为毒性很强的重金属致癌物^[1-3]。业已证明,铬不是植物生长的必需元素,也不参与细胞的结构组成,但在植物体内积累过量,可在代谢过程中参与植物体内的氧化还原反应,产生大量活性氧,导致植物细胞膜透性增大,酶活性下降,叶绿体分解,抑制细胞分裂,诱发染色体畸变和微核的形成,并对蛋白质及 DNA 等生物大分子造成损伤^[4-8]。

近年来,基于 PCR (polymerase chain reaction, PCR) 技术建立起的随机扩增多态 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术以其快速、灵敏、特异

收稿日期: 2007-04-17

基金项目: 山西省自然科学基金项目(2006011074)

作者简介: 张义贤(1955—),男,教授,主要从事遗传毒理学研究。

E-mail: zhangyx@sxu.edu.cn

性强、适用范围广、不需要物种特异的探针或引物等特点,被广泛用于检测环境诱变物对物种 DNA 的损伤与突变效应^[9,10]。但重金属胁迫对植物基因组 DNA 影响的研究工作甚少^[11,12],而 Cr^{6+} 对大麦基因组 DNA 是否具有损伤效应还未见报道。本实验采用 RAPD 技术,研究了不同浓度 Cr^{6+} 对大麦幼苗基因组 DNA 多态性的影响,比较分析了大麦幼苗根系 DNA 含量与增色效应的关系,以期在分子水平上进一步探索 Cr^{6+} 对作物的遗传毒害机理,并为检测重金属污染对作物造成的遗传损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用材料大麦 (*Hordeum vulgare*) 品种为“晋科 571”,由山西省农科院品种资源所提供,该大麦在生长过程中未受任何重金属污染。

1.2 材料培养及处理

选取饱满、大小均一的大麦种子,用 5% 的 NaClO 消毒 30 min,然后用去离子水冲洗干净,30 °C 温水浸种 4 h,置于 28 °C 恒温培养箱中避光萌发,种子露白后排列于铺有数层滤纸的大培养皿中,每个培养皿中置 40 粒种子,分别以 1/2Hoagland 营养液配制的 5、10、20、40、60、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cr^{6+} 溶液 (CrO_3 配制,浓度以纯金属离子计)处理幼苗,对照用 1/2Hoagland 营养液处理,光照培养箱中培养,昼夜温度(25 °C/20 °C),每 12 h 更换一次处理液,每一处理浓度设 3 个重复。

1.3 测试方法

1.3.1 DNA 提取及含量测定

Cr^{6+} 处理大麦幼苗 7 d 后,用 CTAB 法^[13]进行总 DNA 提取。分别称取 0.3 g 对照和处理组的大麦根尖,置于预冷的研钵中液氮研磨,将粉末转移到 2 mL 预热至 60 °C 的 CTAB 分离缓冲液中,轻轻摇动使之混匀。样品于 65 °C 保温 30 min 后加 2 mL 氯仿-异戊醇轻轻混匀,室温下 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,重复抽提 2 次后将上清液转移到一干净离心管中,加

2/3 体积的冷异丙醇,轻轻混匀以沉淀核酸。用玻璃棒搅出 DNA 沉淀并用洗涤缓冲液洗涤 2 次,室温下风干,将 DNA 沉淀溶于 300 μL TE 中。DNA 粗提液用 RNase A 37 °C 消化 60 min 以除去 RNA 污染,用紫外分光光度法测各处理组的 DNA 含量。

1.3.2 DNA 增色效应的测定和计算

分别取两份上述大麦根尖 DNA 样品,每份 20 μL ,溶于 1 mL 0.08 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中。一份在 70 °C 的水浴上加热,另一份置于室温(24.5 °C)。30 min 后分别在紫外分光光度计上测定其 A_{260} 值,以 $[(A_{260,70\text{ }^\circ\text{C}} - A_{260,24.5\text{ }^\circ\text{C}}) / A_{260,24.5\text{ }^\circ\text{C}}] \times 100\%$ 作为 DNA 增色效应指标,用以研究 Cr^{6+} 引起的 DNA 交联。

1.3.3 RAPD 分析

供试的 10 个随机引物(每个引物为 10 bp,表 1)及 Taq DNA polymerase、dNTPs、Marker 和琼脂糖均购自上海生工生物技术有限公司。

以上述提取的 DNA 样品为模板,用 10 个引物在 PCR 仪(PTC-200,美国)上进行 RAPD 扩增反应。PCR 反应总体积 25 μL ,体系中含有 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机引物,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs (4 种成分均为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),1 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL ,15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,100 ng 基因组总 DNA 和 2U Taq DNA polymerase。反应程序是:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,38 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,最后在 74 °C 保温 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,0.015% EB 染色 30 min,取 DNA marker(DL2000)作为标准,以凝胶成像分析系统(TMW-20 Transilluminator,美国)进行观察并进行数据分析。

2 结果与分析

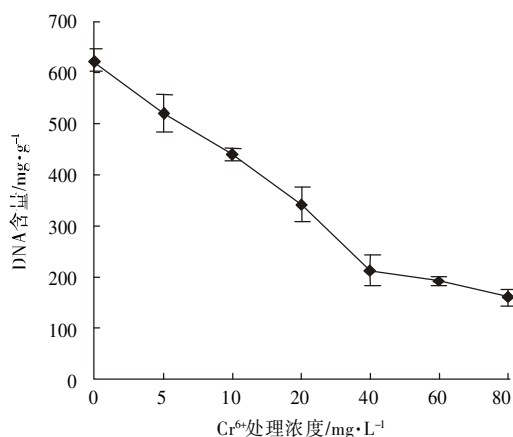
2.1 Cr^{6+} 胁迫对大麦幼苗根系 DNA 含量的影响

图 1 显示了不同浓度 Cr^{6+} 处理大麦幼苗后对根系 DNA 含量的影响。与对照组相比,随着 Cr^{6+} 浓度的增加,大麦幼苗根系 DNA 含量逐渐降低,在 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时 DNA 含量达到最小值。由图 1 可知,5~40 $\text{mg} \cdot$

表 1 试验中所用的随机引物序列(5'→3')

Table 1 Sequences of random primers used in the experiment (5'→3')

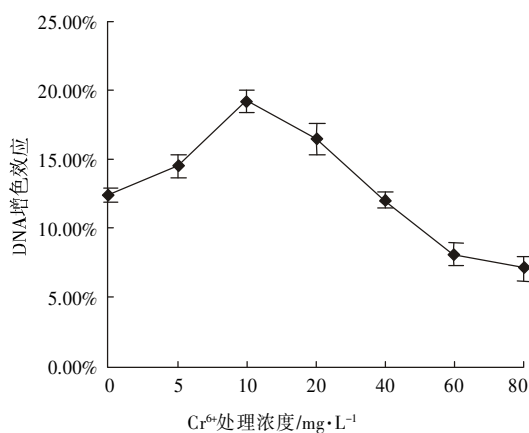
引物序号	引物编号	引物碱基序列	引物序号	引物编号	引物碱基序列
1	S173	CTGGGGCTGA	6	S180	AAAGTCGCCC
2	S187	TCCGATGCTG	7	S181	CTACTGCGCT
3	S198	CTGGCGAACT	8	S199	GAGTCAGCAG
4	S242	CTGAGGTCTC	9	S234	AGATCCCGCC
5	S256	CTGCGCTGGA	10	S255	ACGGGCCAGT

图1 Cr⁶⁺对大麦根尖 DNA 含量的影响Figure 1 Effect of Cr⁶⁺ on the extractable DNA content in the seedling roots

L⁻¹的Cr⁶⁺处理使DNA含量迅速下降,此后则缓慢下降。表明5~40 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺处理使大麦幼苗根系DNA发生断裂降解,且随着处理浓度的增加,DNA降解程度也在增加,在40 mg·L⁻¹时,DNA的降解程度最大。而Cr⁶⁺浓度高于40 mg·L⁻¹时则对大麦幼苗根系DNA合成产生明显的影响,致使DNA含量处于较低水平。

2.2 Cr⁶⁺胁迫对大麦幼苗根系 DNA 增色效应的影响

Koch等(1994)^[14]指出,DNA的增色效应可以反映DNA的解链程度,而DNA解链程度与其链长、链间交联及DNA与蛋白质交联程度有关。发生断裂会使DNA链长变短,增色效应提高;而发生交联则使DNA解链温度提高,增色效应下降。因此,DNA增色效应的改变可用于判断DNA是否发生断裂以及是否发生链间交联等损伤效应。从图2可以看出,大麦幼苗根系DNA的增色效应指标随着Cr⁶⁺浓度升高呈现

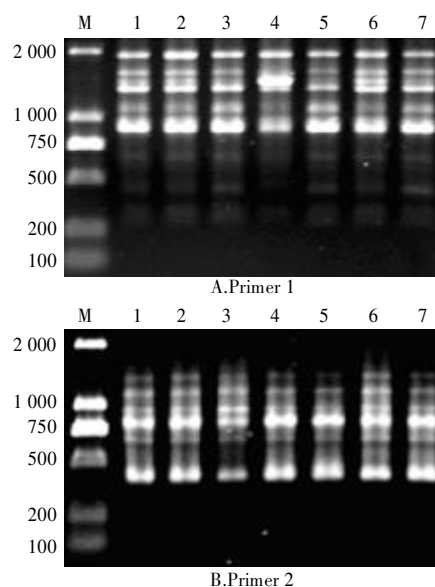
图2 Cr⁶⁺对大麦根尖 DNA 增色效应的影响Figure 2 Effect of Cr⁶⁺ on DNA hyperchromicity in the seedling roots

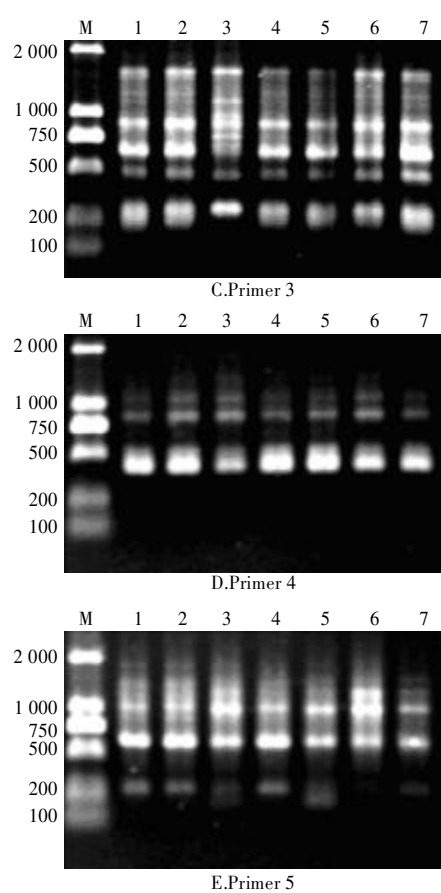
先增大后减小的趋势。5~20 mg·L⁻¹的Cr⁶⁺处理大麦幼苗7d后,根系DNA的增色效应均大于对照,表明此浓度范围的Cr⁶⁺使DNA发生了不同程度的断裂,导致增色效应的增高,其中10 mg·L⁻¹Cr⁶⁺对DNA的增色效应最为显著。当Cr⁶⁺浓度大于40 mg·L⁻¹时,DNA增色效应小于对照,表明大于40 mg·L⁻¹的Cr⁶⁺使大麦幼苗根系DNA发生了链间交联或DNA与蛋白质的交联,因而DNA未见明显的增色效应。本研究证明了不同浓度的Cr⁶⁺处理对大麦幼苗根系DNA损伤形式具有差异。

2.3 DNA 损伤的 RAPD 分析

本实验用于RAPD检测的10条随机引物中,仅有5条引物可以扩增出特异、稳定的PCR产物。RAPD检测中对照基因组共扩增出45条谱带,与对照相比,5~80 mg·L⁻¹Cr⁶⁺处理大麦幼苗后,大麦幼苗根系基因组DNA的RAPD图谱在数目、形状及强度方面均发生明显变化。

由图3、表2可知,在较低浓度(5~20 mg·L⁻¹)Cr⁶⁺处理下,RAPD谱带中新增加谱带的数目较多,并且新增的DNA条带的分子量均大于1000 bp。如图3A中20 mg·L⁻¹处理组经引物1扩增后新增1条谱带,图3C中10 mg·L⁻¹处理组经引物3扩增后新增了3条谱带,图3D中5和10 mg·L⁻¹处理组经引物4扩增后各增加了1条谱带。而在40~80 mg·L⁻¹处理组中缺失的RAPD谱带较多,表现为40 mg·L⁻¹处理组经引物2和引物3扩增后各缺失了2条谱带,80 mg·L⁻¹处理组经引物4扩增后缺失了2条谱带,80 mg·L⁻¹处理组经引物5扩增后缺失了4条谱带。谱带的强度变化方面表现在引物1、引物3、引物5扩增条件下





M: DNA marker(DL2000); 1: 对照组; 2~7: 5~80 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 浓度

图 3 不同 Cr⁶⁺ 浓度条件下大麦根尖基因组 DNA 的 RAPD 图谱
Figure 3 RAPD profiles of genomic DNA in root-tips of barley seedlings exposed to different Cr⁶⁺ concentrations

5~20 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 处理使 RAPD 谱带的强度明显高于对照,而置于 40~80 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 处理的大麦根系 DNA 经引物 1、引物 2、引物 5 扩增后 RAPD 谱带的强度弱于对照。由表 2 还可看出,大麦幼苗根系基因组 DNA 的多态性谱带(与对照相比增加或减少的谱带, a+b)

的数目与发生变化的总谱带(a+b+c+d)的数目均随 Cr⁶⁺ 处理浓度的增大而逐渐增多,呈现明显的正相关效应。由此可知,不同的引物可以检验出 DNA 一级结构上不同位点的损伤。

3 讨论

本研究结果表明,不同浓度的 Cr⁶⁺ 处理后,大麦幼苗根系 DNA 含量明显降低,DNA 增色效应指标及 RAPD 谱带均出现了较大变化,表明 Cr⁶⁺ 对大麦幼苗基因组 DNA 可造成较大遗传损伤,是一种毒性较强的致突变剂。

黑淑梅等(2005)^[12]研究了 5~100 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 对 3 d 龄和 10 d 龄小麦幼苗根系 DNA 含量的影响,发现随着 Cr⁶⁺ 浓度的增加,两苗龄小麦幼苗根系 DNA 含量逐渐降低,其中 5~20 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 浓度范围内 DNA 降幅较大。在本实验中,不同浓度(5~80 mg·L⁻¹) Cr⁶⁺ 处理 7 d 龄大麦幼苗根系后,DNA 含量亦随 Cr⁶⁺ 浓度增加而显著下降,与上述结果是相似的。但 DNA 含量降幅最大的是 5~40 mg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 浓度范围。这种现象证明 Cr⁶⁺ 对不同麦类作物 10 d 龄前幼苗的 DNA 合成均具有抑制作用,同时也表明大麦对 Cr⁶⁺ 的毒性耐性大于小麦。重金属胁迫导致植物幼苗 DNA 含量降低的现象在其他作物中也得到证实^[15]。

目前,国内外已将 DNA 增色效应指标作为判断 DNA 断裂损伤的主要依据。国外的研究表明,一些二价金属离子如 Cd²⁺、Ni²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺ 等有促进 DNA 链间交联的效应^[16]。葛才林等(2002)^[15]的研究证实,1 mmol·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 和 0.1 mmol·L⁻¹ 的 Hg²⁺ 能使小麦、水稻叶片的 DNA 发生链间交联,引起叶片 DNA 增色效应下降。与二价金属离子相似,黑淑梅等(2005)^[12]的

表 2 Cr⁶⁺ 胁迫下大麦幼苗根尖基因组 DNA 的多态性变化

Table 2 Change of DNA polymorphism of genome in barley seedlings under Cr⁶⁺ stress

引物编号	0	Cr ⁶⁺ 浓度/mg·L ⁻¹															
		5				10				20				40			
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
Primer 1	10	1	0	1	0	0	0	1	2	1	3	1	2	0	1	1	2
Primer 2	13	2	0	2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	2	1	3
Primer 3	10	2	1	1	0	3	1	2	1	1	2	1	2	0	2	0	1
Primer 4	5	0	0	2	0	1	0	2	1	0	0	2	0	1	1	1	0
Primer 5	7	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1
Total bands	45	6	1	2	1	4	3	6	5	2	7	5	6	2	8	4	7
a+b	10	7				7				9				10			
a+b+c+d	13	15				19				20				21			

注:a 为新出现的谱带,b 为消失的谱带,c 为带强增高的谱带,d 为带强减弱的谱带。a+b 为多态性谱带,a+b+c+d 为变化的谱带。

研究发现,高浓度的 Cr⁶⁺ (80~100 mg·L⁻¹) 有促进小麦幼苗根系 DNA 链间交联的效应。迄今,Cr⁶⁺ 对大麦是否具有同样效应还未见报道。本实验结果证明,低浓度 (5~20 mg·L⁻¹) 的 Cr⁶⁺ 处理后,大麦幼苗根系 DNA 发生不同程度的断裂,增色效应增高;而在高浓度 (40~80 mg·L⁻¹) 条件下 DNA 增色效应下降,DNA 发生链间交联或 DNA 解链温度提高。这一结果显示,Cr⁶⁺ 对不同作物 DNA 造成损伤的浓度存在明显差异。

Mengoni 等 (2000)^[17]证明 Cu 污染能够引起奇异花瓶草细胞 DNA 发生损伤,并最终影响 DNA 的 RAPD 图谱发生变化。Liu 等 (2005)^[11]用 20~80 mg·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 处理大麦幼苗后也发现,在所试的浓度范围内大麦根系 DNA 的 RAPD 图谱亮度低于对照,20~40 mg·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 浓度范围内新增的 RAPD 谱带较多,而 80 mg·L⁻¹ 浓度时缺失的谱带相对较多。在本实验中,不同浓度的 Cr⁶⁺ 处理大麦幼苗后,根系 DNA 的 RAPD 图谱在数目、形状及强度方面均发生明显变化,主要表现为低浓度 (5~20 mg·L⁻¹) 的 Cr⁶⁺ 处理下新增的谱带数目较多、谱带亮度明显增强,而高浓度 (40~80 mg·L⁻¹) 条件下缺失的谱带数较多、谱带亮度低于对照。DNA 多态性谱带与总变化谱带均随 Cr⁶⁺ 浓度增大而增多,呈现明显的正相关效应。上述研究结果显示不同重金属胁迫会造成大麦 DNA 一级结构上不同位点的损伤,同时也表明 Cr⁶⁺ 胁迫对大麦幼苗根系 DNA 的损伤比 Cd²⁺ 更为严重。重金属对作物 DNA 损伤的机理值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 王 夔.生命科学中的微量元素(下卷)[M].北京:中国计量出版社,1992.354-381.
- [2] 孟紫强.环境毒理学[M].北京:中国环境科学出版社,2000.140-146.
- [3] Xie H, Wise SS, Holmes A L. Carcinogenic lead chromate induce DNA double strand breaks in human lung cells[J]. *Mutat Res*, 2005, 586(2):160-172.
- [4] 张义贤.三价铬和六价铬对大麦毒害效应的比较[J].中国环境科学,1997,17(6):565-568.
- [5] 徐勤松,施国新,杜开和.六价铬污染对水车前叶片生理生化及细胞超微结构的影响[J].广西植物,2002,22(1):92-96.
- [6] Debasis Bagchi, Sidney J Stohs, Bernard W Downs, et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium [J]. *Toxicology*, 2002, 180:5-22.
- [7] 肖经纬.六价铬致 DNA 损伤机制的研究进展[J].国外医学卫生学分册,2006,33(2):97-100.
- [8] 周易勇,刘同仇,邓波儿.六价铬污染对小白菜产量、养分吸收及若干生理指标的影响[J].环境科学学报,1990,10(2):255-257.
- [9] Williams J, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acid Res*, 1990, 18:6531-6535.
- [10] Atienzer F A, Venier P, Jha A N, et al. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations [J]. *Mutat Res*, 2002, 521:151-163.
- [11] Liu Wan, Li P J, Qi X M, et al. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis [J]. *Chemosphere*, 2005, 61:158-167.
- [12] 黑淑梅,余小平. Cr⁶⁺ 胁迫对小麦幼苗根系生长的影响及 DNA 损伤效应研究[J].西北植物学报,2005,25(3):541-545.
- [13] 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):248-254.
- [14] Koch C J, Giandomenico A R. The alkaline elution technique for measuring DNA single strand breaks: increased reliability and sensitivity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1994, 220:58-65.
- [15] 葛才林,杨小勇,刘向农,等.重金属对水稻和小麦 DNA 甲基化水平的影响[J].植物生理与分子生物学报,2002,28(5):363-368.
- [16] Duguid D G, Bloomfield V A. Agregation of melted DNA by divalent metal ion-mediated cross-linking [J]. *Biophys J*, 1995, 69:2642-2648.
- [17] Mengoni A, Gonnelli C, Galardi F. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae); a random amplified polymorphic DNA analysis [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(9):1319-1324.