

## 单细胞凝胶电泳技术检测蜘蛛血细胞 DNA 损伤研究

李锐<sup>1</sup>, 李生才<sup>1</sup>, 杨怀卿<sup>2</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 罗原<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; <sup>2</sup>山西农业大学现代教育科技学院, 山西太谷 030801)

**摘要:**以体外染毒法对星豹蛛雌、雄成蛛进行过氧化氢和甲醛染毒处理, 采用单细胞凝胶电泳技术检测蜘蛛血细胞DNA损伤效应, 用CASP软件分析彗星图像, 并计算受损伤细胞率、彗星尾长和Olive尾矩。结果表明, 不同浓度的过氧化氢能引起蜘蛛血细胞DNA断裂损伤, 且损伤程度与浓度之间有明显的剂量-效应关系; 不同浓度的甲醛能引起蜘蛛血细胞DNA损伤, 其中在10 μmol/L时引起DNA断裂, 在25 μmol/L、40 μmol/L、55 μmol/L时引起DNA交联, 而在70 μmol/L时引起血细胞凋亡。

**关键词:**过氧化氢; 甲醛; 血细胞; 蜘蛛; DNA损伤; 单细胞凝胶电泳

**中图分类号:**S476+.2 **文献标识码:**A

### Study on DNA Damages of Hemocytes in Spider with Single Cell Gel Electrophoresis

Li Rui<sup>1</sup>, Li Shengcai<sup>1</sup>, Yang Huaiqing<sup>2</sup>, Liu Jia<sup>1</sup>, Luo Yuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801;

<sup>2</sup>Institute of modern education technology, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801)

**Abstract:** To study and evaluate genotoxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and formaldehyde in the spider, *Pardosa astrigera*, the adult of female and male spiders were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations of 50, 75, 100, 125, 150 μmol/L and formaldehyde at 10, 25, 40, 55, 70 μmol/L, respectively. DNA damage of hemocytes was detected by the comet assay. CASP software was used to analyze the comet pictures. The results show that the percentage of comet, the percentage of tail length, and the tail moment of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tested groups were significantly different from those of the control group ( $P < 0.05$ ). A statistically significant dose-dependent increase in DNA damage was observed. Formaldehyde induces DNA strand breaks at 10 μmol/L, but crosslinks at 25, 40, 55 μmol/L, and apoptoses at 70 μmol/L in hemocytes cells of spiders.

**Key words:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formaldehyde, hemocytes, spider, DNA damage, single cell gel electrophoresis assay

单细胞凝胶电泳 (Single Cell Gel Electrophoresis Assay, SCGE) 又称彗星试验 (Comet Assay), 是由 Ostling 等首次提出, 并利用该技术在中性条件下检测 X 射线引起的 DNA 双链断裂<sup>[1]</sup>。Singh 等建立了碱性单细胞凝胶电泳技术, 该技术不仅可以检测 DNA 单、双链断裂, 还可用来检测碱性不稳定位点、DNA 交联和不完全切除修复位点等<sup>[2]</sup>。Santos 等首次将 SCGE

技术与 DNA 荧光原位杂交技术 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 结合起来, 为 SCGE 技术的应用开辟了新的途径<sup>[3]</sup>。中国朱志良博士率先在国内建立了彗星-荧光原位杂交技术体系, 并利用该技术体系发现人 9 号染色体是苯代谢产物的靶染色体<sup>[4]</sup>。Nadin 等建立了 SCGE 银染法, 进一步提高了损伤 DNA 分析的灵敏度<sup>[5]</sup>。与传统 DNA 损伤检测方法相比, SCGE 具

**基金项目:** 山西省青年基金“山西蜘蛛资源区系及保护利用研究”(2008021041); 山西省科技攻关项目“农作物重大病虫害动态监测及综合治理新技术开发应用研究”(20080311023)、“农作物重大病虫害监测预警技术研究”(2006031048)。

**第一作者简介:** 李锐, 女, 1974 年出生, 博士, 主要从事农业生态和环境毒理学研究, 通信地址: 030801 山西太谷 山西农业大学农学院。Tel: 0354-6288324, E-mail: sxaulr@126.com。通讯作者: 李生才, E-mail: sxaulisc@126.com。

**收稿日期:** 2008-12-03, 修回日期: 2009-01-14。

有简便、快速、经济、灵敏,并无需放射性标记、所需细胞少等优点,适合于体内、外不同类型实验和各种类型细胞DNA损伤的研究。

笔者采用单细胞凝胶电泳技术,对标准DNA断裂剂——过氧化氢( $H_2O_2$ )<sup>[6]</sup>和标准DNA交联剂——甲醛(HCHO)<sup>[7-8]</sup>作用于星豹蛛(*Pardosa astrigera*)的血细胞的遗传毒性进行了研究,以期为蜘蛛的保护利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

试验于2008年5月在山西农业大学农学院昆虫重点实验室进行。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂及仪器 正常熔点琼脂糖(NMA),低熔点琼脂糖(LMA),N-十二烷基肌氨酸钠, Triton-X-100,溴化乙锭(EB)。其它化学试剂均为国产分析纯。数显电热恒温水浴箱(北京市长风仪器仪表公司),DYY-III7B型电泳仪(北京市六一仪器厂),低温冷冻离心机(SIGMA),BX51型成像显微镜(OLYMPUS公司)。

1.2.2 单细胞悬液的制备 将雌雄各10头活体蜘蛛用75%的酒精冲洗3次进行消毒处理,然后将蜘蛛的步足从基部切断,用已灭菌的注射器取其血液,将血淋巴滴入预冷的离心管中,4000 r/min离心10 min。取沉淀的血细胞用PBS缓冲液离心(4000 r/min,10 min)洗涤3次,并悬浮于1 ml PBS溶液中,调细胞终浓度为 $4 \times 10^6$ 个/ml,吸取少量细胞悬液,用苔盼蓝排斥法镜检细胞存活率达95%以上<sup>[9-10]</sup>。

### 1.3 染毒处理

1.3.1 过氧化氢致DNA断裂作用 将制成的细胞悬液分装于6支1.5 ml的离心管中,依次加入终浓度为50、75、100、125、150  $\mu\text{mol/L}$ 的 $H_2O_2$ 溶液,同时设阴性对照组。6支离心管置于室温下,染毒30 min。重复3次。

1.3.2 甲醛致DNA断裂作用 将制成的细胞悬液分装于6支1.5 ml的离心管中,依次加入终浓度为10、25、40、55、70  $\mu\text{mol/L}$ 的甲醛溶液,同时设阴性对照组。6支离心管置于室温下,染毒30 min。重复3次。

### 1.4 单细胞凝胶电泳实验

单细胞凝胶电泳实验方法参考文献[11-14]并有所改进。

#### 1.4.1 凝胶样品制备

(1)第一层胶的制备:将预热56  $^{\circ}\text{C}$ 的80  $\mu\text{l}$  0.5%正常熔点琼脂糖NMA(溶于无 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的磷酸缓冲液PBS)滴到同样预热的载玻片的磨砂面,迅速盖上干净

的盖玻片,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置10 min使其凝固。

(2)第二层胶的制备:取10  $\mu\text{l}$ 含1000个细胞的PBS和75  $\mu\text{l}$  0.5%低熔点琼脂糖LMA(溶于无 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的磷酸缓冲液PBS)在37  $^{\circ}\text{C}$ 混匀,然后轻轻揭去盖玻片,将含细胞的LMA滴到第一层胶板上,立即盖上干净的盖玻片,4  $^{\circ}\text{C}$ 放置10 min使其凝固。

(3)第三层胶的制备:最后在凝固的LMA层上滴加85  $\mu\text{l}$ 预热37  $^{\circ}\text{C}$ 的0.5% LMA,盖上盖玻片,使其凝固。第一层胶的主要目的是使第二层平整和附着紧密,第三层胶的目的是对第二层细胞起保护作用。

1.4.2 细胞裂解 移去胶板上的盖玻片,将胶板浸入新配制的预冷4  $^{\circ}\text{C}$ 裂解液中至少1 h。裂解液成分为:2.5 mol/L NaCl,100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,10 mmol/L Tris,0.2~0.25 mol/L NaCN,pH 10,10% DMSO和1%的TritonX-100。

1.4.3 DNA解旋和电泳 裂解后的凝胶体载玻片置于水平电泳槽内,使新配制的碱性电泳液盖过胶面约0.25 cm,室温下静置20~40 min,使DNA解螺旋。DNA解螺旋后,在25 V、300 mA、室温下电泳时间20~40 min。电泳缓冲液成分为:1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,300 mmol/L NaOH,pH>13。

1.4.4 中和与染色 电泳后取出载玻片,用缓冲液(0.4 mol/L Tris-HCl,pH 7.5)将胶板浸没15 min或滴洗3次,每次5 min。近来有报道中和后再用无水乙醇或甲醇处理,可明显增强DNA的荧光强度。每张胶板上滴加50  $\mu\text{l}$  30 mmol/L溴化乙锭,若时间容许,20 min后就可用于荧光显微镜镜检;若时间不容许,可把染过色的载玻片放置在潮湿玻片盒中,置4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,24 h内荧光显微镜观测结果。

1.4.5 图像分析 将载玻片编为盲片,在荧光显微镜下用515~560 nm的激发波观察,目镜10倍,物镜20~40倍。观察方法有:目镜测微尺直接测量、显微照相后用两脚规测量、图象分析仪进行分析。DNA损伤的测量参数有尾长(Tail length)、尾部DNA密度(Tail DNA)、TM(Tail moment)尾矩、OTM尾矩(Olive Tail Moment)表示。TM是指图像中尾部DNA密度与尾长的比值,OTM是指图像中头与尾二者密度重心之间的距离与彗星尾中DNA所占百分比率的乘积。

### 1.5 数据统计

对每一浓度300个细胞DNA的迁移率进行分析。彗星图像由CCD拍摄,在电脑上用CASP彗星图像分析软件(从www.casp.of.pl上下载)自动分析。分析指标为国际公认的Tail Moment和Tail DNA%。

## 2 结果与分析

### 2.1 过氧化氢诱导蜘蛛细胞DNA断裂的剂量-效应关系

#### 2.1.1 过氧化氢对蜘蛛细胞DNA损伤作用 每10头蜘蛛制一张片子,每张片子随机选择100个细胞,计数拖

尾细胞数并计算受损伤细胞百分率;测量彗星尾长,计算平均DNA迁移长度。过氧化氢对星豹蛛血细胞DNA损伤作用结果见表1。

表1 过氧化氢对星豹蛛雌雄成蛛血细胞DNA损伤作用

浓度/( $\mu\text{mol/L}$ )	动物数	细胞数	雌蛛		雄蛛	
			受损伤细胞百分数/%	DNA迁移长度/ $\mu\text{m}$	受损伤细胞百分数/%	DNA迁移长度/ $\mu\text{m}$
CK	30	300	14.00 $\pm$ 2.65 f	28.61 $\pm$ 1.01 f	16.67 $\pm$ 3.06 d	31.24 $\pm$ 2.30 d
50	30	300	36.67 $\pm$ 1.97 e	50.32 $\pm$ 12.63 e	32.33 $\pm$ 1.65 c	80.88 $\pm$ 9.16 c
75	30	300	60.33 $\pm$ 1.53 d	83.29 $\pm$ 3.38 d	47.67 $\pm$ 9.29 b	82.78 $\pm$ 14.92 c
100	30	300	72.33 $\pm$ 3.51 c	99.48 $\pm$ 1.91 c	64.00 $\pm$ 4.27 a	94.78 $\pm$ 2.14 b
125	30	300	84.33 $\pm$ 4.93 b	114.86 $\pm$ 9.28 b	66.14 $\pm$ 9.37 a	97.34 $\pm$ 3.34 b
150	30	300	97.33 $\pm$ 2.52 a	123.92 $\pm$ 9.73 a	68.33 $\pm$ 21.39 a	117.24 $\pm$ 7.27 a

注:表中数据为平均值 $\pm$ 标准误;字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ , 新复极差法)。下同。

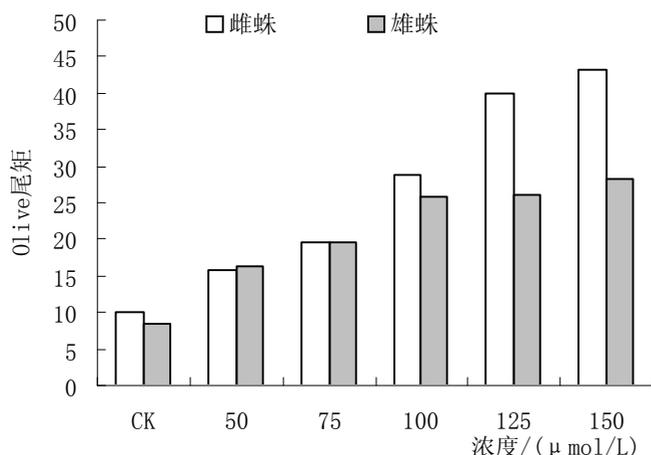


图1 过氧化氢对雌雄成蛛血细胞Olive尾矩的影响

由表1和图1可得,与阴性对照相比,过氧化氢各浓度处理的星豹蛛雌雄成蛛血细胞的受损伤细胞百分率、DNA迁移长度、Olive尾矩均有显著增加( $P < 0.05$ );血细胞DNA的损伤程度与过氧化氢浓度呈显著正相关。

2.1.2 过氧化氢对蜘蛛细胞DNA损伤程度分级 笔者将DNA链断裂分为3级: I级:彗星尾长/彗星头长 $< 1$ ; II级:  $1 < \text{彗星尾长/彗星头长} < 2$ ; III级:彗星尾长/彗星头长 $\geq 2$ 。I级、II级为一般型DNA链断裂,其中I级为轻微型DNA链断裂。III级DNA链断裂表现为很小的彗星头,大而圆的彗星尾,像一把大扫帚,又称为凋亡型DNA链断裂。根据此分级标准将过氧化氢对蜘蛛血细胞的损伤进行分级。损伤分级结果见表2。

由表2可得,过氧化氢各浓度均能致蜘蛛头胸部和腹部组织细胞DNA的损伤,随着过氧化氢浓度的增大对雌蛛血细胞造成II级及II级以上损伤率逐渐增大,分别为15.03%、29.11%、34.69%、50.96%和64.71%,对雄蛛分别为13.33%、18.67%、27.33%、35.62%和44.67%。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对雌蛛血细胞II级以上损伤程度大于雄蛛。

### 2.2 甲醛诱导DNA断裂的剂量—效应关系

#### 2.2.1 甲醛对蜘蛛血细胞DNA损伤作用 甲醛对星豹蛛血细胞DNA损伤作用结果见表3和图2。

表2 过氧化氢对蜘蛛血细胞DNA损伤分级

浓度/( $\mu\text{mol/L}$ )	雌蛛/%			雄蛛/%		
	I级	II级	III级	I级	II级	III级
CK	98.68	1.32	0	99.46	0.54	0
50	84.97	13.23	1.80	89.67	11.67	1.66
75	70.89	25.31	3.80	81.33	15.67	3.00
100	65.31	30.61	4.08	72.67	20.83	6.50
125	49.04	44.23	6.73	64.38	27.62	8.00
150	35.29	55.88	8.83	55.33	30.33	14.34

表3 甲醛对星豹蛛血细胞DNA损伤作用

浓度/( $\mu\text{mol/L}$ )	动物数/个	细胞数/个	雌蛛		雄蛛	
			受损伤细胞百分数/%	DNA 迁移长度/ $\mu\text{m}$	受损伤细胞百分数/%	DNA 迁移长度/ $\mu\text{m}$
CK	30	300	14.00 $\pm$ 2.65 f	28.61 $\pm$ 1.01 e	16.67 $\pm$ 3.06 e	31.24 $\pm$ 2.30 d
10	30	300	75.67 $\pm$ 14.57 a	125.04 $\pm$ 8.95 a	70.67 $\pm$ 9.86 a	104.98 $\pm$ 4.14 a
25	30	300	65.00 $\pm$ 8.54 b	120.26 $\pm$ 17.06 a	51.33 $\pm$ 5.13 b	78.49 $\pm$ 5.57 b
40	30	300	55.00 $\pm$ 2.00 c	98.38 $\pm$ 4.30 b	40.33 $\pm$ 9.01 c	64.54 $\pm$ 2.81 c
55	30	300	41.67 $\pm$ 0.57 d	80.91 $\pm$ 11.36 c	39.00 $\pm$ 5.85 c	63.45 $\pm$ 13.88 c
70	30	300	28.00 $\pm$ 1.00 e	56.71 $\pm$ 46.15 d	25.11 $\pm$ 6.94 d	35.13 $\pm$ 18.26 d

表4 甲醛对蜘蛛头胸部、腹部细胞DNA损伤分级

浓度/( $\mu\text{mol/L}$ )	雌蛛/%			雄蛛/%		
	I级	II级	III级	I级	II级	III级
CK	98.68	1.32	0	99.46	0.54	0
10	29.07	24.42	46.51	35.78	36.50	27.72
25	52.41	31.01	16.58	48.32	39.33	12.35
40	50.70	33.81	15.49	69.45	14.44	16.11
55	80.36	11.60	8.04	84.41	10.00	5.59
70	73.33	18.67	8.00	75.09	15.59	9.32

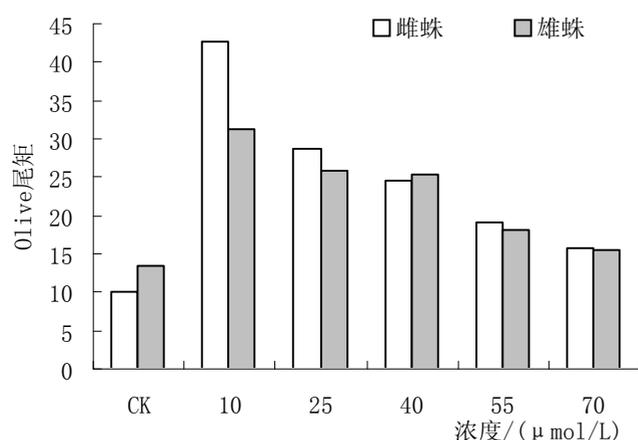


图2 甲醛对蜘蛛雌雄成蛛血细胞Olive尾矩的影响

由表3和图2可得,与阴性对照相比,各浓度甲醛处理组的星豹蛛雌雄成蛛血细胞的受损伤细胞百分率、DNA迁移长度、Olive尾矩均有显著增加( $P < 0.05$ );血细胞DNA的损伤程度与甲醛浓度呈显著负相关。

2.2.2 甲醛对蜘蛛细胞DNA损伤程度分级 根据分级标准将甲醛对星豹蛛雌雄成蛛血细胞的损伤程度进行分级。分级结果见表4。

由表4可得,甲醛各浓度均能致蜘蛛血细胞DNA的损伤,随着甲醛浓度的增大对雌蛛血细胞造成II级及II级以上损伤率逐渐增大,分别达到70.93%、47.59%、49.30%、19.64%和26.67%,对雄蛛血细胞造成II级及II级以上损伤率分别为64.22%、51.68%、

30.55%、15.59%和24.91%。

### 3 结论与讨论

DNA损伤是评价环境毒物遗传毒性的一个重要参数。笔者采用体外染毒法对星豹蛛染毒,以彗星试验检测过氧化氢和甲醛对蜘蛛血细胞DNA损伤效应,以评价其遗传毒性。结果表明,50~150  $\mu\text{mol/L}$ 剂量范围的过氧化氢和10~70  $\mu\text{mol/L}$ 剂量范围的甲醛对蜘蛛血细胞均有损伤作用,受损伤细胞百分率、彗星拖尾长度、Olive尾矩与阴性对照均具有显著性差异( $P < 0.05$ );过氧化氢对蜘蛛血细胞损伤程度与浓度呈正相关,而甲醛对蜘蛛血细胞损伤程度与浓度呈负相关;各浓度作用下,过氧化氢和甲醛对雌雄成蛛间的损伤程度存在显著差异,雌蛛的损伤程度大于雄蛛,说明雌蛛对两种的毒物较雄蛛敏感。

采用单细胞凝胶电泳实验检测蜘蛛血细胞DNA损伤,发现有细胞凋亡现象。Coreoran研究提出,DNA损伤是引发细胞凋亡的开始。在过氧化氢各浓度作用下,蜘蛛血细胞II级及II级以上断裂损伤率随着浓度的增大而增加;而在甲醛作用下血细胞II级及II级以上操作率,在低浓度下DNA断裂损伤严重,在较高浓度下DNA断裂损伤较轻,而在高浓度下DNA断裂有所加强,是由于低浓度造成细胞DNA断裂,较高浓度下细胞DNA发生交联,部分受损细胞得到修复,而在高浓度下在损伤DNA的同时,又操作了DNA的修复系统,从而造成细胞永久性凋亡。甲醛诱导蜘蛛血细胞的DNA损伤、修复以及细胞的凋亡的机理有

待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*[J].1984,123(1):291-298.
- [2] Singh NP, McCoy MT, Tice PR, et al. A simple cell research for quantitation of low levels of DNA damage in individual[J].*Exp Cell Res*,1988;175:184-190.
- [3] Santos S J,Singh N P,Natarajan A T.Fluorescence in situ hybridization with comets[J].*Exp Cell Res*,1997,232(2):407-411.
- [4] 朱志良,庄志雄,黄钰,等.单细胞凝胶电泳图象分析系统的研制与应用[J].*中华劳动卫生职业病杂志*,2001,19(4):298-300.
- [5] Nadin S. B., M. L. Vargas-Roig, D. R. Ciocca: A silver staining for single- cell gel assay[J]. *J. Histochem. Cytochem*, 2001, 49(9): 1183-1186.
- [6] 安文林,李林,朴景华,等.单细胞凝胶电泳技术分析过氧化氢对大鼠外周血淋巴细胞DNA损伤作用[J].*中国老年学杂志*,2000,5: 296-299.
- [7] 张遵真,衡正昌.甲醛和丝裂霉素C的DNA交联作用研究[J].*癌变.畸变.突变*,2001,2:74-77.
- [8] 裘箬革,戴树桂.DNA断裂作为醛类污染物接触标志物的研究[J].*中国环境科学*,2000,20(5):441-444.
- [9] 王智,颜亨梅,王洪全,等.蜘蛛血细胞染色体制片技术探讨[J].*常德高等专科学校学报*,1999,11(2):67-69.
- [10] Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing [J]. *Environ Mol Mutagen* 2000, 35:206-21.
- [11] 尹晓辉,朱国念,庄惠生,等.除草剂炔草酯对家蚕血细胞DNA损伤的研究[J].*浙江大学学报:农业与生命科学版*,2008,34(4):361-366.
- [12] 宋文华,裴亚托,胡卫萱,等.单细胞凝胶电泳检测除虫脲对小鼠肝脏细胞DNA损伤的研究[J].*农业环境科学学报*,2007,26(3): 1059-1062.
- [13] 赵忠桂,唐明德,王自媛.应用改良彗星试验检测杀虫剂对小鼠细胞DNA的损伤[J].*激光生物学报*,2003,12(1):30-32.
- [14] Ge YM, Ning HM, Wang SL, et al. Comet assay of DNA damage in brain cells of adult rats exposed to high fluoride and low iodine[J]. *Fluoride*, 2005;38:209-14.