

重金属 Cd²⁺ 对四膜虫核 DNA 的损伤作用

徐忠东, 陶瑞松, 耿明, 鲁红侠, 王光跃, 朱小茜 (合肥师范学院生物系, 安徽合肥 230061)

摘要 采用单细胞凝胶电泳技术(SCGE), 研究不同浓度重金属 Cd²⁺ 对四膜虫核 DNA 的损伤作用。以拖尾率、细胞损伤率和专用单位为指标, 探讨 DNA 损伤级别与 Cd²⁺ 处理浓度间的相关性。结果表明, 随着 Cd²⁺ 浓度的升高, 拖尾率、细胞损伤率和专用单位均呈上升趋势, 说明重金属 Cd²⁺ 对四膜虫核 DNA 损伤具有明显的浓度效应。

关键词 单细胞凝胶电泳; Cd²⁺; 四膜虫; DNA 损伤

中图分类号 Q95 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)34-10943-01

Damage Effects of Heavy Metal Cd²⁺ on Nuclear DNA in Tetrahymena thermophila

XU Zhongdong et al (Department of Biology, Hefei Normal College, Hefei, Anhui 230061)

Abstract The damage effects of heavy metal Cd²⁺ with different concentrations on nuclear DNA in Tetrahymena thermophila were studied by single cell gel electrophoresis (SCGE). With the tailing rate, the rate of damaged cells and arbitrary units as indexes, the relativity between the DNA damage levels and Cd²⁺ treatment concentration was discussed. The results showed that the tailing rate, the rate of damaged cells and arbitrary units all showed increasing trends with the increasing of Cd²⁺ concentration, which indicated that heavy metal Cd²⁺ had an obvious concentration effect on the damage of nuclear DNA in T. thermophila.

Key words Single cell gel electrophoresis; Cd²⁺; Tetrahymena thermophila; DNA damage

单细胞凝胶电泳(Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)又称彗星试验(Comet Assay), 是由 Ostling 等在1984年提出, 后经 Singh 等完善的一种快速、敏感、经济的检测单个细胞DNA损伤的技术, 现已被广泛应用于遗传毒理学、DNA损伤与修复的检测、环境污染检测、细胞凋亡机制的研究等领域^[1]。

四膜虫是一种真核单细胞原生动物, 生长迅速, 生活周期短, 取材容易, 培养方法简单, 具有个体行为与所处生境中的污染物质紧密联系的特点。作为毒理学研究的重要试验生物, 它对环境中有毒物质的毒性反应敏感, 是环境污染早期预报的理想指示生物, 已作为标准检测生物被广泛应用于毒性检测、细胞凋亡和水质检测中^[2]。为此, 以四膜虫为材料, 应用改进单细胞凝胶电泳技术^[3], 笔者探讨了重金属 Cd²⁺ 对四膜虫核 DNA 的损伤作用。

1 材料与方 法

1.1 仪器与主要试剂 Hema16型离心沉淀机(珠海黑马医学仪器有限公司); DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂); DYCP-31D型电泳槽(北京六一仪器厂); BX-41型荧光显微镜(OLYMPUS)。低熔点琼脂糖(LMA, Promega公司产品), 十二烷基肌氨酸钠(Amresco公司产品), Triton X-100(Amresco公司产品), 其他试剂均为分析纯。

1.2 试验材料 嗜热四膜虫(Tetrahymena thermophila), 由中国科学院水生生物研究所赠送。

1.3 四膜虫的培养方法 将四膜虫接种于培养液(蛋白胨15g, 酵母粉5g, 葡萄糖1g, 双蒸水1000ml, pH值7)中, 30℃条件下培养72h。

1.4 试验方法 取四膜虫培养液1ml分装于5支1.5ml的离心管中, 3200r/min离心20min, 弃去上清液, 将沉淀重悬浮为原培养液体积的1/10。其中4支依次加入终浓度为5、10、20、30μmol/L的Cd²⁺溶液, 在常温下染毒30min, 同时设一阴性对照组。染毒结束后进行彗星试验。在完全磨砂的载玻片上铺第1层150μl 1%正常熔点的琼脂糖(NMA),

4℃, 10min; 铺第2层80μl 0.8%低熔点琼脂糖(LMA)和细胞悬液的混合液, 4℃, 10min; 铺第3层70μl 0.5%低熔点琼脂糖, 4℃, 10min。将制备的凝胶放入冷的裂解液(2.5mol/L NaCl, 100mmol/L Na₂EDTA, 10mmol/L Tris, 1%十二烷基肌氨酸钠, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH值10)中, 4℃下裂解2h。然后, 放入蒸馏水中漂洗10min, 以洗去凝胶表面的盐分, 再放入电泳槽中。将新鲜配置的电泳缓冲液(1mmol/L Na₂EDTA, 300mmol/L NaOH, pH值13)倒入电泳槽, 约盖过载玻片0.25cm, 盖上盖子, 4℃, 静置20min, 使双链DNA解螺旋。调节电泳液液面高度, 于15V、180mA下电泳20min。电泳完毕, 取出载玻片浸入0.4mol/L Tris缓冲液(pH值7.5), 中和30min。用EB(20ng/L)染色15min, 双蒸水洗掉表面的染料, 24h内在荧光显微镜下观察。每片计数50个细胞, 记录彗星全长、尾长等参数。

1.5 结果评定和试验数据的统计分析 根据细胞彗星荧光尾部与其可见头部的比例, 将损伤程度分为0级(无损伤, <5%), 1级(轻度损伤, 5%~20%), 2级(中度损伤, 20%~40%), 3级(重度损伤, 40%~95%), 4级(极其严重损伤, >95%)^[4]。每张玻片观察50个细胞, 统计每组细胞的拖尾率, 并计算细胞损伤率以及专用单位(Arbitrary Units)^[5]。专用单位是一种衡量DNA链断裂损伤程度的特有单位, 是把不同的分级加以换算统计得到的DNA损伤总体水平。

$$\text{专用单位} = 0 \times 0 \text{级细胞数} + 1 \times 1 \text{级细胞数} + 2 \times 2 \text{级细胞数} + 3 \times 3 \text{级细胞数} + 4 \times 4 \text{级细胞数} \quad (1)$$

试验数据通过SPSS13.0软件进行 χ^2 检验和相关性分析。

2 结果与分析

应用SCGE可获得各试验组四膜虫细胞清晰的彗星图像, 说明Cd²⁺能够造成四膜虫核DNA损伤。由表1可知, 对照组中细胞损伤达到3、4级的比率为0; 损伤为0级的比率达到84.6%; 而加Cd²⁺组中细胞损伤情况随着镉浓度的升高, 损伤程度逐渐加重, 损伤严重的细胞比率也随之增加, DNA损伤专用单位逐渐增加, 即DNA损伤的总体水平逐渐加重, 表现出明显的浓度效应。

作者简介 徐忠东(1965-), 男, 安徽桐城人, 硕士, 副教授, 从事动物学方面的研究。

收稿日期 2007-11-01

(下转第10968页)

业出版社,1999.

- [6] CASTIGLIONE S, WANG G, DAMIAN G, et al. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 87(1/2): 54-59.
- [7] ZSUFAL. Characterisation of Poplar and willow clones and cultivars[J]. *Bonass and Bioenergy*, 1995, 9: 53-68.
- [8] 向碧霞, 黄敏仁, 王明麻. 分子标记在杨树遗传改良中的应用[J]. *南京林业大学学报*, 1998(22): 83-89.
- [9] 张新叶, 尹佟明, 朱葛强, 等. 利用 RAPD 标记构建美洲黑杨 (*Populus deltoides*) & 欧美杨 (*P. euramericana*) 分子标记连锁图谱[J]. *遗传*, 2000, 22(4): 209-213.
- [10] STEVENS MT. Genetic variation in postfire aspen seedlings in Yellowstone National Park[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1769-1780.
- [11] YE H F C, CHONG D K X, YANG R C. RAPD variation within and among natural population of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta [J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86: 454-460.
- [12] SANCHEZ N, GRAU J M, MANZANERA J A, et al. RAPD markers for the identification of populus[J]. *Silvae Genetica*, 1998, 47(2/3): 67-70.
- [13] BENETKA V. Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers[J]. *Silvae Genetica*, 1999, 48(5): 218-224.
- [14] ARENS P, COOPS H. Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 11-18.
- [15] WNIHLD MO. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the upper severn area of the UK using AFLP markers[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 3-10.
- [16] 尹佟明, 孙晔, 易能君, 等. 美洲黑杨无性系 AFLP 指纹分析[J]. *植物学报*, 1998(40): 778-780.
- [17] FOSSATI T. Development of molecular markers to assess the level of introgression of *Populus tremula* into *P. alba* natural populations[J]. *Hort Breeding*, 2004, 123: 382-385.
- [18] 李云海, 肖含, 张春庆, 等. 用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传变异[J]. *植物学报*, 1999, 41(10): 1061-1066.
- [19] DAYANANDAN S, RAJORA O P, BAWA K S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 950-956.
- [20] LUKART G, SHERWIN WB, STEELE B M, et al. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 963-974.
- [21] RAHMAN MH, DAYANANDAN S, RAJORA O P. Microsatellite DNA markers

- in *Populus tremuloides* [J]. *Genome*, 2000, 43: 293-297.
- [22] SMLDERS MJ M, SCHOOT J V. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2001, 1: 188-190.
- [23] RAJORA O P, MHAMMAD H R. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus × canadensis*) cultivars[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 470-477.
- [24] SQUIRELL J, HOLLINGSWORTH P M, WOODHEAD M, et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 1339-1348.
- [25] BEAUMONT M A. Detecting population expansion and decline using microsatellites[J]. *Genetics*, 1999, 153: 2013-2029.
- [26] GARZA J C, WILLIAMSON E G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 305-318.
- [27] LEBERG P L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 2445-2449.
- [28] DICKMANN DI. An overview of the genus *Populus* [M] // DICKMANN DI, ISEBRANDS J G, ECKENWALDER J E, et al. *Poplar culture in north america*. Ottawa: NRC Research Press, 2001: 1-42.
- [29] RAHMAN MH, RAJORA O P. Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *populus* [J]. *Genome*, 2002, 45: 1083-1094.
- [30] FOSSATI T, GRASSI F. Molecular analysis of natural populations of *Populus nigra* L. intermingled with cultivated hybrids [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 2033-2043.
- [31] COLE C T. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *New Phytologist*, 2005, 167: 155-164.
- [32] LEXER C. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen) the role of ecology and life history in gene introgression [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 1045-1057.
- [33] SUVANTO LI. Clone identification and clonal structure of the European aspen (*Populus tremula*) [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 2851-2860.
- [34] 黄烈健, 苏晓华, 张香华, 等. 与杨树木材密度、纤维性状相关的 SSR 分子标记[J]. *遗传学报*, 2004, 31(3): 299-304.
- [35] 梁海永, 刘彩霞, 刘兴菊, 等. 杨树品种的 SSR 分析及鉴定[J]. *河北农业大学学报*, 2005, 28(4): 27-31.

(上接第10943页)

表1 Cd^{2+} 对四膜虫核 DNA 的损伤情况

Cd^{2+} 浓度 $\mu\text{mol/L}$	细胞损伤分级比率 %					拖尾率 %	DNA 损伤 专用单位
	0	1	2	3	4		
0	84.6	9.2	6.2	0	0	15.4	21.6
5	62.3	22.6	8.6	5.4	1.1	37.7**	60.4
10	44.5	30.6	14.4	7.8	3.7	56.5**	97.6
20	23.3	27.3	20.7	14.5	14.2	76.7**	169.0
30	7.7	30.7	23.2	20.6	17.8	92.3**	210.1

注: ** 表示与对照组相比, 差异在 0.01 水平显著。

3 讨论

Cd^{2+} 能够通过降低机体的抗氧化能力使细胞对 8-OHdG 的修复能力下降, 从而影响 DNA 的碱基修饰; 同时, Cd^{2+} 能够抑制 DNA 聚合酶活性, 减少 DNA 合成。DNA 聚合酶在碱基配对中的高保真性也因 Cd^{2+} 的存在而下降^[4]。大量的试验表明, Cd^{2+} 能够造成多种细胞的 DNA 损伤, 进而发挥毒性作用。Devi 等应用碱性 SCGE 检测结果表明, Cd^{2+} 能够损伤鼠淋巴细胞 DNA^[6]。张迎梅等研究指出, 低浓度 Cd^{2+} 短期染毒能引起泥鳅肝胰脏细胞 DNA 损伤^[7]。林爱军等研究表明, Cd^{2+} 造成小麦叶片 DNA 损伤。该试验结果表明, 5~30 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 能够引起四膜虫核 DNA 的损伤, 并且表现出明

显的浓度效应。这与陈小娟等利用微量热法的研究结果^[9]基本一致, 说明四膜虫对 Cd^{2+} 毒性敏感。彗星试验可用于 DNA 损伤与修复检测。

参考文献

- [1] 何惧, 刘玉清. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展与应用[J]. *国外医学卫生学册*, 1997, 24(2): 85-89.
- [2] 傅诚杰, 俞婷, 缪炜, 等. 四膜虫: 毒理学与生态毒理学研究中的优良模式生物[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(1): 108-113.
- [3] 王丽, 鲁志松, 丁书茂, 等. 四膜虫彗星实验在环境水质检测中的应用[J]. *环境科学与技术*, 2006, 29(5): 31-33.
- [4] 李金龙, 熊永忠, 徐世文, 等. 应用碱性单细胞凝胶电泳技术(SCGE) 检测镉致鸡脾淋巴细胞 DNA 的损伤效应[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(3): 307-309.
- [5] MOURONS A, GILLJOWC D, DULOUT F N. DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay[J]. *Mutat Res*, 2001, 498(1/2): 47-55.
- [6] DEM K D, BANUB S, MAHBOOB M, et al. In vivo genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay[J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2001, 21(5): 325-333.
- [7] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对泥鳅 DNA 损伤的研究[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(4): 399-402.
- [8] 林爱军, 张旭红, 朱永官. Cd^{2+} 对小麦叶片 DNA 伤害的彗星研究[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(5): 330-333.
- [9] 陈小娟, 沈温芬, 刘义, 等. 利用微量热法研究 Cd^{2+} 和 Cr^{2+} 对嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 的毒性效应[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(6): 745-749.