

技术与方法 Techniques and Methods

紫外辐射诱导烟草原生质体中DNA损伤的彗星电泳检测

张来军^{1,2}, 郝建国¹, 贾敬芬^{1,*}¹西北大学西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安710069; ²甘肃省陇东学院生命科学系, 甘肃庆阳745000

摘要:以烟草原生质体为材料, 采用彗星电泳检测用0.5 W·m⁻²紫外线以不同时间(0、5、10、30、60和120 s)诱导的烟草原生质体中DNA的损伤。结果表明, 在0~10 s的时间内代表DNA损伤程度的尾矩、Olive尾矩等参数与紫外线照射时间具有良好的时间依赖关系。本文建立的烟草原生质体体系采用彗星电泳技术, 可以快速而灵敏地检测紫外线对植物细胞的损伤程度。

关键词:彗星电泳; DNA损伤; UV-B辐射; 烟草原生质体

Comet Assay on DNA Damage Induced by UV-B Radiation in Tobacco Protoplasts

ZHANG Lai-Jun^{1,2}, HAO Jian-Guo¹, JIA Jing-Fen^{1,*}¹Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Northwest University, Xi'an 710069, China; ²Department of Life Science, Longdong College, Qingyang, Gansu 745000, China

Abstract: Protoplasts of *Nicotiana glauca* was used for experimental material to investigate DNA damage in protoplast which was induced by 0.5 W·cm⁻² UV-B for different time (0, 5, 10, 30, 60, and 120 s) by using comet assay. The results showed that the indexes of tail moment and olive tail moment etc which detected the DNA damage had statistically dose effect relationships with the time of UV-B radiation from 0 to 10 s. Comet assay detected the degree of DNA damage of tobacco protoplast induced by UV-B radiation rapidly and sensitively.

Key words: comet assay; DNA damage; UV-B radiation; tobacco protoplast

大气平流层臭氧层减薄, 并导致到达地表紫外线B (UV-B, 280~320 nm)辐射增强, 对生态系统和动植物生长造成了深远的影响。报道表明增强UV-B辐射会引起细胞DNA的损伤, 形成环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimer, CPD), 影响细胞正常代谢和分裂, 细胞分裂速度减慢, 影响基因的表达, 改变细胞蛋白质组成和含量(Hollósy 2002), 这与DNA受到损伤、DNA复制受到抑制有关。

彗星电泳(comet assay)又名单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE), 各种理化因子作用细胞后引起的DNA链断裂可用这一方法检测, 并在统计学基础上评估损伤程度(Fairbairn等1995)。此法由Ostling和Johanson于1984年发明, 后来Singh等在此基础上引入碱性环境, 得到进一步发展。其基本原理是DNA超螺旋与其赖以附着

的核骨架或核基质经高盐及去污剂裂解后, 再在碱性(pH>12.3)环境中进行解旋和电泳, 断裂的DNA碎片就会释放并向阳极泳动, 荧光染色后在显微镜下观察呈“彗星”状(Fairbairn等1995; McKelvey-Martin等1993)。过去20年的研究表明, 彗星电泳是一种可靠的定量DNA损伤和修复的方法, 因其简单、快速、灵敏的特点, 被广泛应用于毒理学、生物学、医学和环境生物监测等领域。

应用彗星电泳技术检测动物细胞中DNA损伤已经非常广泛, 技术也极为成熟, 但应用于植物细胞中DNA损伤研究尚不广泛。Gichner等(2001, 2007, 2008)用机械游离植物细胞核的方法, 结合碱

收稿 2009-12-10 修定 2010-03-22

资助 国家自然科学基金(30671082)。

* 通讯作者(E-mail: jiajf38@nwu.edu.cn; Tel: 029-88303484)。

性彗星电泳检测重金属、辐射及一些毒性化合物对植物细胞 DNA 的损伤, 但国内类似报道并不多见。近年来林爱军等(2005, 2006)以多种植物材料为对象, 采用细胞核分离方法, 运用彗星电泳检测植物的 DNA 损伤。蒋磊等(2006)和王静等(2007)对植物材料进行整体紫外辐射, 再借助彗星电泳对植物细胞中 DNA 损伤进行了检测。聂志刚等(2009)曾用彗星电泳检测重金属诱导的拟南芥原生质体中 DNA 的损伤。而用彗星电泳检测 UV-B 辐射对烟草原生质体中 DNA 损伤至今还未见报道。

本文以酶解法获得烟草原生质体, 对其以一定辐射剂量的 UV-B 进行不同时间处理后, 采用碱性彗星电泳检测 DNA 的损伤, 为推广其在植物科学中的应用范围和增强植物对 UV-B 辐射抗性的研究提供参考。

材料与amp;方法

1 试剂和仪器

试剂有低熔点琼脂糖(Amresco 分装)、常熔点琼脂糖(Spanish 原装)、Triton X-100 (Roth 产品)、二甲基亚砷(DMSO, Amresco 原装)、肌苷酸钠(Sigma 分装); 其余生化试剂均为分析纯。仪器有 Tanon HE120 (Amersham Biosciences)电泳槽; Leica DMLB 2 (Leica 公司)荧光显微镜; 佳能 A650 数码相机。彗星图像分析软件为 CASP 软件(casp-1.2.2, <http://casp.sourceforge.net/index.php>)。

2 实验方法

2.1 烟草原生质体的游离 材料为林烟草(*Nicotiana sylvestris* Speg. et Comes)的无菌苗。取充分展开的叶子, 剪去叶片, 留叶脉, 撕去叶脉表皮, 再斜切成段, 加入酶液(2% 纤维素酶 Onozuka R-10、0.5% 半纤维素酶、0.5% 果胶酶 Y-23、0.5% 离析酶 R-10、 $0.16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、0.1% MES 和 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, pH 5.8~6.2)于 28°C 黑暗中酶解 6~12 h。将酶解后的原生质体悬浮液用 200 目不锈钢筛过滤, $80\times g$ 离心 5 min。沉淀的原生质体悬浮在 2 mL $0.16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.8~6.2)中, 用注射器(装上长针头)向离心管底部缓缓注入 6 mL 20% 蔗糖溶液, $60\times g$ 离心 5 min。在两相溶液的界面之间分出一层纯净的原生质体带, 以吸管收集后再用 8 mL $0.16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.8~6.2)悬浮备

用。

2.2 原生质体活性检测 原生质体用 0.5% 台盼蓝染液染色 1 min, 然后在光学显微镜下观察。死的原生质体被染成蓝色, 活的原生质体不被染色。随机选取若干个视野, 统计总原生质体数和死原生质体数, 计算细胞活力。

2.3 实验分组及 UV 处理 收集到的原生质体用 $0.16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.8~6.2)调整细胞密度至 $1\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 接种于细胞培养板中($\phi=20 \text{ mm}$, $500 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$), 然后进行紫外线照射。紫外光源经过 cellulose diacetate 滤膜(截止型长通滤光片, 292 nm 以下被滤除)获得 UV-B 光源, UV-B 辐射处理的辐照度为 $0.5 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ (秦牌紫外灯管, 30 W, 波长峰值 305 nm, 宝鸡光源研究所生产)。实验以不经紫外线照射为对照, 设定 5 个照射时间, 分别为 5、10、30、60 和 120 s。之后同时上样进行电泳。

2.4 彗星电泳 (1)镀膜法制备底胶, 将洁净的载玻片在 0.6% 常熔点琼脂糖中浸没 1 min 后, 置 37°C 保温箱中烘烤过夜。实验时将细胞悬液与低熔点琼脂糖(37°C)以 1:1 的比例在离心管中混匀, 用剪去尖部的枪头将混合液滴在镀膜后的载玻片上, 盖上盖玻片, 4°C 下静置 3 min 后取下盖玻片, 制得含细胞胶层。(2)载玻片置于溶液($2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠、 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA 、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 和 1% 肌苷酸钠, pH 10, 用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO)中 4°C 下裂解 1 h。(3)用三蒸水于 4°C 下水洗 3 次, 每次 5 min。(4)载玻片置于电泳缓冲液($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA 和 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH, pH 13)中于 4°C 下解旋 15 min。(5) 4°C 电泳 15 min, $0.74 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ (26 V, 300 mA)。(6) $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液(pH 7.5)中和 3 次, 每次 5 min。(7)以冰冷的无水乙醇脱水 10 min, 室温晾干。(8) EB ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 20 mL)染色, 镜检, 照相, 每个处理随机取 50 个细胞, 用 CASP 分析软件进行分析。试验重复 2 次。

2.5 彗星电泳数据的统计分析 选取彗星头部 DNA 百分比(HDNA)、尾部 DNA 百分比(TDNA)、彗星全长(comet length, CL)、尾长(tail length, TL)、尾矩(tail moment, TM)和 Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)作为分析指标。

用 SPSS 13.0 统计软件对上述指标进行单因素方差分析和组间两两对比。

结果与讨论

1 原生质体活性

酶解法获得的林烟草叶脉原生质体经20%蔗糖漂浮后,大小均匀,纯度高,用台盼蓝染色法测定细胞死亡率,细胞活力大于(95±5.6)% (图1),可继续下一步试验。

2 彗星电泳检测

UV-B照射林烟草叶脉原生质体的DNA损伤程度由表1可知,照射5和10s的尾部DNA百分比、尾长、彗星长、尾矩、Olive尾矩均大于不做处理的,头部DNA百分比则相反。UV-B照射时间延长到30s时,除头部DNA百分比之外,各参数不再增加。从照射0到10s的检测参数均表现出时间依赖效应(图2)。

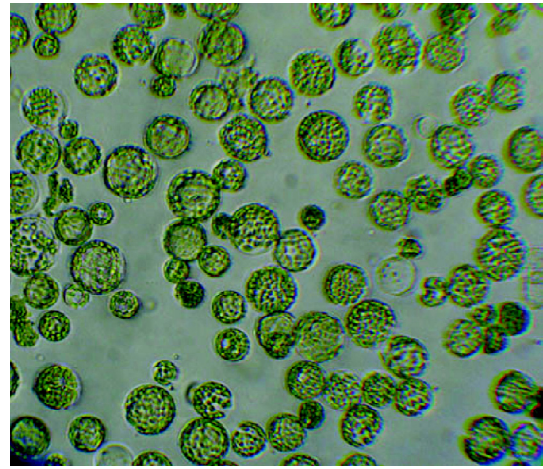


图1 林烟草叶脉细胞原生质体(200×)

Fig.1 Protoplasts of vein cell of *N. sylvestris*

表1 UV-B 诱导的林烟草原生质体中DNA损伤

Table 1 DNA damage of *N. sylvestris* protoplasts induced by UV-B radiation

照射时间/s	头部DNA/%	尾部DNA/%	尾长/μm	彗星全长/μm	尾矩/μm	Olive尾矩/μm
0 (对照)	86.4±9.62	13.6±9.62	19.2±7.74	56.9±9.89	3.21±3.27	3.11±2.31
5	83.6±11.10	16.4±11.10	19.8±7.20	57.6±9.35	3.92±3.81	3.61±2.72
10	79.7±9.82*	20.3±9.80*	22.2±6.03*	61.6±6.44*	4.98±3.64*	4.37±2.21*
30	82.9±11.70*	17.1±11.70*	20.1±6.90	56.4±7.54	4.06±3.89	3.60±2.75
60	87.3±8.45	12.7±8.45	18.0±6.02	54.4±8.74	2.68±2.39	2.62±1.81
120	85.2±9.34	14.8±9.34	20.0±7.81	64.1±9.73*	3.56±3.53	3.51±2.33

* 表示同列数据中与对照相比差异显著($P < 0.05$)。

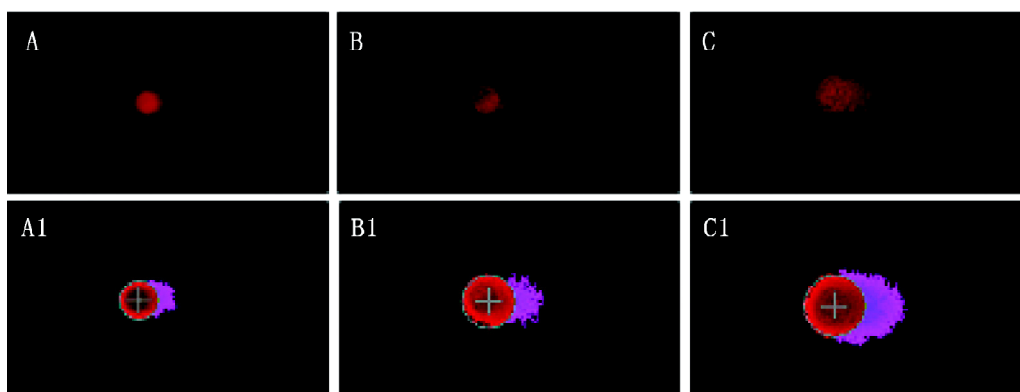


图2 UV-B 诱导的林烟草原生质体DNA损伤的彗星电泳(400×)

Fig.2 Comet assay of DNA damage in *N. sylvestris* protoplasts induced by UV-B radiation (400×)

A: 对照(不做UV-B处理); B: UV-B照射5s; C: UV-B照射10s; A1: A经CASP软件分析的图像; B1: B经CASP软件分析的图像; C1: C经CASP软件分析的图像。

当照射时间增加到30s,除头部DNA百分比之外各分析指标有下降的趋势,揭示处理时间过长

时形成的DNA-DNA、DNA-蛋白质交联在电泳时抑制了DNA的迁移(Woźniak和Błasiak 2003),这种

现象在其它类似试验中也出现过(Gichner 等 2008; Rucińska 等 2004; Woźniak 和 Blasiak 2003; 罗明志 等 2006)。而蒋磊等(2006)和王静等(2007)为了确定嘧啶二聚体形成的量,提高彗星电泳检测的阈值,用核酸内切酶 T4 Endonuclease V 特异性识别并酶切 DNA 链上的嘧啶二聚体。在研究中还发现这一阈值受植物的种类、以及取材的部位等多方面的影响,会发生相应的变化。

参考文献

- 蒋磊, 王静, 王艳, 李韶山, 江月玲(2006). 紫外辐射诱导植物细胞 DNA 损伤的彗星检测. 华南师范大学学报(自然科学版), 4: 100~105
- 林爱军, 张旭红, 张增利, 曹青, 朱永官(2006). 利用不同植物进行 DNA 损伤彗星实验的方法比较. 生态毒理学报, 2 (1): 165~171
- 林爱军, 张旭红, 朱永官(2005). 镉对小麦叶片 DNA 伤害的彗星实验研究. 环境科学学报, 2 (25): 329~333
- 罗明志, 齐浩, 陈文芳, 刘淼, 郭伟(2006). 彗星实验检测紫外线诱导的 K562 细胞 DNA 损伤. 癌变·畸变·突变, 18 (5): 400~403
- 聂志刚, 王艳, 李韶山(2009). 重金属诱导拟南芥原生质体 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳检测. 植物学报, 44 (1): 117~123
- 王静, 蒋磊, 王艳, 李韶山(2007). 紫外辐射诱导植物叶片损伤敏感性差异. 植物学通报, 24 (2): 189~193
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339 (1): 37~59
- Gichner T, Stavreva DA, Van Breusegem F (2001). *o*-Phenylenediamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mutat Res*, 495: 117~125
- Gichner T, Lovecká P, Kochanková L, Macková M, Demnerová K (2007). Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutat Res*, 629: 1~6
- Gichner T, Znidar I, Száková J (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutat Res*, 652: 186~190
- Hollósy F (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33 (2): 179~197
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*, 288: 47~63
- Rucińska R, Sobkowiak R, Gwóźdz EA (2004). Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell Mol Biol Lett*, 9: 519~528
- Woźniak K, Blasiak J (2003). *In vitro* genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res*, 535: 127~139