

# 铜胁迫对蚕豆幼苗基因组 DNA 损伤效应的研究

苟本富

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 402160)

**摘要:**采用 AFLP 分子标记技术,研究了 Cu 胁迫对蚕豆幼苗根系生长的影响和基因组 DNA 的损伤效应。结果表明:不同浓度(12.5、25、50 mg/L)Cu 处理 7 d 后,蚕豆幼苗根长和根系内的可溶性蛋白含量均受到了抑制;基因组 DNA 的 AFLP 图谱发生显著变化,多态性增加,且与 Cu 浓度存在明显的剂量关系;Cu 影响蚕豆幼苗根尖细胞基因组 DNA 的稳定性,利用 AFLP 技术获得的 DNA 多态性变化可作为土壤 Cu 污染的早期诊断。

**关键词:**AFLP;蚕豆幼苗;Cu 胁迫;DNA 损伤

**中图分类号:**S 643.603.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0158-03

铜是植物生长必需的微量元素之一,是植物细胞色素氧化酶、多酚氧化酶及抗坏血酸氧化酶等多种酶类的重要组成成分,它对植物正常的生理代谢、产量的提高和品质的改善有着极其重要的影响<sup>[1]</sup>。随着工农业、交通等领域含铜物质的大量排放,如铜矿的开采、含 Cu 化学物质和有机肥的施用等等,铜已成为一种重要的环境污染物,并引起了人们的广泛关注<sup>[2-4]</sup>。过量的 Cu 有很强的植物毒性,阻碍植物的光合作用和生长发育,严重时可导致植物细胞凋亡。因此研究 Cu 对植物可能带来的负面影响及对 DNA 的损伤具有重要的现实意义。

分子生物学的发展和分子标记技术的广泛使用为环境科学工作者提供了新的技术研究思路,使得环境污染对生物体基因组 DNA 损伤的检测与研究成为可能。现以蚕豆幼苗为材料,采用 AFLP 标记技术,研究 Cu 胁迫对蚕豆幼苗根尖的生长和基因组 DNA 的损伤效应,旨在为环境金属污染对作物损伤机制的研究提供科学手段和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

蚕豆新品种启动 5 号,购于永川区种子公司。

### 1.2 试验试剂

用分析纯  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  配制  $\text{Cu}^{2+}$  浓度分别为 0、12.5、25、50 mg/L 的 4 种浓度;dNTP 为德国 BM 公司产品;10× buffer、Taq DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$  等为 Sangon 公司产品;PstI 内切酶、TaqI 内切酶、T4-DNA 连接酶、测序

胶银染试剂为 Premaga 公司产品。接头与引物均由上海基康公司合成,其中接头包括核心序列和酶特定序列两部分:

PstI 接头:核心序列 酶特定序列

5'-GACGTGACGCGCCTC ATGCA-3'

3'-GCACTGCCGCGCAG T-5'

TaqI 接头:核心序列 酶特定序列

5'-GACGATGAGTCCTGA G-3'

3'-TACTCAGGACT CGC-5'

根据接头序列设计相应的 AFLP 引物,该研究所用引物序列见表 1。

表 1 AFLP 引物序列

| 引物      | 序列                  |
|---------|---------------------|
| 预扩增引物   |                     |
| PstI0   | GACGCGCGTCATGCAGa   |
| TaqI0   | GATGAGTCCTGAGCGAa   |
| 选择性扩增引物 |                     |
| PstI1   | GACGCGCGTCATGCAGac  |
| PstI2   | GACGCGCGTCATGCAGacc |
| PstI3   | GACGCGCGTCATGCAGact |
| PstI4   | GACGCGCGTCATGCAGaca |
| PstI5   | GACGCGCGTCATGCAGatg |
| TaqI1   | GATGAGTCCTGAGCGAacg |
| TaqI2   | GATGAGTCCTGAGCGAatg |
| TaqI3   | GATGAGTCCTGAGCGAaga |
| TaqI4   | GATGAGTCCTGAGCGAagc |
| TaqI5   | GATGAGTCCTGAGCGAatc |

### 1.3 试验设计

选取大小一致的蚕豆种子,氯化汞表面消毒处理 10 min,无菌水冲洗干净后置于 23℃ 避光发芽,待初生根长至 0.5 cm 时,选择发芽一致的种子,播种于装有石英砂的培养盆内,培养盆放置于装有  $\text{Cu}^{2+}$  浓度分别为 0、12.5、25、50 mg/L 的容器内,在培养温度为  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光强为 7 000 lx 的培养箱内培养 7 d 后,取蚕豆根尖约 2 cm,在  $-80^\circ\text{C}$  冷藏备用。

**作者简介:**苟本富(1968-),男,四川巴中人,硕士,副教授,研究方向为生物化学与分子生物学。

**基金项目:**重庆市教委科研资助项目(0836185);重庆文理学院科研资助项目。

**收稿日期:**2010-12-14

## 1.4 测定指标及方法

1.4.1 幼苗根尖初生根长度测定 取 Cu 处理 7 d 的蚕豆幼苗 20 株,用直尺分别测定初生根的长度。初生根抑制率计算方法为:抑制率 =  $(1 - x/y) \times 100\%$ ,其中  $x$  为各处理组的幼苗初生根平均根长,  $y$  为对照组幼苗初生根平均根长。数据表示采用平均值 ± 标准偏差形式,用  $t$  检验法进行差异显著性分析。

1.4.2 幼苗根尖可溶性蛋白含量测定 采用考马斯蓝 R-250<sup>[5]</sup> 测定,首先制作标准曲线,然后称取叶片 2 g,用小量蒸馏水研磨成匀浆后放置 1 h 充分提取,在 4 000 r/min 离心 20 min,将上清液定容。取相应提取液加相应考马斯亮蓝充分混合,在 595 nm 下比色,测定吸光度,根据标准曲线得可溶性蛋白含量。

1.4.3 幼苗根尖基因组 DNA 的损伤效应及 DNA 的提取 采用分子生物学实验指导<sup>[6]</sup> 中关于植物基因组 DNA 提取的方法进行; AFLP 分析: AFLP 分析参照苟本富<sup>[7]</sup> 在对蔷薇遗传检测中的 AFLP 双酶切分析方法进行;蚕豆幼苗根尖基因组 DNA 损伤效应评价:利用 Cu 胁迫下蚕豆幼苗根尖基因组多态性的变化,分析 Cu 胁迫对 DNA 的损伤效益。统计各引物 AFLP 扩增的标记数,仅计算稳定和清晰的条带。同时检测多态位点的比率  $P$ ,  $P = (k/n) \times 100\%$ ,  $n$  为检测位点总数,  $k$  为多态位点数。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cu 胁迫对蚕豆幼苗根尖长度及蛋白含量的影响

不同 Cu 浓度胁迫下培养 7 d 的 20 株蚕豆幼苗的根长平均值见表 2, 12.5、25 和 50 mg/L 的 Cu 胁迫下,蚕豆幼苗根系长度明显低于对照 ( $P < 0.01$ ), 幼苗根系生长的抑制率分别为 11.93%、27.64% 和 41.80%。Cu 处理对蚕豆根系生长有不同程度的抑制作用, 初生根长度随  $Cu^{2+}$  浓度的增加而减少, 这说明 Cu 胁迫对蚕豆根尖细胞的抑制和毒害作用具有明显的积累效应。从表 2 可知, 在 12.5、25 和 50 mg/L 的 Cu 胁迫下, 蚕豆幼苗根尖内可溶性蛋白含量分别为对照的 86.78%、78.35% 和 71.34%, 随着 Cu 胁迫浓度的增加, 蚕豆根系蛋白含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。

表 2 Cu 胁迫对幼苗根长及其可溶性蛋白含量的影响

| Cu 浓度<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 根尖长度          |       | 可溶性蛋白含量                 |       |
|--------------------------------|---------------|-------|-------------------------|-------|
|                                | 根长/cm         | 抑制率/% | 含量/mg · g <sup>-1</sup> | 抑制率/% |
| 0                              | 11.65 ± 0.58a | 0     | 148.3 ± 0.74a           | 0     |
| 12.5                           | 10.26 ± 0.86b | 11.93 | 128.7 ± 0.51b           | 13.22 |
| 25.0                           | 8.43 ± 0.47c  | 27.64 | 116.2 ± 0.63c           | 21.65 |
| 50.0                           | 6.78 ± 0.75d  | 41.80 | 105.8 ± 0.91d           | 28.66 |

注: 同列不同字母差异显著。

### 2.2 Cu 胁迫对蚕豆根系 DNA 的损伤效应

2.2.1 蚕豆基因组 DNA 提取纯化分析 提取的蚕豆幼苗根尖基因组 DNA, 通过紫外分光光度计测定其含量。得到 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值为 1.75~1.95, 对照幼苗根尖中所获得的 DNA 产量为 4~5 μg/100mg, 电泳结果

(图 1) 出现单一的区带, 没有拖尾现象。这表明采用 CTAB 方法提取得到的蚕豆幼苗根尖基因组 DNA 纯度较高, 有利于后续实验。

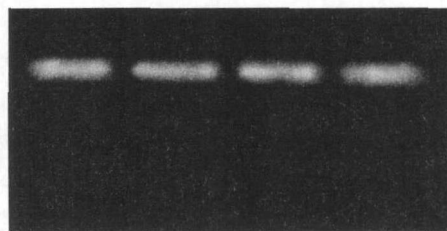


图 1 蚕豆幼苗根尖基因组 DNA 的电泳图谱

2.2.2 Cu 胁迫对蚕豆幼苗根系 DNA 损伤的影响 由图 2 和表 3 可看出, 在所用的 10 对引物组合中, 对照分别扩增出 16~24 条带, 12.5、25、50 mg/L 的 Cu 处理蚕豆幼苗 7 d 后, 其根尖基因组 DNA 的 AFLP 图谱发生明显的变化, 主要表现为 AFLP 谱带的缺失、增加或谱带荧光强度的改变。同时随着 Cu 处理浓度的增大, DNA 多态性(即 AFLP 图谱条带的消失和增加之和)也增大。由于不同 AFLP 谱带变化与基因组 DNA 变化有关, AFLP 图谱多态性越高, 说明 DNA 受损伤的程度越严重。这可能是由于环境中金属污染物诱导生物细胞 DNA 的损伤或突变, 引起引物结合位点的核苷酸缺失或增加, 从而影响 DNA 片段的 AFLP 图谱。



图 2 蚕豆幼苗基因组 DNA 的 AFLP 图谱(P<sub>1</sub>T<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>T<sub>2</sub>)

表 3 Cu 胁迫下蚕豆幼苗基因组 DNA 的 AFLP 多态性

| 序号  | 引物<br>组合                      | 对照组总<br>扩增带数 | 多态性带数 |     |     | 多态性带数比率/% |      |      |
|-----|-------------------------------|--------------|-------|-----|-----|-----------|------|------|
|     |                               |              | 12.5  | 25  | 50  | 12.5      | 25   | 50   |
| 1   | P <sub>1</sub> T <sub>1</sub> | 17           | 3     | 5   | 6   | 17.6      | 29.4 | 35.3 |
| 2   | P <sub>1</sub> T <sub>2</sub> | 21           | 5     | 6   | 8   | 23.8      | 28.6 | 38.1 |
| 3   | P <sub>2</sub> T <sub>2</sub> | 20           | 5     | 6   | 7   | 25.0      | 30.0 | 35.0 |
| 4   | P <sub>2</sub> T <sub>3</sub> | 18           | 4     | 6   | 7   | 22.2      | 30.0 | 38.9 |
| 5   | P <sub>3</sub> T <sub>3</sub> | 22           | 5     | 7   | 8   | 22.7      | 31.8 | 36.4 |
| 6   | P <sub>3</sub> T <sub>4</sub> | 24           | 6     | 8   | 9   | 25.0      | 33.3 | 37.5 |
| 7   | P <sub>4</sub> T <sub>4</sub> | 19           | 4     | 6   | 7   | 21.1      | 31.6 | 36.8 |
| 8   | P <sub>4</sub> T <sub>5</sub> | 21           | 5     | 6   | 8   | 23.8      | 28.6 | 38.1 |
| 9   | P <sub>5</sub> T <sub>5</sub> | 22           | 5     | 7   | 8   | 22.7      | 31.8 | 36.4 |
| 10  | P <sub>5</sub> T <sub>1</sub> | 16           | 3     | 5   | 6   | 18.8      | 31.3 | 37.5 |
| 平均值 |                               | 20           | 4.5   | 6.2 | 7.4 | 22.3      | 30.6 | 37.0 |

## 3 讨论

该研究用 AFLP 技术研究了 Cu 胁迫对蚕豆幼苗根尖基因组 DNA 的损伤效应以及对蚕豆幼苗生长的影响,为环境科学工作者对植物毒理学研究提供新的方法和路径。AFLP 技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一项新技术,除既具有其它 DNA 分子标记的特点,同时还具有用样量少、灵敏度高、带纹丰富、稳定性好等优点,不仅在遗传分析的各个领域有广泛的使用,而且还渗透到环境污染评价和毒理学分析等领域,如采用污染环境中生物体的 DNA 损伤作为生物标记物,研究毒性物质对生物体产生的毒性效应等等。齐雪梅等<sup>[8]</sup>研究表明,在 Cu 胁迫条件下大麦幼苗根尖细胞中 DNA 模板稳定性的变化比可溶性蛋白含量敏感,与根系生长的敏感性相似。Atienzar 等<sup>[9]</sup>用 RAPD 分析表明,环境金属污染物诱导生物细胞内的 DNA 损伤和突变,导致引物结合位点的核苷酸缺失或增加,从而影响 DNA 片段的 AFLP 图谱。

该研究结果表明,随着 Cu 浓度的增大,蚕豆幼苗根尖的生长和根系内的可溶性蛋白含量逐渐降低,基因组 DNA 损伤也越来越严重。在低浓度 12.5 mg/L Cu 污染胁迫下,根长与对照相比下降了 11.93%,根系内的可溶性蛋白含量与对照相比降低了 13.22%,而根系内基因组的 AFLP 图谱的多态性变化则达到了 22.3%。这说明对于低浓度的污染胁迫,基因组的损伤比根长和根系内的可溶性蛋白含量对胁迫更为敏感,基因组 DNA 是一种对低浓度污染胁迫反应敏感的生物标记物,利用 AFLP 分析获得的 DNA 多态性变化,并结合幼苗生长等指标,可进行环境 Cu 污染的早期诊断和生态风险评价,也可用于评价环境污染的修复效果。这与齐雪梅等研究结果一致。

随着 Cu 浓度的增大,蚕豆幼苗根长和根系内的可溶性蛋白含量抑制增加,根系基因组 DNA 损伤也更严

重,这说明蚕豆幼苗根系生长的抑制作用及其 AFLP 图谱的变化具有明显的剂量效应。这与前人<sup>[10-11]</sup>研究结果一致。AFLP 图谱多态性变化可以反映植物细胞基因组 DNA 受损伤的程度,多态性变化越大,基因组 DNA 受损伤程度越严重。蚕豆幼苗基因组 DNA 的 AFLP 谱带变化可能是 Cu 对基因组模板的稳定性造成较大的影响,使基因组重排引起寡核苷酸位点变化,或是由于 Cu 胁迫诱导了生物细胞内 DNA 链的断裂、插入或缺失部分片段、DNA-蛋白质交联甲基化等形式的 DNA 损伤,引起 DNA 构象的严重改变,从而形成新的 AFLP 图谱,但相关机理还需作进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: Protective role of free radical scavengers[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1998, 61(5): 623-628.
- [2] Alva A K, Chen E Q. Effects of external copper concentrations on uptake of trace elements by citrus seedling[J]. *Soil Sciences*, 1995(159): 59-64.
- [3] 王威, 刘东华, 蒋悟生, 等. 铬污染地区环境对植物生长的影响[J]. *农业环境保护*, 2002, 21(3): 257.
- [4] 陈怀满, 郑春荣, 王慎强, 等. 不同来源重金属污染的土壤对水稻的影响[J]. *农村生态环境*, 2001, 17(2): 35.
- [5] 林生岭, 徐绍芬, 谢春生, 等. 人工神经网络光度法同时测定 5 组分染料混合物[J]. *分析化学*, 2004, 32(11): 1421-1425.
- [6] 魏群, 崔丽华, 杨淑杰, 等. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 1999: 69-70.
- [7] 苟本富. AFLP 标记在蔷薇遗传检测中的应用[J]. *西南大学学报*, 2009, 31(6): 101-105.
- [8] 齐雪梅, 李培军, 刘宛. Cu 胁迫对大麦幼苗生长及 DNA 损伤效应的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(5): 1925-1928.
- [9] Atienzar F A, Venier P, Jha A N, et al. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations [J]. *Mutat Res*, 2002, 521: 151-163.
- [10] 张义贤. 重金属对大麦的毒性效应[J]. *环境科学学报*, 1997, 17(2): 199-205.
- [11] 解莉婧, 刘宛, 李培军, 等. 镉胁迫对蚕豆幼苗基因组 DNA 多态性的影响[J]. *生态学杂志*, 2007, 26(1): 35-39.

Study on DNA Damages in *Vicia faba* Seedlings Under Copper Stress

GOU Ben-fu

(1. College of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160 )

**Abstract:** *Vicia faba* seedlings growth and genomic DNA damage effects of copper stress were studied by amplified fragment length polymorphic (AFLP) technique. The results showed that after 7 days of 12.5, 25, 50 mg/L copper stress, the root elongation growth was inhibited, and the total soluble protein content in root tip was decreased, compared to that of the normal seedlings ( $P < 0.05$ ). The AFLP profiles showed obvious differences between normal and exposed plantlets, included loss of normal bands and appearance of new bands and variation in band intensity. And the change effect was dose-dependent, and the DNA polymorphisms detected by AFLP technique could be used as a biomarker for detecting the genotoxic effects of copper pollution on organisms in soil system.

**Key words:** AFLP; *Vicia faba* seedling; copper stress; DNA damage