

一种简便快速检测涕灭威对 DNA 损伤的方法

张清敏,熊瑛,李得翔,戴树桂(南开大学环境科学与工程学院,天津 300071)

摘要:介绍一种简便、快速检测涕灭威对 DNA 损伤的方法,并将这种方法与其他几种检测 DNA 损伤的方法进行了比较.这种方法直接把菌体或组织匀浆液放入琼脂糖凝胶的加样孔穴中,在原位裂解后,在较高 pH 环境下进行电泳,根据 DNA 的量和损伤程度评价涕灭威对生物个体或生态系统产生的影响.

关键词: DNA 损伤;电泳;图像分析

中图分类号:X830.2 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2001)05-03-01 26

A Simple and Rapid Procedure for Detection of DNA Damage Caused by Aldicarb

Zhang Qingmin, Xiong Ying, Li Dexiang, Dai Shugui(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: A simple and rapid procedure for detection of low levels DNA damage caused by Aldicarb was developed and compared with some other methods. In the original position the gel was set in high-pH buffer to run electrophoresis after the diluent of bacteria or fragmentized organ was added into hole of agarose gel directly and cells were treated with detergent and high alkaline condition. The impact of Aldicarb to biological individual or ecosystem was assessed according to the quantity of DNA and the extent of DNA migration.

Keywords: DNA damage; electrophoresis; image analysis

电离辐射、紫外线和环境污染都可引起 DNA 单链和双链断裂,严重的不能被修复的链断裂很可能会导致致癌、致畸、致突变,甚至引起生物体的死亡^[1],所以通过对 DNA 链损伤的检测不仅可以用于检测一种污染物对生物体 DNA 链断裂损伤的程度、修复与否,还可以检测多种复合污染物对 DNA 链的影响,这对于研究多种复合污染物在多介质多界面中的环境行为以及在环境生态毒理学、致癌作用及老化等方面将具有重要意义^[2].

当进行电泳时,发生双链或单链断裂的 DNA 泳动速度就会发生改变,再通过图像分析仪的精确分析, DNA 带的量与正常对照组比较,就可以检测并比较 DNA 受到损伤的程度.

目前,常用的 DNA 链断裂检测方法有:蔗糖密度梯度离心、微孔滤膜洗脱、羟基磷灰石层析等,但上述方法均有操作复杂、费时、有的还需要放射性同位素标记细胞等缺点^[1],因此,笔者对上述实验过程加以改进,将受到不同浓度涕灭威或涕灭威混合物作用的菌体或组织匀浆液直接加入琼脂糖凝胶的孔穴中,并把十二烷基磺酸钠(SDS)和 NaOH 也直接加入同一样品

穴中,在低温下经过短时间的裂解后,在较高 pH 环境下进行电泳,根据 DNA 与溴乙锭(EB)形成的荧光强度计算出受损伤 DNA 的量,与对照组比较,从而判断涕灭威或其复合物体系对 DNA 的损伤程度.

涕灭威(Aldicarb)是氨基甲酸酯类广谱杀虫剂,国内外已广泛使用.

1 材料和方法

1.1 材料

分析纯药品:三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),乙二胺四乙酸二钠(EDTA),十二烷基磺酸钠(SDS),十二烷基苯磺酸钠(SDBS),NaOH,NaCl,硼酸,甘油,溴乙锭(EB),溴酚蓝.

生化试剂:琼脂糖(agarose),牛肉膏,蛋白胨.

涕灭威(Aldicarb):纯度>99%,购自天津农药研究所.

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(29837170)

作者简介:张清敏(1946~),男,副教授,主要研究方向为环境生物技术.

收稿日期:2000-11-02

假单孢杆菌 ADP 菌株 (*Pseudomonas* sp. Strain ADP):南开大学分子生物学研究所蔡宝立教授惠赠,蚕豆苗,薯苗,本实验室培育.

10 × TBE 缓冲液: Tris 碱 108g, 硼酸 55g, EDTA 9.3g, 蒸馏水 1000 ml, pH7.1.

样品缓冲液: 0.25 % 溴酚蓝, 30 % 甘油的水溶液.

裂解液: 2 mol/L NaOH 与 10 % SDS 等体积混匀, 临用前配制.

TE 溶液: 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, pH8.2.

EB (5 mg/ml): 棕色瓶, 4℃ 贮存.

牛肉膏蛋白胨培养液

实验仪器: Mupid-2 小型电泳仪 (Adbans 株式会社), TGL-16C 型台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), THZ-82 型恒温振荡器 (上海医疗器械四厂), Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

1.2 方法

(1) 涕灭威对假单孢杆菌 DNA 的影响 6 支试管分装牛肉膏蛋白胨培养液各 9 ml, 灭菌后, 1 支试管加无菌水 2 ml 作为对照, 另外 5 支试管分别加入浓度为 0.1, 1, 10, 100, 1000 mg/L 的涕灭威溶液各 2 ml (涕灭威实际浓度为 0.017, 0.167, 1.667, 16.667, 166.667 mg/L), 各管中分别接种假单孢杆菌菌液 1 ml, 于 32℃ 下以 80 r/min 的速度振荡培养 24 h 后, 进行检测.

各取菌液 0.3 ml 放入 1.5 ml 离心管中, 以 12000 r/min 的速度离心 10 min, 弃去上清液, 加入 25 μl TE (冷), 振摇使菌体完全悬浮.

(2) 涕灭威对蚕豆根细胞 DNA 的影响 取市售蚕豆, 用自来水浸泡 48 h (每 24 h 换 1 次水) 后, 选取饱满, 大小均匀的颗粒, 置于湿润的经消毒过的锯末上, 在室温下避光培养至长出 2 ~ 3 cm 的根.

选出根长度相近的蚕豆株, 用自来水冲洗后, 把根尖浸入浓度分别为 0 (作为对照), 0.1, 1, 10, 50, 100 mg/L 的涕灭威水溶液中.

培育 5 h 后取出, 用自来水冲洗, 用吸水纸吸去表面水, 称取经每种浓度涕灭威处理的根尖 0.1 g, 剪碎后加 400 μl TE (冷) 溶液匀浆.

(3) 涕灭威和十二烷基苯磺酸钠 (SDBS) 对薯苗 DNA 的影响 将长出 4 ~ 5 片叶子的薯苗自红薯块茎上掰下, 将薯苗基部向下, 放入 100 ml 烧杯中, 分别加入 10 ml 曝气自来水 (作为对照) 与用曝气自来水配制的含有 0.1 mg/L SDBS, 0.1 mg/L SDBS 和 1 mg/L 涕灭威, 0.1 mg/L SDBS 和 2.5 mg/L 涕灭威, 0.1 mg/L SDBS 和 5 mg/L 涕灭威, 0.1 mg/L 涕灭威各 10 ml, 烧杯

口蒙上保鲜膜只让薯苗露出, 防止水分蒸发, 室温下培育 2 d, 薯苗长出约 10 cm 根后, 从烧杯中取出薯苗, 用自来水冲洗根部, 用吸水纸擦干表面的水分, 自根尖始剪下 5 ~ 6 cm 的长度, 称取经每种浓度涕灭威和 SDBS 处理的根尖 0.1 g, 加入 400 μl 预冷的 TE 溶液匀浆. 同时取每种浓度处理的薯苗根尖, 按常规微核检测方法检测产生微核分率.

取琼脂糖 0.125 g, 加 25 ml TBE 溶液, 经高温溶化后, 冷至 40℃ 左右时, 加 2.5 μl 5 mg/ml EB 溶液, 混匀后制胶板. 然后取悬浮液或匀浆液 10 μl 加入孔穴中, 再分别加入 2 μl 裂解液和样品缓冲溶液, 在 4℃ 下静置 10 min, 以 TBE 溶液为电泳缓冲液, 在 4℃, 25 V 电压下电泳 1 ~ 2 h. 用 Image Master VDS 照相并扫描计算 DNA 含量, 以荧光强度积分值表示, 即 IOD 值 (Integrated Optical Density).

2 结果与讨论

2.1 涕灭威对蚕豆根细胞 DNA 的影响

不同浓度涕灭威对蚕豆根细胞 DNA 的影响, 如图 1 所示.

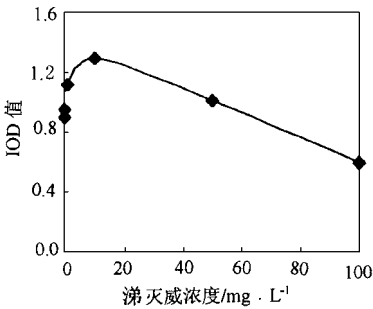


图 1 涕灭威对蚕豆根细胞 DNA 的影响

Fig.1 DNA damage of root cell of horsebean caused by Aldicarb

由图 1 可以看出, 在涕灭威浓度很低的情况下, IOD 值略有上升, 说明对 DNA 链损伤不大, 但是当涕灭威浓度大于 10 mg/L 时, IOD 值迅速下降, 说明 DNA 开始受到严重损伤.

2.2 涕灭威对假单孢杆菌 DNA 的影响

不同浓度涕灭威对假单孢杆菌 DNA 的影响, 如表 1 所示.

由表 1 可以看出, 在涕灭威浓度很低的情况下, IOD 值上升, 说明此时涕灭威对 DNA 影响不大, 但是当涕灭威浓度大于 1.667 mg/L 时, IOD 值迅速下降, 说明 DNA 开始受到严重损伤.

表 1 涕灭威对假单孢杆菌 DNA 的影响

Table 1 DNA damage of *Pseudomonas* sp. Strain ADP caused by Aldicarb

泳道	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4
涕灭威浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0.167	1.667	16.667
IOD 值($\times 10^5$)	0.98	1.18	1.59	0.39

2.3 涕灭威和十二烷基苯磺酸钠(SDBS)对薯蓣根 DNA 的影响

不同浓度涕灭威和十二烷基苯磺酸钠对薯蓣根 DNA 的损伤如图 2 和表 2 所示.

由表 2 可以看出,在 SDBS 浓度相同的情况下,在涕灭威浓度很低时,IOD 值上升,说明此时涕灭威对 DNA 影响不大,但是随着涕灭威浓度的升高,IOD 值迅速下降,说明 DNA 开始受到严重损伤.

薯蓣根尖的微核检查,只有 0.1 mg/L SDBS 与

表 2 涕灭威和十二烷基苯磺酸钠对薯蓣根 DNA 的影响

Table 2 DNA damage of root cell of seedling of sweet potato caused by Aldicarb and SDBS

泳道	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
Aldicarb/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	1	2.5	5	0.1
SDBS/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0
IOD 值($\times 10^5$)	1.41	2.15	3.64	4.36	2.48	4.13

2.4 与其他检测方法的比较

近年以来,许多学者采用单细胞凝胶电泳(Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)技术观察单个细胞 DNA 损伤,该方法是一种比较简便的检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术^[3],但仍需单细胞的分离等前处理操作,计算时误差大,电泳凝胶板需铺 3 层胶,制作复杂,且低熔点琼脂糖比普通琼脂糖贵十几倍,费用高.

目前最灵敏最准确检测残留农药的酶联免疫(Enzyme Link Immunor Assay, ELIA)技术,检测涕灭威在果汁和水中的最低检出浓度分别为 0.75 mg/L 和 0.3 mg/L^[4],但是不能反映其生物活性,而本方法在 0.1 mg/L 低浓度下就可以反映出涕灭威的生物有效性.与常规的微核检测法相比,不仅检测时间由 7~8 h 缩短为 2~3 h,而且使检测涕灭威生物毒性的灵敏度提高了 50 倍.

本方法是将受到污染物作用的菌体或组织匀浆液直接加入琼脂糖凝胶的加样穴中,不必进行繁琐的提取和纯化,从而既简化了操作步骤,又节省了时间,也避免了在提取过程中人为造成的 DNA 损伤.该方法简便、灵敏,只需 2~3 h 就可以完成整个检测过程.

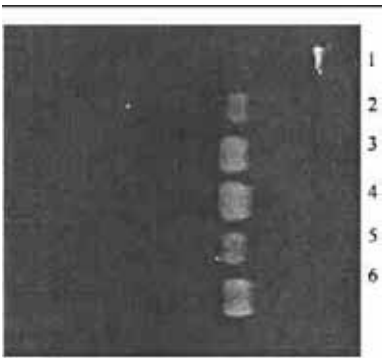


图 2 涕灭威和十二烷基苯磺酸钠对薯蓣根 DNA 的影响

Fig.2 DNA damage of root cell of seedling of sweet potato caused by Aldicarb and SDBS
5 mg/L 涕灭威复合物处理的植株根细胞才能检出有微核产生,微核千分率在 5‰左右.

另外,将裂解液直接加入凝胶的孔穴中既巧妙地吸取了 SCGE 原位反应的优点,又避免了 SCGE 因电泳分离效果差而引起的计算上的误差.

本方法可以用于综合评价多种复合污染物在多介质多界面环境体系中对于环境生物的影响,直接联系污染物浓度与效应,精确地判定污染物引起的 DNA 变化对生物个体或生态系统的影响,可以联系微观和宏观效应,实现对长期生态效应进行短期预测的目的,因此对于环境管理、风险性评价和生态系统平衡等方面将具有重要意义.

参考文献:

1 贺涛,夏竹萱.检测 DNA 链断裂的简化荧光方法及其应用.军事医学科学院院刊,1990,14(3):170~173.

2 Narendar P S et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Experimental Cell Research, 1988, 175:184~191.

3 秦椿华,沈建英等. DNA 断裂检测方法——单细胞凝胶电泳法.生物化学与生物物理进展,1995,22(6):517~520.

4 赵华清.环境检测中的新工具——酶免疫检测技术.上海环境科学,1998,17(1):39~42.