

铀胁迫对大豆幼苗细胞 DNA 损伤的彗星试验研究

公新忠, 李广悦, 丁德馨, 聂小琴, 胡 南, 殷 杰

(南华大学铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 衡阳 421001)

摘 要:通过室内培养方法,用八氧化三铀配制浓度为 100、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6 种铀溶液和对照组培养大豆幼苗,采用彗星试验研究了铀胁迫对大豆幼苗细胞 DNA 的损伤情况。结果表明,铀溶液能对大豆幼苗细胞 DNA 造成损伤;配制的 6 种浓度的铀溶液均对大豆幼苗根部细胞 DNA 造成损伤,其中浓度为 800 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液对大豆幼苗根部细胞 DNA 的损伤最严重;铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液对大豆幼苗茎部细胞 DNA 的损伤最严重;配制的 6 种浓度的铀溶液对大豆幼苗叶部细胞 DNA 的损伤不明显。

关键词:铀溶液;彗星试验;DNA 损伤;大豆幼苗

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)03-0418-08

Damages to DNA of Soybean Cell Caused by the Stress from Uranium Using Comet Assay

GONG Xin-zhong, LI Guang-yue, DING De-xin, NIE Xiao-qin, HU Nan, YIN Jie

(Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract:The uranium solutions and a comparison solution were used to cultivate soybean seedlings. The uranium solutions were compound-ed of U_3O_8 , and were in the concentrations of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. A solution for comparison was prepared. The comet assay was used to determine the damages to soybean seedlings cell DNA caused by the stress from the uranium solutions. The research results showed that the uranium solutions could promote the germination of the soybean seed, that the uranium solutions have damaged the soybean seedlings cell DNA, that the uranium solutions caused the most serious damage to the soybean seedlings' root cell DNA, that the uranium solutions in concentrations of 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caused the most serious damage to the soybean seedlings' root cell DNA, that the uranium solution in the concentration of 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caused the most serious damage to the soybean seedlings' stem cell DNA and that the uranium solutions caused no obvious damage to the soybean seedlings' leaf cell DNA.

Keywords:uranium solution; comet assay; DNA damages; soybean seedling

铀废石或铀尾矿中的铀被认为是最有可能影响地表水土的放射性污染物,其毒性机理的研究主要集中于它对人类和动物的危害,而它对植物毒害的研究则很少^[1-2]。人们一般采用 Allium 试验、染色体断裂试验(CA)、微核试验(MCN)和 Ames 试验研究铀对基因的毒性以预测铀污染带来的风险。但是这些方法都是在大量烦琐试验的基础上建立起来的,且费用昂贵,

难以广泛采用^[3]。

单细胞凝胶电泳(single cellgel electrophoresis),简称 SCGE 技术,又称为彗星试验(comet assay),最早是由 Ostling 和 Johanson 提出的^[9-10]。但是彗星试验亦主要用于检测动物细胞和人类细胞 DNA 的损伤^[8,12],这是由于植物和动物在细胞结构上存在着显著的差异:植物细胞具有牢固的细胞壁,其细胞难以分离,因而限制了彗星试验技术在植物领域中的应用。直到 1996 年, Koppen 才第一次报道采用植物作为试验材料进行彗星试验,检测了环境污染物对植物基因的损伤^[3]。此后不断有人利用植物彗星试验检测环境污染

收稿日期:2009-04-21

作者简介:公新忠(1982—),男,山东青岛人,在读硕士,主要从事铀矿山生物修复研究。E-mail:gongxz007@126.com

通讯作者:丁德馨 E-mail:dingdxxzz@163.com

物引起的植物基因的致突变,这表明植物彗星试验可作为环境污染检测的一种手段^[1-4]。大豆是我国主要的油料作物之一,其产量和质量对农业生产具有重要意义。为此,本文选取大豆为试验材料,采用彗星试验研究了不同浓度的铀溶液对大豆幼苗细胞 DNA 造成的损伤情况,探索了影响大豆幼苗生长的铀浓度阈值,为矿区大豆的种植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料选用矿区种植的大豆(*Phaseolus vulgaris* L.),品名为日本青大莢毛豆。

1.2 试剂和溶液

(1)铀溶液:准确称取基准 U_3O_8 1.179 0 g,于 1 000 mL 容量瓶配制成铀浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液,铀的化学形态为 $(UO_2)^{2+}$,通过稀释得到其他浓度的铀溶液。

(2)单细胞凝胶电泳试剂盒(南宁市拜康生物技术有限公司)包括:

①细胞裂解液:裂解细胞用,每一瓶细胞裂解液(固体)使用前用 890 mL 双蒸馏水溶解,加入氢氧化钠片,将溶液的 pH 值调至 10,溶解中有部分晶体析出,并可见泡状物,使用时摇匀即可,放置 4℃ 保存备用,在 6 个月内使用。进行细胞裂解时,量取 90 mL 细胞裂解液,加入 10 mL 二甲基亚砜(DMSO),混匀,即为细胞裂解混合液。裂解混合液要即用即配,并放置在 4℃ 预冷。

②电泳液:电泳用,使用前每一瓶用 1 000 mL 双蒸馏水溶解,在电泳前新鲜配置。

③正常熔点的琼脂糖(NMA):称取适量,用 PBS(磷酸缓冲液)配成 0.8% 溶液,放置 4℃ 保存,铺胶前加热。

④低熔点的琼脂糖(LMA):每一支使用前加入 6 mL 的 PBS 溶解,放置 4℃ 保存,铺胶前加热。

⑤染色剂:微量的粉末状物,打开前捏紧瓶子头部先用力摇几下,以便将粘附在盖子和壁上的粉末收集到瓶底,然后旋开盖子加入 8 mL 双蒸馏水,拧上盖子摇匀,溶解,常温避光保存。染色:细胞电泳后,将 2~3 滴染色剂加到含细胞的琼脂糖上染色,如染色的背景过深,可以适当稀释至满意,过程避光。

(3)二甲基亚砜(DMSO)分析纯(AR)(天津市巴斯夫化工有限公司)。

(4)纤维素酶(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

(5)果胶酶(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

1.3 仪器

HH-2 数显恒温水浴锅、DYY-8B 型稳压稳流电泳仪、水平电泳槽、AL104 电子天平、WH-2 微型旋涡混合仪、BCD-195KAN 海尔-20℃ 冰箱、seven Easy pH 精密 pH 计、CL-32L 全自动高压蒸汽灭菌器、GenPureUV/UF 超纯水设备、GZX-300BSH-Ⅲ型光照培养箱、Nikon E600 荧光显微镜

1.4 试验设计

试验设 6 组铀浓度 1 000 (T1)、800 (T2)、600 (T3)、400 (T4)、200 (T5)、100 (T6) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胁迫组和 1 个蒸馏水培养的对照组(CK)。胁迫组铀溶液是用蒸馏水将 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀标准溶液稀释得到,并用碳酸钠和碳酸氢钠的缓冲液调 pH 至 5.5 左右,确保各胁迫组铀溶液中铀不沉淀。

将种子放在自来水中漂洗选种,然后用 0.2% 氯化汞溶液消毒 10 min,再用蒸馏水冲洗数次。从这些种子中选取 20 粒饱满、色泽均一的种子均匀排列在直径 12 cm、垫有 2 层滤纸培养皿中,分别添加 6 组铀浓度溶液进行处理,与对照组同时放置于 GZX-300BSH-Ⅲ型光照培养箱中(25 ± 0.5)℃ 培养,光照强度模拟自然光照变化,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

此后每天酌情加入相应铀浓度的铀溶液,记录好加液量及生长状况,对比拍照,统计每日的萌芽率。

待幼苗长至二叶一心期即生长 7 d,测定大豆幼苗生物量。

大豆生长到第 7 d,用纤维素酶和果胶酶提取大豆根部、茎部和叶部的细胞核。

1.5 测定项目及方法

1.5.1 种子萌发率的测定

培养至 1~7 d 时,每天早晨定时 9 点观察、统计各浓度处理组的萌发率,作好数据记录。

1.5.2 幼苗生物量的测定

培养至幼苗长至二叶一心期,剪取此时幼苗整株,用自来水反复冲洗,双蒸馏水淋洗后,滤纸吸干,称量幼苗的根重、苗重和鲜重。

1.5.3 彗星试验

1.5.3.1 细胞核悬液的制备

剪取各种铀浓度下的根、茎、叶各 1 g 置于离心管中,加 10 mL 纤维素酶和果胶酶混合液,在 25℃ 恒温条件下放置 $24\text{ h}^{[1]}$ 。

1.5.3.2 电泳试验

采用 3 层凝胶法制片,第一层胶为正常熔点琼脂

糖 (NMA, 1%), 第二层胶为低熔点琼脂糖 (LMA, 0.78%) 与细胞悬液 (4:1 体积比) 的混合液, 第三层重复第二层的步骤, 然后放入平皿中加入刚配置的细胞裂解混合液, 在 4 °C 下裂解 3 h, 然后用蒸馏水冲洗两次, 置于电泳缓冲液中静置 20 min, 使 DNA 解旋, 最后在室温下电泳 (电压 20 V) 7 min^[13]。

1.5.3.3 染色

电泳结束后用双蒸馏水漂洗玻片两次, 每次 5 min, 滴 2~3 滴染色剂, 在黑暗条件下染色 10 min。

1.5.3.4 观察、拍照

在荧光显微镜 515~560 nm (绿光) 波长下观察, 对观察到的彗星样细胞进行拍照。

2 试验结果

2.1 不同浓度铀溶液对大豆萌发率的影响

通过图 1 可以看出: 第 1 d, 铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著; 第 2 d, 铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.01$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比均显著增加 ($P<0.05$); 第 3 d, 铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著; 第 4 d, 铀浓度为 1 000 与 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两组铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 铀浓度为 600 与 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两组铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著降低 ($P<0.05$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著; 第 5 d, 铀浓度为 1 000、800、200、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 4 组铀溶液处

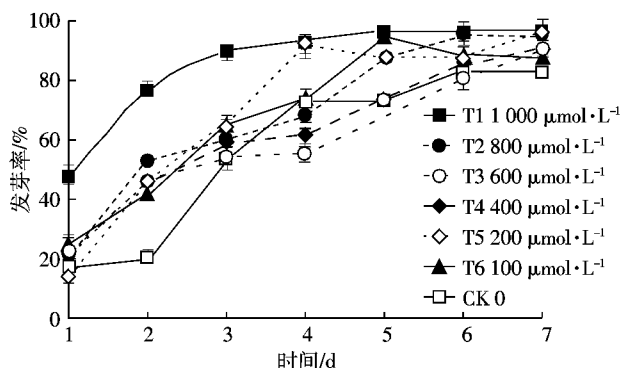


图 1 不同浓度的铀溶液胁迫对大豆种子萌发率影响

Figure 1 Effects on the germination rate of soybean seed caused by uranium solutions in different concentrations

理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 两组发芽率一致, 铀浓度为 600 与 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两组铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著; 第 6 d 天, 铀浓度为 1 000 与 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两组铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著; 第 7 d, 铀浓度为 1 000、800 与 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 组铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 其余各浓度铀溶液处理的大豆发芽率与对照组相比不显著。

2.2 不同浓度铀溶液对大豆幼苗鲜重的影响

从图 2 可以看出, 试验中采用的 6 种浓度的铀溶液对大豆根部的生物量的影响与对照组相比不显著; 在铀浓度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液下生长的大豆的苗重和鲜重与对照组相比显著增加 ($P<0.05$), 在其余各浓度铀溶液下生长的大豆的苗重和鲜重与对照组对比不显著。在 100~600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 随着铀浓度的升高, 生物量下降; 当浓度达到 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生物量突然升高, 明显高于对照组 ($P<0.05$), 说明 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是大豆的一个适应浓度。

2.3 不同浓度铀溶液对大豆根、茎、叶细胞 DNA 损伤的影响

通过铀溶液为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的这组中根、茎、叶的彗星图像的对比可以看出, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下根的拖尾比 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下茎和叶的拖尾明显, 表明铀溶液对根部细胞 DNA 的损伤比茎部及叶部细胞 DNA 的损伤严重; 比较其余各浓度下根、

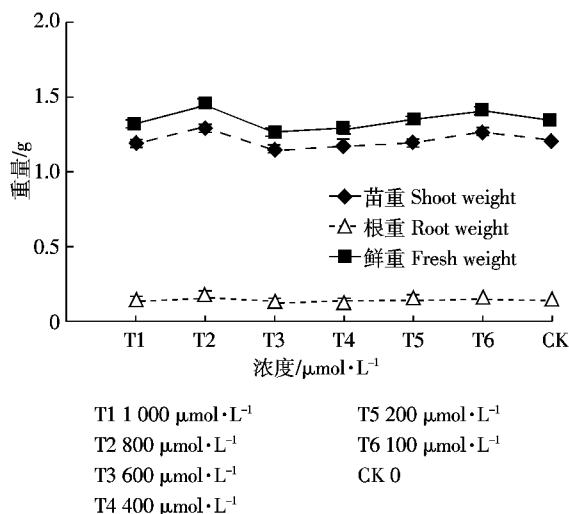


图 2 不同浓度的铀溶液胁迫对大豆幼苗鲜重的影响

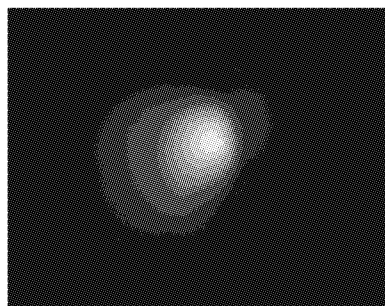
Figure 2 Effects on the fresh weights of soybean seedlings caused by uranium solutions in different concentrations

茎、叶的彗星图像(图 3)也表明铀溶液对根部细胞 DNA 的损伤比茎部及叶部细胞 DNA 的损伤严重。

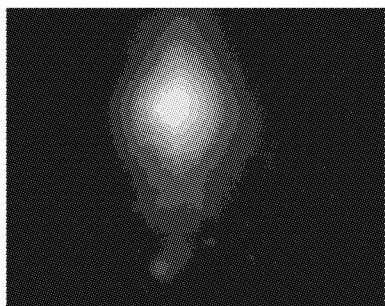
通过比较各铀浓度下大豆根部的彗星图像可以看出,800 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下根部的拖尾比其余浓度下的拖尾明显,表明 800 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的铀溶液对大豆的根部细胞 DNA 的损伤最严重。

通过比较各浓度下大豆茎部的彗星图像可以看出,1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下茎部的拖尾比其余各浓度下的拖尾明显,表明 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的铀溶液对大豆的茎部细胞 DNA 的损伤最严重。

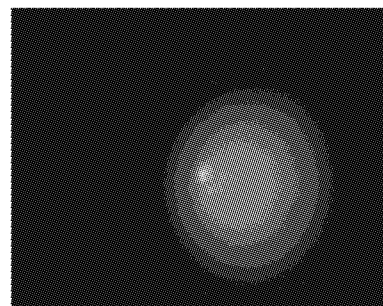
通过比较各浓度下大豆叶部的彗星图像可以看出,试验中各浓度下叶部的拖尾均不明显,表明铀溶



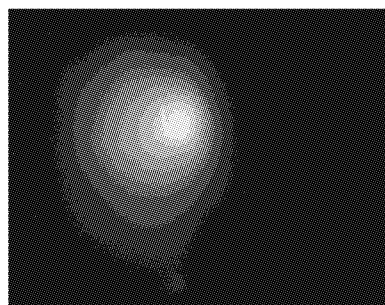
在铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗根部细胞 DNA 的彗星图片



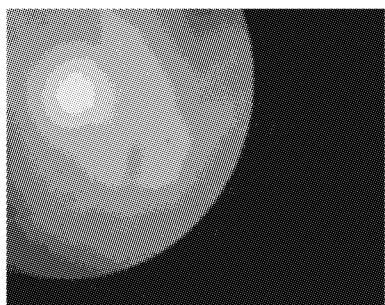
在铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗茎部细胞 DNA 的彗星图片



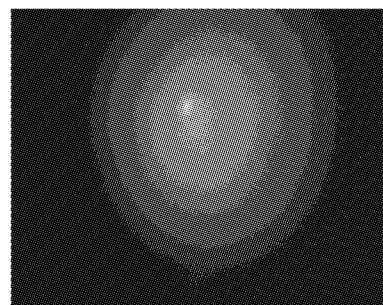
在铀浓度为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗叶部细胞 DNA 的彗星图片



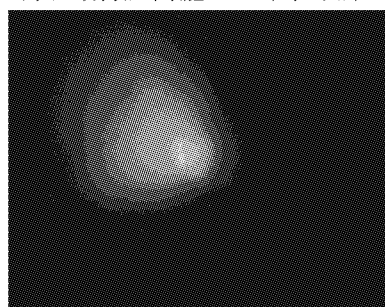
在铀浓度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗根部细胞 DNA 的彗星图片



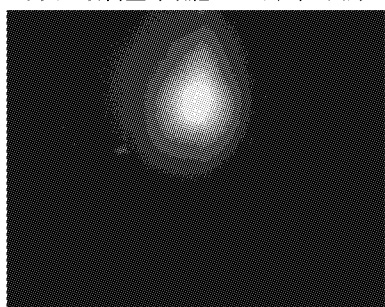
在铀浓度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗茎部细胞 DNA 的彗星图片



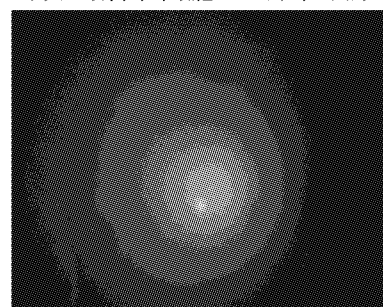
在铀浓度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗叶部细胞 DNA 的彗星图片



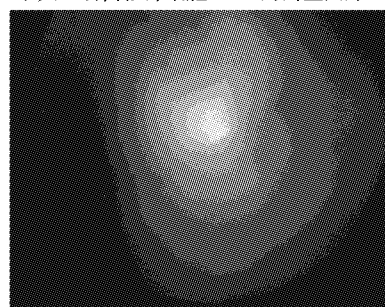
在铀浓度为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗根部细胞 DNA 的彗星图片



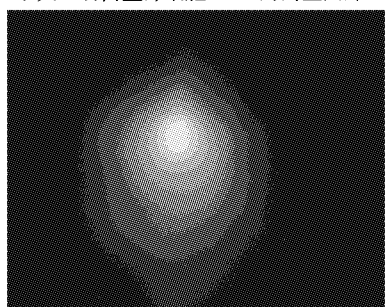
在铀浓度为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗茎部细胞 DNA 的彗星图片



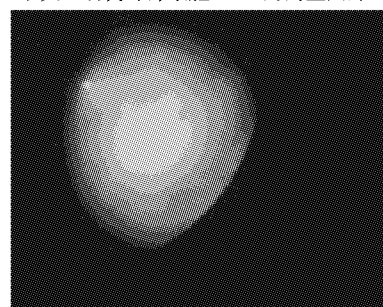
在铀浓度为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗叶部细胞 DNA 的彗星图片



在铀浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗根部细胞 DNA 的彗星图片



在铀浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗茎部细胞 DNA 的彗星图片



在铀浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铀溶液胁迫下大豆幼苗叶部细胞 DNA 的彗星图片

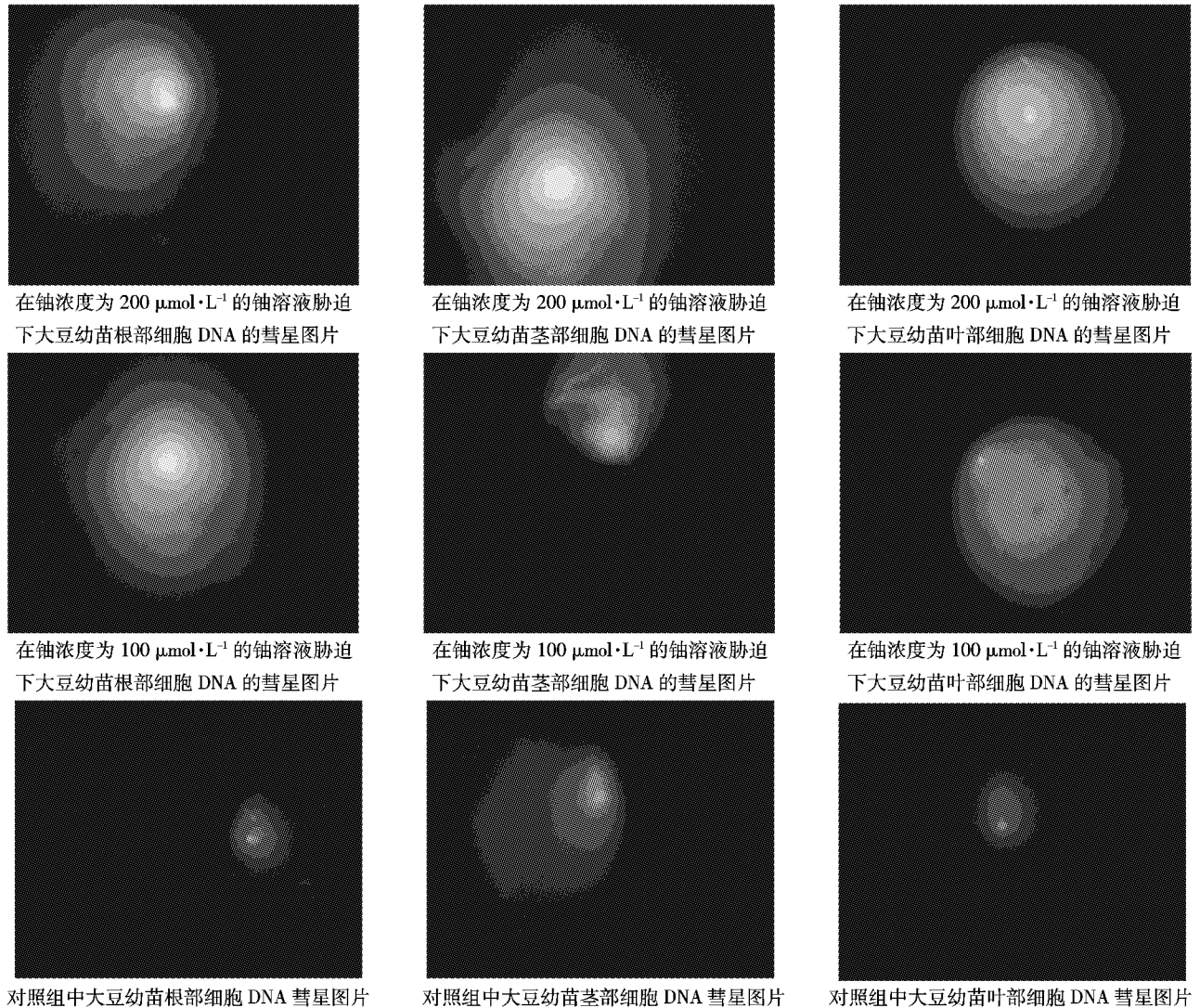


图 3 不同浓度铀溶液对大豆幼苗根、茎、叶细胞 DNA 损伤的彗星图像

Figure 3 Comet images of damages to soybean seedlings' root, stem and leaf cells DNA caused by uranium solutions in different oncentrations

液对大豆的叶部细胞 DNA 的损伤不明显。

通过表 1 中 Tail Length 这一项的比较来看: $1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆茎部拖尾比根部和叶部的拖尾长; $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆茎部拖尾比根部和叶部的拖尾长; $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆叶部拖尾比根部和茎部拖尾长; $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆茎部拖尾比根部和叶部的拖尾长; $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根部拖尾比茎部和叶部的拖尾长; $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆叶部拖尾比根部和茎部拖尾长; 对照组中, 大豆根、茎、叶部拖尾现象不明显。比较不同铀浓度下大豆幼苗根部的拖尾可以看出, $1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆幼苗根部的拖尾尾长比其他浓度下的拖尾尾长显著增加 ($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗茎部的拖尾可以看出, $1\,000$ 、 800 、 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓

度下, 大豆幼苗茎部的拖尾尾长比其他浓度下的拖尾尾长显著增加 ($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗叶部的拖尾可以看出, 800 、 $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆幼苗叶部的拖尾尾长比其他浓度下的拖尾尾长显著增加 ($P<0.05$)。

通过表 1 中 % DNA in tail 这一项的比较来看, 按照尾部和总彗星荧光百分比 (% DNA in tail) 评价标准 (表 2) 评价, $1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根部高度损伤, 茎部重度损伤, 叶部无损; $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根部轻度损伤, 茎部和叶部高度损伤; $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根部和叶部高度损伤, 茎部无损伤; $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆茎部重度损伤, 根部和叶部无损伤; $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根、茎、叶部无损伤; $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 大豆根、茎、叶部无

损伤;对照组中,大豆根部无损伤,茎部和叶部轻度损伤。比较不同铀浓度下大豆幼苗根部的损伤程度可以看出,1 000、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗根部的损伤程度比其他浓度下的损伤程度显著严重($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗茎部的损伤程度可以看出,1 000、800、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗茎部的损伤程度比其他浓度下的损伤程度显著严重($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗叶部的损伤程度可以看出,800、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗叶部的损伤程度比其他浓度下的损伤程度显著严重($P<0.05$)。

通过表 1 中 Tail moment 这一项的比较来看,1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆茎部尾矩比根部和叶部的尾矩大;800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆茎部尾矩比根部和叶部的尾矩大;600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆叶部尾矩比根部和茎部尾矩大;400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆茎部尾矩比根部和叶部的尾矩大;200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆根部尾矩比茎部和叶部的尾矩大;100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆叶部尾矩比根部和茎部尾矩大;对照组中,大豆根、茎、叶部尾矩不明显。比较不同铀浓度下

表 2 尾部和总彗星荧光百分比评价标准		
Table 2 Evaluation criteria for DNA% in tail		
3 等级	Tail DNA%	DNA 损伤程度
0	<5	无损伤
1	5~20	轻度
2	2	0~40
中度	3	40~95
重度	4	>95

大豆幼苗根部的尾距长可以看出,1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗根部的尾距长比其他浓度下的尾距长显著增加($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗茎部的尾距长可以看出,1 000、800、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗茎部的尾距长比其他浓度下的尾距长显著增加($P<0.05$)。比较不同铀浓度下大豆幼苗叶部的尾距长可以看出,800、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,大豆幼苗叶部的尾距长比其他浓度下的尾距长显著增加 ($P<0.05$)。

3 讨论

通过铀对大豆萌发率的影响可以看出,铀浓度为

表 1 不同浓度铀溶液对大豆幼苗细胞 DNA 损伤的 Comet Score				
Table 1 Comet Score analysis of damages to soybean seedlings' cell DNA caused by uranium solutions in different concentrations				
铀浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Tail length(px)尾长	% DNA in tail 尾部和总彗星荧光百分比	Tail moment 尾矩
1 000	根 root	21.000 000±4.320 200	74.757 749±15.340 201	15.699 127±3.420 230
	茎 stem	65.000 000±13.420 210	95.458 484±18.352 200	62.048 016±12.310 200
	叶 leaf	3.000 000±0.520 200	0.032 240±0.000 200	5.000 000±0.420 200
800	根 root	5.000 000±1.020 200	8.969 087±1.330 200	0.448 454±0.001 200
	茎 stem	97.000 000±19.020 200	57.756 972±16.550 200	56.024 261±10.300 200
	叶 leaf	46.000 000±9.327 201	72.955 042±15.360 201	33.559 319±6.320 080
600	根 root	3.000 000±0.390 240 6	9.275 069±14.52 0200	4.000 000±0.790 200
	茎 stem	2.000 000±0.190 200	0.000 106±0.000 030	2.000 000±0.310 800
	叶 leaf	79.000 000±14.300 200	64.257 210±14.520 230	50.763 195±9.420 400
400	根 root	6.000 000±1.340 200	0.000 136±0.000 070	3.000 000±0.490 320
	茎 stem	57.000 000±11.520 200	89.272 493±18.020 300	50.885 323±8.390 740
	叶 leaf	1.000 000±0.240 200	0.000 145±0.000 034	1.000 000±0.356 040
200	根 root	13.000 000±2.510 040	0.000 089±0.000 027	0.000 012±0.000 002
	茎 stem	1.000 000±0.305 200	0.000 132±0.000 030	0.300 000±0.040 240
	叶 leaf	1.000 000±0.108 041 0	0.000 109±0.000 042	0.080 000±0.020 240
100	根 root	2.000 000±0.380 300	0.000 367±0.000 140	0.000 007±0.000 005
	茎 stem	1.000 000±0.220 300	0.000 169±0.000 040	0.000 002±0.000 001
	叶 leaf	11.000 000±2.125 200	0.000 348±0.000 076	0.000 038±0.000 009
CK	根 root	1.000 000±0.600 200	0.001 588±0.000 640	0.003 080±0.000 800
	茎 stem	1.000 000±0.670 200	5.024 752±1.330 240	0.002 500±0.001 300
	叶 leaf	1.000 000±0.570 300	19.504 638±3.890 230	0.001 040±0.000 301

1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铈溶液处理的大豆发芽率与对照组相比一直是显著增加($P<0.05$),对照组一开始发芽率最低,中间有一段时间高于一些胁迫组的,最后一日对照组的发芽率又是最低的,说明铈溶液对大豆种子的萌发有一定的促进作用,可能是铈离子激发了大豆种子内的某种酶或者激素,促进了种子的萌发,这方面有待下一步继续研究。另外发现各组中均出现有种子自身不能吸水膨胀萌发的种粒,这可能与种子的选择有一定关系。

对大豆生物量的影响看出,600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的生物量是最低的,结合铈溶液对种子的萌发率的影响,600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 有可能是影响大豆生长的阈值,还需要下一步试验来验证。另外,6 种铈浓度及对照组对根部的生物量影响不明显,但是试验过程中发现只有对照组中大豆的根是白色的,而其他浓度中的大豆根部均已变黑,说明铈溶液对大豆根部的影响没有通过生物量表现出来。

在彗星试验中,通过测定 DNA 迁移部分的光密度或迁移长度可以定量测定 DNA 的损伤程度、确定外界作用因素和 DNA 损伤之间的剂量效应关系^[6]。在以前的研究中,动物细胞研究比较多。但植物细胞因其具有细胞壁,所以进行彗星试验的关键是破坏植物细胞壁使细胞核游离出来。目前采用的游离植物细胞核的方法主要是酶或机械破坏细胞壁的方法^[4-7],在本试验中采用果胶酶和纤维素酶混合液的方法提取。试验首先采用机械破坏细胞壁方法提取细胞核,通过对提取液进行苏木精染色,在普通显微镜下观察,没有发现细胞核,重复两次均未发现细胞核,可能机械法对提取大豆细胞核不适用。电泳时间对彗星试验的影响很明显,目前采用稳压 20 V,持续 20~30 min^[9],一开始采用此标准,在荧光显微镜下没有发现细胞核,后来采用恒压 20 V,持续 7 min,发现细胞核而且有明显拖尾现象,电泳时间长可能导致细胞核跑出载玻片,导致观察不到。在彗星图像中,叶子的 DNA 损伤不是很明显,可能是培养时间短, DNA 损伤还没有在叶子上显现出来。下一步考虑培养一个完整的生命周期,来观察铈溶液对大豆各部分的影响。

目前,一种观点认为,在检测 DNA 损伤时,彗星率和彗星尾这两个指标较 Olive 尾距更敏感^[15]。但大多数的观点认为,Olive 尾距为尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积,因为它既包含尾长度的信息,又包含尾光密度的信息,Olive 尾距也是各试验室图像分析系统使用的标准指标^[16]。Comet

Score 分析的最重要的参数是尾长、头尾光密度比(通常以尾部 DNA 所占百分比表示)和尾矩^[14],因此选择尾长、头尾光密度比和尾距这 3 个参数都进行了测量与统计,结果发现,铈浓度 $\geq 400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时大豆幼苗根、茎、叶细胞 DNA 的尾长、头尾光密度比和尾距与对照组相比有极显著的差异。铈浓度为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时大豆幼苗根、茎、叶细胞 DNA 的尾长、头尾光密度比和尾距与低于 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时相比有极显著的差异,也说明 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可能是影响大豆幼苗生长的阈值。

4 结论

铈溶液能促进大豆种子的萌发;铈溶液对大豆幼苗的损害是从根部开始的;试验中各浓度铈溶液对大豆幼苗根部细胞 DNA 造成的损伤最严重;铈浓度为 800 和 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对大豆幼苗根部细胞 DNA 造成的损伤最严重;1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时对大豆幼苗茎部细胞 DNA 造成的损失最严重;试验中各浓度铈溶液对大豆幼苗叶部细胞 DNA 造成的损伤不明显。

参考文献:

- [1] Navarrete M H, Carrera P, Miguel M, et al. A fast comet assay variant for solid tissue cells; The assessment of DNA damage in higher plants[J]. *Mutat Res*, 1997, 389: 271-277.
- [2] Rojas E, Lopez M C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications[J]. *J of Chromatogr B*, 1999, 722: 225-254.
- [3] Koppen G, Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cell[J]. *Mutat Res*, 1996, 360: 193-200.
- [4] Gichner T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco cellular and acellular comet assays[J]. *Mutat Res*, 2003, 535: 187-193.
- [5] Gabriele J, Merten M, Ingo S. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley[J]. *Mutat Res*, 2001, 493: 95-100.
- [6] Meng Z Q, Zhang L Z. Studies on DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell microgel electrophoresis technique[J]. *Acta Genetica Sinica*, 1998, 25(4): 294-300.
- [7] Ning S B, Song Y C, Damme P. Characterization of the early stages of programmed cell death in maize root cells by using comet assay and the combination of cell electrophoresis with annexin binding[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23: 2096-2102.
- [8] 陈 颖, 王子健. 用彗星试验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤[J]. 土壤学报, 2005, 42(4): 577-583.
CHEN Ying, WANG Zi-jian. Detection of genotoxicity of soil pollution to earthworm in vivo exposure by comet assay[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 577-583.
- [9] 林爱军, 张旭红, 朱永官. 镉对小麦叶片 DNA 伤害的彗星实验研究[J].

环境科学学报, 2005, 25(3):329-333.

LIN Ai-jun, ZHANG Xu-hong, ZHU Yong-guan. The comet assay detects Cd-induced DNA damages in wheat leaves[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(3):329-333.

- [10] 孟紫强, 张连珍. 应用单细胞凝胶电泳技术研究细胞 DNA 损伤的原理与方法[J]. 癌变畸变突变, 1998, 10(6):377-382

MENG Zi-qiang, ZHANG Lian-zhen. Principle and method of the single cell microgel electrophoresis(SCGE) technique to study DNA damage in mammalian cells[J]. *Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis*, 1998, 10(6):377-382.

- [11] 林爱军, 张旭红, 张增利, 等. 利用不同植物进行 DNA 损伤彗星实验的方法比较[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2):166-171.

LIN Ai-jun, ZHANG Xu-hong, ZHANG Zeng-li, et al. A comparison study using comet assay to detect DNA damages in different plant species[J]. *African Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(2):166-171.

- [12] 王涛, 衡正昌. 彗星试验研究现状及应用前景[J]. 癌变畸变突变, 1999, 1(4):208-211.

WANG Tao, HENG Zheng-chang. The research status and application perspective of comet assay[J]. *Carcinogenesis Teratogenesis and Muta-*

genesis, 1999, 1(4):208-211.

- [13] 吴庆钰, 杨俊诚, 张建峰, 等. 镉与百草枯复合污染对水稻细胞、DNA 的毒害作用[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6):2216-2220.

WU Qing-yu, YANG Jun-cheng, ZHANG Jian-feng, et al. Toxicity of co-contamination with bensulfuron methyl and cadmium to cell and DNA of rice[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6):2216-2220.

- [14] 杨定明, 费红梅, 景秀丽, 等. 彗星试验评价硝酸镧对蚕豆根尖细胞的遗传毒性[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(6):2387-2390.

YANG Ding-ming, FEI Hong-mei, JING Xiu-li, et al. Evaluation of genotoxicity induced by lanthanum nitrate in the root tip cells of vicia faba by comet assay[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(6):2387-2390.

- [15] Siddique H R, Chowdhuri D K, Saxena D K, et al. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay[J]. *Mutagenesis*, 2005, 20(4):285-290.

- [16] Harman D. Free-radical theory of aging: Increasing the functional life span[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 717:1-15.