

·技术与方法·

紫外辐射诱导植物叶片 DNA 损伤敏感性差异

王静^{1†}, 蒋磊^{1†}, 王艳^{1,2}, 李韶山^{1*}

¹华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; ²暨南大学理工学院环境工程系, 广州 510632

摘要 单细胞凝胶电泳(彗星检测, comet assay)技术已广泛应用于动物细胞DNA损伤检测,但在植物细胞DNA损伤检测中的应用尚不多见。本研究通过对动物细胞彗星检测方法的改进,利用植物细胞原生质体作为材料,研究了不同发育期九里香(*Murraya paniculata*)叶片对UV-B诱导的DNA损伤的敏感性差异。彗星检测结果表明,九里香叶片DNA的损伤程度与UV-B辐射的剂量呈正相关;在相同UV-B辐射剂量下,九里香幼嫩叶片比成熟叶片的DNA损伤量大,表明其幼嫩叶片对UV-B辐射的敏感性比成熟叶片高。

关键词 彗星检测, DNA损伤, 单细胞凝胶电泳, UV-B辐射

王静, 蒋磊, 王艳, 李韶山 (2007). 紫外辐射诱导植物叶片 DNA 损伤敏感性差异. 植物学通报 24, 189–193.

由于氯氟烃(CFC)等化学物质的大量使用,大气臭氧层遭到严重破坏,导致到达地面的太阳紫外辐射(主要是波长280–315 nm, UV-B)增强(Rozema et al., 2002)。UV-B辐射增强对植物(农作物)、动物(包括人类)和微生物以及整个地球生态系统的影响,已成为备受瞩目的重大科学问题。近年来大量研究表明,UV-B辐射影响植物的生长发育和生理生化过程,并造成农作物减产(Björn, 1997)。

紫外辐射(UV-C, 200–280 nm)对微生物DNA损伤作用已有大量研究。UV-C对DNA损伤可以使同一条链上相邻的2个嘧啶碱基以共价键形成嘧啶二聚体环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimers, CPD)和6-4光产物(pyrimidine 6-4 pyrimidinone photoproducts, 6-4 PP),如TT、TC、CC二聚体等(Britt, 1996)。DNA分子一旦形成二聚体, DNA双链间的氢键和双螺旋结构就会受到破坏,正常的DNA复制、转录则不能进行。已有研究证实,UV-B对植物DNA的作用与UV-C对微生物DNA损伤作用类似,但由于UV-B光量子的能量比UV-C要低,UV-B对DNA损伤的效

率要低得多。UV-B可以诱导高等植物DNA形成CPD和6-4 PP,同时也能导致碱性不稳定位点的形成和DNA单链的断裂。而且UV-B诱导植物DNA嘧啶二聚体的形成具有温度依赖性(Li et al., 2001, 2004)。当DNA受紫外光照射形成嘧啶二聚体后,光修复酶(photolyase)可以利用蓝光和近紫外光(300–500 nm)把二聚体单聚化(Britt, 1996)。植物CPD光复活酶活性最早是在拟南芥中得到证实(Landry et al., 1997),缺乏CPD和6-4 PP修复能力的拟南芥突变体均表现出对UV-B辐射的高度敏感。

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)是由Ostling等首创,后经Singh等进一步完善并逐渐发展起来的一种快速检测单细胞DNA损伤的技术,具有简便、快速、灵敏、样品用量少、无需放射性标记等特点,已广泛应用于各种有核细胞理化因子诱导的DNA损伤和修复研究(李彦和谢明, 2003)。因其图像颇似彗星,又称彗星检测(comet assay)。有核细胞的DNA分子量很大, DNA超螺旋结构附着在核基质中。用琼脂糖凝胶将细胞包埋在载玻片上,在细胞裂

收稿日期: 2006-08-04; 接受日期: 2006-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30470283, 30370126, 30200030, 30670156)、教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2005]383号)和广东省教育厅自然科学基金项目(No.Z02018)。

* 通讯作者。E-mail: lishsh@scnu.edu.cn

† 共同第一作者。

解液作用下, 细胞膜、核膜及其它生物膜遭到破坏, 使细胞内的 RNA、蛋白质及其它成分进入凝胶, 继而扩散到裂解液中, 但核 DNA 仍留在原位。如果细胞核内的 DNA 未受损伤, 电泳过程中核 DNA 因其分子量大停留在核基质中, 荧光染色后显微观察呈现圆形的图像, 无拖尾现象。若细胞内核 DNA 受损, 在碱性电泳液(pH > 13)中, 先是 DNA 双链解螺旋且碱变性为单链, 单链断裂的碎片分子量小, 因此可进入凝胶中, 电泳时断链或碎片离开核区向阳极迁移, 形成拖尾。细胞 DNA 损伤愈严重, 产生的断链或碱易变性, 断片就愈多, 其断链或断片也就愈小。在电场作用下迁移的 DNA 量多, 迁移的距离长, 表现为尾长增加和尾部荧光强度增强。因此, 通过测定 DNA 迁移部分的光密度或迁移长度可定量测定单个细胞 DNA 损伤的程度。

运用单细胞凝胶电泳技术检测动物细胞 DNA 损伤的研究, 国际上已有一些报道(Mary et al., 2002; Richard and Scott, 2003), 但应用于植物细胞 DNA 损伤研究的尚不多见。本研究通过对动物细胞彗星检测方法的改进, 完善了植物单细胞凝胶电泳技术, 并利用此方法比较了九里香(*Murraya paniculata*)不同生长时期的组织经 UV-B 诱导后 DNA 损伤的敏感性差异。

1 材料与方法

1.1 材料

常绿植物九里香(*Murraya paniculata*)的幼嫩及成熟叶片均采自华南师范大学生物园。

1.2 紫外光源处理

九里香的若干幼嫩叶片及成熟叶片, 随机分为2组(每组中均包括幼嫩和成熟的叶片), 分别接受 UV-A 和 UV-B 的照射。紫外光源经过 Cellulose diacetate 滤膜(截止型长通滤光片, 292 nm 以下波段被滤除)获得 UV-B 光源, UV-B 辐射照度为 $0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ (IL1700, International Light, 美国), 培养室内的光合有效辐射(PAR, 400 - 700 nm)为 $76 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; 透过 Mylar film(截止型长通滤光片, 315 nm 以下波段被滤除)获得为 UV-A 光源作为对照。

1.3 原生质体的制备

叶片浸没于 500 μL 分离缓冲液(1.5% 纤维素酶, 1.5% 离析酶, $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, pH 5.8)中剪碎, 避光 27°C 保温 60 分钟。用移液器去除未酶解的较大组织块, 500 $\times g$ 离心 1 分钟, 弃上清液, 沉淀重悬浮于 500 μL STN 溶液($0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tricine, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.8)中即得原生质体悬液。

1.4 单细胞凝胶电泳

单细胞凝胶电泳的方法是在 Gichner 等(2004)基础上做了修改。普通载玻片垂直浸入溶化的 2% 正常溶点琼脂糖(NMPA)中, 取出后干燥过夜。50 μL 原生质体悬液, 和 50 μL 1% 低熔点琼脂糖(LMPA)(Sigma, 美国)于 37°C 混合并充分混匀, 滴加到预处理的载玻片上。于 4°C 水平静置 30 分钟后, 将载玻片放入裂解液($2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 10, 1% Triton X-100)中避光裂解 1 小时(4°C)。用蒸馏水冲洗玻片并放入 4°C 预冷的碱性电泳缓冲液($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH > 13), 浸泡 30 分钟使 DNA 变性解螺旋。

DNA 变性解螺旋后, 在 4°C 下电泳 10 分钟(19 V, 300 mA)。之后用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液(pH 7.5)中和 3 次后放入预冷的无水乙醇中 5 分钟。自然干燥后, 加 30 μL 按 1:10 000 稀释的荧光染料 SYBR Gold (Molecular Probe, 美国)染色 5 分钟, 在荧光显微镜(TE-2000U, Nikon, 日本)下观察拍照。每个处理组随机选取 30 个彗星图像, 用 CASP 软件进行定量分析(Krzysztof et al., 2003), 并以 OTM 值(olive tail moment)评价 DNA 的损伤程度(Sastre et al., 2001)。

2 结果与分析

图1为紫外光照射对九里香幼叶和成熟叶片细胞的 DNA 损伤影响的单细胞凝胶电泳图像。从图 1 可以看出, 未进行紫外辐射处理(0小时)的样品均无彗尾的产生, 表明叶片细胞内核 DNA 保持完好; 但随着紫外辐射剂量的增加, UV-A 和 UV-B 处理组中的彗尾均逐渐增大, 但两组

之间并没有观察到肉眼可见的显著差别, 而且成熟叶片与幼嫩叶片之间的差异也较难分辨。

经CASP软件分析, 用OTM值代表DNA的损伤指数, 结果见图2。UV-A和UV-B处理对九里香幼叶与成熟叶片都存在剂量效应关系, 即随着处理时间的增长, 叶片细胞内DNA损伤量增大。紫外辐射处理2小时和4小时测得各组之间的OTM值均无显著差异(表1); 但在辐射时间到达8小时时, 各个处理组间的OTM值差异极

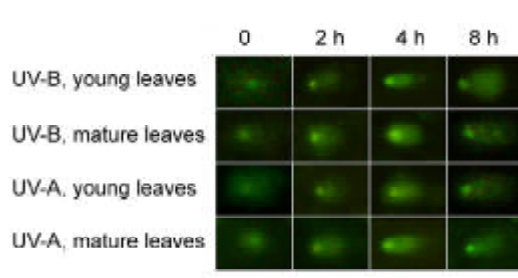


图1 紫外辐射对九里香叶片DNA损伤的单细胞凝胶电泳图像

Figure 1 Image of comet assay on the DNA damage induced by UV radiation in the mesophyll of *Murraya paniculata*

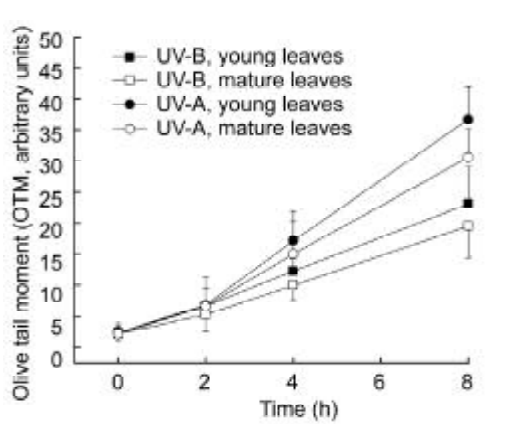


图2 紫外辐射剂量对九里香叶片细胞DNA损伤的影响

Figure 2 UV-induced DNA damage expressed in olive tail moment (OTM) in the mesophyll of *Murraya paniculata*. Samples were harvested after 0, 2, 4, and 8 h of UV-A or UV-B exposure. Data shown are means ($\pm$ SD) of 3 independent replications.

显著($P < 0.01$), 表明UV-B能强烈诱导九里香叶片细胞的DNA损伤。比较紫外辐射对九里香不同生长时期的叶片, 幼嫩叶片的DNA损伤量要比成熟叶片大(图2和表1)。由此可知, 幼嫩叶片对UV-B辐射的敏感性比成熟叶片强。

3 讨论

本实验表明, UV-B和UV-A均能诱导九里香叶片细胞DNA的损伤, 且相同处理时间下, UV-B比UV-A对细胞DNA的损伤量大。已有研究表明, UV-B和UV-A引起的DNA损伤机制不同, UV-B辐射诱导DNA损伤最为普遍的情况是直接诱导形成嘧啶二聚体(CPD)等光产物, 以及导致碱性不稳定位点的形成和DNA单链的断裂(Sinha and Häder, 2002); 而UV-A引起的DNA损伤为间接性的, 在细胞中激发产生一系列的自由基和活性氧, 这些物质均可有效地导致DNA的结构发生变化, 即UV-A诱导DNA单链断裂主要与细胞内源活性氧自由基水平的增加有关, UV-A可在一定剂量下诱导少量嘧啶二聚体的形成(Stary et al., 1997)。但与此同时, 植物细胞内具有相应的防御机制来降低活性氧等对DNA的损伤, 如超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶和过氧化物酶等是细胞内清除活性氧自由基的重要酶系。增强UV-B可明显提高SOD在拟南芥突变体中的活性(Rao, 1996)。Hernn等(2002)研究表明, UV-B辐射提高了向日葵(*Helianthus annuus*)中过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶、愈创木酚氧化酶的活性。

细胞DNA在受到损伤后, 在一定程度上其自身具有修复能力, CPD的修复所利用的光修复酶是在可见光或UV-A波段(330-450 nm)被激活的(Sinha and Häder, 2002)。在紫外辐射处理2小时中, 各实验处理组间DNA的损伤量均没有明显的差异, 可能是由于辐射的剂量没有达到引起大量DNA损伤的水平, 也可能是细胞内各种DNA修复机制的作用。但随着紫外辐射剂量的增加, DNA损伤量逐渐增大, 表明此时的DNA损伤水平要明显高于修复水平。从图2可看出, 在幼嫩叶片中紫外辐射造成的DNA损伤要比成熟叶片敏感, 并且紫外辐射

表 1 不同剂量的紫外辐射对九里香叶片细胞 DNA 损伤影响的统计分析

Table 1 Statistic analysis of the DNA damage induced by UV radiation in the mesophyll of *Murraya paniculata*

Time (h)	Comparison	Olive tail moment (OTM)	
		Mean difference	P-value
0	Young leaves vs mature leaves	0.25219	0.47916
2	UV-A, young leaves vs UV-A, mature leaves	0.31491	0.66995
	UV-B, young leaves vs UV-B, mature leaves	1.09728	0.41279
	UV-A, young leaves vs UV-B, young leaves	-2.10875	0.14463
	UV-A, mature leaves vs UV-B, mature leaves	-1.32638	0.01433
4	UV-A, young leaves vs UV-A, mature leaves	1.96044	0.01114
	UV-B, young leaves vs UV-B, mature leaves	1.53549	0.37851
	UV-A, young leaves vs UV-B, young leaves	-2.11026	0.02886
	UV-A, mature leaves vs UV-B, mature leaves	-2.53520	0.10967
8	UV-A, young leaves vs UV-A, mature leaves	3.38529	0.00842
	UV-B, young leaves vs UV-B, mature leaves	8.58622	< 0.01
	UV-A, young leaves vs UV-B, young leaves	-11.99952	< 0.01
	UV-A, mature leaves vs UV-B, mature leaves	-6.79859	0.00005

剂量与细胞的OTM值(损伤量)均呈近线性相关($R^2 > 0.9$), 表明紫外辐射与其诱导的叶肉细胞DNA损伤存在剂量 - 效应关系。

九里香不同生长时期的叶片细胞DNA对相同剂量下 UV-B 辐射表现出了不同的损伤程度: 幼嫩叶片的DNA损伤量比成熟叶片的大(图2), 即幼嫩叶片对UV-B诱导的DNA损伤的敏感性大于成熟叶片。从解剖结构上看, 成熟叶片已形成较厚的角质层和蜡质层, 与幼嫩的叶片相比呈高度革质化, 并且成熟叶片的厚度要比幼嫩叶片厚。而叶表皮上附着的蜡质和表皮毛的遮掩作用与植物对UV-B的敏感性具有一定的相关性。光学分析表明, 去掉表皮毛会导致较多的紫外线通过(Manetas, 2003)。有研究指出, 增强 UV-B 可使棉花上表皮的蜡质含量提高200%, 相同叶面积的大麦和蚕豆的蜡质含量分别提高 23% 和 28%。同时, 叶片增厚是植物减轻UV-B 伤害的一种适应性策略。在 UV-B 处理下, 曼陀罗属(*Daturaferox*)植物单位叶面积重量随UV-B强度的提高而增加, 反映在叶片增厚, 即在一定程度上增加了叶表皮与叶肉细胞之间的距离, 有助于减少 DNA 的损伤(Ballaré et al., 1996)。本研究利用改进的单细胞凝胶电泳技术检测紫外辐射诱导的植物细胞DNA损伤, 结果表明, 处于不同发育时期的植物组织对紫外辐射的敏感性不同, 幼嫩叶片比成熟叶片更易受到紫外辐射的损伤,

为进一步了解植物对增强的UV-B辐射的适应性机制奠定基础。

参考文献

李韶山, 刘颂豪 (1999). 高等植物 UV-B 效应研究进展. 激光生物学报 8, 234 - 237.

李彦, 谢明 (2003). 单细胞凝胶电泳技术操作方法介绍. 生物学通报 40, 52 - 53.

Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ (1996). Solar ultraviolet radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol* 112, 161 - 170.

Björn LO (1997). The effects of UV-B radiation on European heathland species. *Plant Ecol* 128, 252 - 264.

Britt AB (1996). DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 75 - 100.

Britt AB (1996). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci* 4, 20 - 25.

Gichner T, Patkov Z, Szkov J, Demnerov K (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat Res* 559, 49 - 57.

Hernn C, Susana MG, Mara LT (2002). Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Sci* 6, 939 - 945.

Kalbin G, Hidema J, Brosch M, Kumagai T, Bornman JF, Strid A (2001). UV-B-induced DNA damage and expression

of defence genes under UV-B stress: tissues-specific molecular marker analysis in leaves. *Plant Cell Environ* **24**, 983-990.

Krzysztof K, Anna L, Anna B, Halina L, Tomasz K, Stanislaw G, Zbigniew K, Andrzej W (2003). A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Muta Res* **534**, 15-20.

Landry LG, Stapleton AE, Lim J, Hoffman P, Hays JB, Walbot V, Last RL (1997). An Arabidopsis photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 328-332.

Li S, Paulsson M, Björn LO (2001). Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells. *J Photochem Photobiol B Biol* **66**, 67-72.

Li S, Wang Y, Björn LO (2004). Effects of temperature on UV-B-induced DNA damage and photorepair in *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Sci* **16**, 173-176.

Manetas Y (2003). The importance of being hairy: the adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytol* **3**, 503-508.

Mary MN, Janani S, Prabhu BK, Kumar PR, Jeevanram RK

(2002). DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Muta Res* **520**, 179-187.

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996). Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**, 125-136.

Richard FL, Scott S (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Muta Res* **544**, 43-54.

Rozema J, van Geel B, Björn LO (2002). Toward solving the UV puzzle. *Science* **296**, 1621-1622.

Sastre MP, Vernet M, Steinert S (2001). Single-cell gel/comet assay applied to the analysis of UV radiation-induced DNA damage in *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta). *Photochem Photobiol* **74**, 55-60.

Sinha RP, Häder D (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* **1**, 225-236.

Stary A, Robert C, Sarasin A (1997). Deleterious effects of ultraviolet-A radiation in human cells. *Muta Res* **383**, 1-8.

Tanaka A, Sakamoto A, Ishigaki Y, Nikaido O, Sun G, Hase Y, Shikazono N, Tano S, Watanabe H (2002). An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 64-71.

Sensitivity of Plant Leaves at Different Developmental Stages to UV-induced DNA Damage

Jing Wang^{1†}, Lei Jiang^{1†}, Yan Wang^{1, 2}, Shaoshan Li^{1*}

¹School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

²Department of Environmental Engineering, College of Sciences and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract Comet assay or single-cell gel electrophoresis is now widely used to detect DNA damage in cultured animal cells, but only a few reports describe the application of comet assay in plant cells. Here, the accepted animal cell protocol was modified to adapt it to plant cells and the sensitivity to UV-B induced DNA damage was investigated in young and mature leaves of *Murraya paniculata*. Both UV-A and UV-B irradiation induced DNA damage in mesophylls. The level of DNA damage was much higher in younger than mature leaves, which indicates that young leaves are more sensitive to UV-B radiation than mature leaves.

Key words comet assay, DNA damage, single cell gel electrophoresis (SCEG), UV-B radiation

Wang J, Jiang L, Wang Y, Li SS (2007). Sensitivity of plant leaves at different developmental stages to UV-induced DNA damage. *Chin Bull Bot* **24**, 189-193.

* Author for correspondence. E-mail: lishsh@scnu.edu.cn

† These authors contributed equally to this work.

(责任编辑: 白羽红)