

三丁基锡(TBT)对牡蛎细胞基因组 DNA 影响的 RAPD 分析

韩雅莉¹, 管云雁², 李兴暖²

(1. 广东工业大学 轻工化工学院生物工程系, 广东 广州 510000; 2. 汕头大学 理学院生物系, 广东 汕头 515063)

摘要:以僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)为材料, 取其鳃进行组织培养, 同时对其进行 7 个浓度 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200, 2 000 $\mu\text{g/L}$ 的三丁基锡(TBT)处理, 提取鳃细胞基因组 DNA。从 38 个随机引物中筛选出 4 个引物, 对上述 DNA 样品进行利用 RAPD-PCR 扩增分析。结果表明, TBT 处理的基因组 DNA 与对照组样品比较有一定差异, 扩增条带总数均有所减少, 随 TBT 处理浓度的不同, 条带缺失或者条带深浅变化呈明显差异性, 表明不同浓度 TBT 处理会对 DNA 造成不同程度的损伤。

关键词:僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*); 组织培养; RAPD; 三丁基锡(TBT)

中图分类号: X174

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)05-0029-04

僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)是我国沿海重要的养殖贝类之一, 近年来牡蛎养殖业发展迅速, 与其它海产经济养殖动物一样, 同样也面临着一些不明原因的生长缓慢, 患病率、死亡率显著增加的现象, 其中主要原因可能是由于病毒或细菌类病原体疾病引起的, 但也不容忽视海洋环境恶化, 海洋污染加剧病原菌的增殖等。近年来有机锡化合物(Organotin compounds)对海洋生物的影响越来越引起人们的广泛关注。大量调查资料表明环境中极低的有机锡含量(10^{-12}g/L)就会对生物产生严重的毒害作用^[1], 特别象牡蛎、螺类等底栖或固着生活的软体动物更易受到污染物的毒害, 一方面三丁基锡(Tributyltin, TBT)能干扰牡蛎机体的正常代谢活动, 如破坏其体内的钙代谢使其贝壳畸形加厚、致很多雌性螺类出现性畸变现象等^[2], 另外这类动物对有机锡类化合物有极强的富集能力, 如牡蛎组织对水体中 TBT 的富集量可达 50 000 倍^[3], 而多数贝类是我国人民喜食的海产食品, 因而有机锡污染物在软体动物体内的大量富集就意味着这类毒性物质可能通过食物链而传递给人类。

作者在对僧帽牡蛎进行组织培养的基础上, 以应用最广、毒性最大的三丁基锡(tributyltin, TBT)为污染物, 对培养细胞进行污染处理, 再利用 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 技术检测牡蛎基因组的遗传改变情况, 比较 TBT 处理组织与正常

组织 DNA 指纹, 寻找 TBT 对牡蛎细胞特异的遗传改变, 为进一步研究 TBT 对海洋生物的毒性效应提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用牡蛎购于南澳岛水产养殖场, 在实验室用人工海水(海水素配成)中充氧气暂养。TBTCl 为美国 Acros 公司产品, RPMI1640 培养基为日本制药株式会社产品, 随机引物, DNA 聚合酶(含 buffer 和 Mg^{2+}), dNTPs 均购自上海生工公司, 其余试剂则均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

参照崔龙波^[4,5]的方法, 以 RPMI 1640 为基本培养基, 添加 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 1.5% NaCl(质量分数为 35.1%) 溶液构成完全培养基, 取活体牡蛎的鳃和外套膜, 剪成 4~5 mm³ 小块, 用人工海水(2.5%~2.8% 的海水素)冲洗数遍, 浸入消毒液中(青霉素、链霉素双抗溶液)40~60 min, 再用

收稿日期: 2003-09-05; 修回日期: 2004-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(30271033); 广东省科技兴海重大项目(A200005F02)

作者简介: 韩雅莉(1959-), 女, 北京人, 教授, 研究方向: 环境生化与分子生物学, E-mail: ylhana@stu.edu.cn

D-Hanks 液冲洗 15 次左右, 将组织块剪成 1 mm^3 小块, 放入培养瓶中, 使其均匀分布, 于 27°C 5% CO_2 培养箱中贴壁培养 12~14 h, 然后加入 5 mL 培养基 (RPMI1640, 15% 胎牛血清, 100 U/mL 双抗溶液, 1.5% NaCl (质量分数为 35.1%))。27°C 恒温静置培养。实验分为 7 组, 其中 1 组为对照, 其余 6 组为 TBT 污染处理组, 在上述培养集中分别加入 0.02、0.2、2、20、200、2 000 $\mu\text{g/L}$ 。

1.3 DNA 的提取

参照卢圣栋的方法^[6]。在培养基溶液中加入 1.5% NaCl (质量分数为 35.1%)。

1.4 RAPD 反应

扩增反应的总体积为 25 μL , 其中包括 $10 \times$ RAPD 反应缓冲液 18 μL , 成分: ddH₂O 15.5 μL , MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL , $10 \times$ Buffer 2.5 μL , dNTP (均为 10 mmol/L) 0.5 μL , Primer 2.5 μL , DNA 1 μL , Taq 酶 (2U) 1.5 μL , Primer 2.5 μL , DNA 1 μL , Taq 酶 2U。

反应条件为: 94°C 预变性 3 min 后, 94°C 1 min, 37°C 1 min, 72°C 2 min, 40 个循环, 最后在 72°C 下延

伸 2 min。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳上分离检测, λ DNA、Hind III 作为分子量标记, EB 染色, UV-VP-凝胶成像扫描仪下观察并拍照。

2 结果

2.1 细胞培养情况

在牡蛎鳃原代细胞培养基中加入不同浓度的 TBTCl, 形成终浓度分别为 0.02、0.2、2、20、200 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 6 个处理组, 7 组细胞培养 5d, 在此期间每天进行观察, 实验结果表明随着 TBT 处理浓度的不断增大活细胞数量逐渐减少, 由原组织块中分生出来的细胞越来越少, 但仍有部分细胞存活。在镜检中还可以看到随 TBT 浓度增高细胞碎片不断增多。

2.2 RAPD-PCR 扩增情况

牡蛎鳃原代细胞培养 5 d 后, 对 6 个 TBT 浓度处理的细胞进行基因组 DNA 提取, 用 RAPD 检测, 共用了 38 个随机引物, 其中筛选出 4 个引物 (S124、S127、S119 和 S1 028), 可扩增出易分辨和重复性好的条带, 扩增片段分子量分布在 0.125~10 kb 之间 (图 1), 各引物扩增的情况见表 1。

表 1 4 种随机引物对 TBT 处理牡蛎鳃细胞基因组 DNA 的 RAPD 扩增情况

Tab. 1 RAPD bands of genomic DNA of oyster gill cell treated with TBT by 4 primers

引物	浓度 ($\mu\text{g/L}$)						
	0	0.02	0.2	2	20	200	2 000
S119 GTGACCAGCC	8	0	6	0	5	5	5
S124 GGTGATCAGG	9	8	-	6	5	6	6
S127 CCGATATCCC	12	11	9	9	9	9	10
S1 028 AAGCCCCCA	8	8	8	0	7	7	5

2.3 TBT 处理对基因组 DNA 的效应

依 RAPD-PCR 扩增结果可以看出, TBT 对基因组 DNA 有一定影响, 在 TBT 为 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 和 2 000 $\mu\text{g/L}$ 6 个处理浓度下, 随着处理浓度的加大扩增条带数呈递减趋势 (图 1, 表 1), 例如 S119 在对照组可以扩增出 8 条带, 而在 TBT 0.02~2 mg/L 处理浓度下仅可以扩增出 5~6 条带, S127 在对照组扩增出 12 条带, 而 TBT 处理各组则扩增出 9~10 条带, S1028 在对照组扩增出 8 条带, 随着处理浓度的增加扩增条带数递减为 8→7→5, TBT 浓度为 2 000 $\mu\text{g/L}$

后仅扩增出 5 条带; 另外随着 TBT 浓度的增大, 扩增条带数相似的各组, 呈现出条带明暗程度递减的趋势 (图 1), 如引物 S1 028 在较高处理浓度下 (20, 200, 2 000 $\mu\text{g/L}$) 很多带已经模糊不易分辨。

3 讨论

在众多的分子标记中 (如 RFLP、STR、SSCP、AFLP 和 RAPD 等), RAPD 以其操作简便、快捷、费用低、分子识别率高、环境污染小, 以及无需目标序列的有关信息和无种属特异性等优点, 备受众多研究者的青睐。但是人们也发现 RAPD 检测技术存在着重复性差

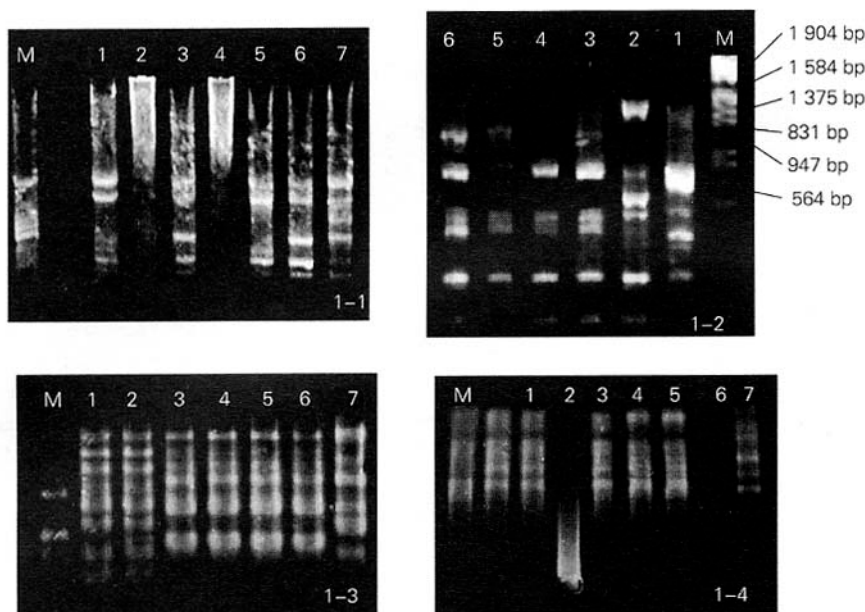


图 1 4 种引物对 TBT 处理牡蛎鳃细胞基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Amplified results of oyster gill cell genomic DNA treated with TBT by 4 primers.

1-1. S119; 1-2. S124; 1-3. S127; 1-4. S1028

M. Marker; 1. control; 2. 0.02 $\mu\text{g/L}$; 3. 0.2 $\mu\text{g/L}$; 4. 2 $\mu\text{g/L}$; 5. 20 $\mu\text{g/L}$; 6. 200 $\mu\text{g/L}$; 7. 2 000 $\mu\text{g/L}$

的不足,作者经过反复摸索发现,在严格控制各个实验环节的情况下,可以达到稳定、可重复的实验结果,包括使用 Taq 酶应为同一厂家和同一批产品;DNA 模板的纯化应达到较高纯度,加样过程最好在超净工作台进行,避免外源性菌进入样品,所用扩增小管和 tip 头均为一次性为好等。

RAPD 所用的一系列引物 DNA 序列各不相同,但对任一特定的引物,它同基因组 DNA 序列都有其特定的结合位点,如果这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布符合 PCR 扩增的反应条件,就可扩增出 DNA 片段,如果基因组在这些区域发生 DNA 插入、缺失或碱基突变就可导致这些特定结合位点分布发生相应的变化,而使 PCR 产物增加、缺失或在分子水平上发生变化。因此,扩增出的分子量相同的带,可以反映了细胞核 DNA 的共有特征,而扩增出大小和数量相异的带则是基因组 DNA 序列发生变异的标志之一。

作者对 TBT 污染处理的牡蛎鳃细胞 DNA 进行 RAPD 扩增后,主要出现了 3 种情况,第一,4 种引物在处理组和对照组之间出现 2~3 条差异性片段;第二,各处理组和对照组之间可以扩增出某些相同的条

带,但条带荧光强度有所差异;第三,各个浓度处理组之间的差异没有显现出明显的规律性。作者认为本文中对照组和实验组出现的差异片段,很可能是基因组 DNA 上的引物互补位点发生了插入、缺失或点突变等,导致互补位点减少或增加,由此会影响基因组 DNA 的结构、功能和基因的表达。但是由于 TBT 对基因组 DNA 的影响是随机的、非定向的,因此很可能某一个浓度组的基因组 DNA 上某个位点发生改变,而另一个浓度组的相应位点上则没有发生变化。条带深浅的变化可能是多拷贝引物结合位点上某些位置碱基发生突变,使引物结合量减少,造成扩增出的 DNA 量减少,或者是出现的新扩增片段与原有某条片段具有相近的分子量,从而在电泳后出现谱带加深。

作者用同一特定引物对不同 TBT 处理浓度下 DNA 扩增所出现条带数量的差异,即扩增条带均随处理浓度的增大而呈递减趋势的现象。作者认为这表明了 TBT 对基因组 DNA 造成了一定影响,即处理组基因组 DNA 与对照组基因组 DNA 有一定差异,但是否依据扩增条带数量多少可以定量分析 TBT 对基因组 DNA 的影响程度,尚待进一步研究加以证实。

目前,对于 TBT 处理的分子机理没有很明确的定

论, 采用 RAPD 技术筛选随机引物, 然后经过 PCR 扩增得到的产物, 再进行电泳分离, 就可以在图谱上看到差异片段, 这只是进行了 TBT 对细胞毒性分子检测的一个尝试, 进一步证实有待于下一步的深入工作。

参考文献:

- [1] 全 燮, 陈 硕, 薛大明, 等. 海洋环境中有机锡分析方法研究进展 [J]. 海洋环境科学, 1996, 15(2): 62 - 69.
- [2] 周名江, 李正炎, 颜 天, 等. 海洋环境的有机锡及其对海洋生物的影响[J]. 环境科学进展, 1994, 2(4): 67 - 76.
- [3] 施华宏, 黄长江. 有机锡污染与海产腹足类性畸变[J]. 生态学报, 2001, 21(10): 1711 - 1717. C[4] 崔龙波, 李睿坤. 大连湾牡蛎的组织培养 [J]. 海洋通报, 2001, 20(2): 30 - 34.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996. 40 - 88.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 95.

Study on the effects of TBT on genome DNA of oyster (*Saccostrea cucullata*) by RAPD

HAN Ya - li¹, GUAN Yun - yan², LI Xing - nuan²

(1. Guangdong University of Technology, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

Received: Sep., 5, 2003

Key words: *Saccostrea cucullata*; tissue culture; RAPD; TBT

Abstract: The effects of Tributyltin on genomic DNA of oyster (*Saccostrea cucullata*) gill cell that was cultured and treated by 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 and 2 000 $\mu\text{g/L}$ concentration of TBT was studied by RAPD-PCR method. The genomic DNA of the gill cell was extracted and 4 primers was chosen among 38 primers. Results showed that amplified products have some difference between control (from normal individual cells) and groups treated by TBT. The bands of DNA had decreased with increasing concentration of TBT. The results suggested that TBT would destroy genome DNA of oyster cell in different level.

(本文编辑: 张培新)