

中文摘要

持久性有机污染物（简称 POPs），被认为是 21 世纪影响人类生存与健康的重要环境问题。由于持久性有机污染物在全球普遍存在，具有生物累积性、难以降解、可远距离传输、致癌致突变性和内分泌干扰等特性，它们所引起的环境与健康问题已经引起国际环境保护组织、各国政府和民众的高度关注。硫丹为有机氯杀虫剂，具有触杀和胃毒作用，杀虫谱广，广泛用于棉花、果树、蔬菜、茶叶等作物上，我国已大面积使用。20 世纪 90 年代以后，越来越多的国家认识到了硫丹广泛使用的危害性，许多国家开始禁用或严格限制使用。作为一种即将被列入 POPs 名单的污染物，硫丹对人体健康和生态环境的潜在影响问题在国内外备受关注，研究其生态毒性非常重要。鉴于土壤微生物、动物、植物在生态系统中的重要性，本研究利用分子生物学技术，采用微核实验、彗星试验和变性梯度凝胶电泳实验，研究了硫丹对蚕豆、白三叶草、蚯蚓和土壤微生物的毒性效应，评价了硫丹对生物 DNA 的损伤作用和土壤微生物群落多样性的影响，对于了解和认识硫丹对生态系统的影响以及为建立快速、有效、实用的生物监控和测试技术具有重要意义。主要研究结果如下：

1. 为了探明硫丹对蚕豆的遗传损伤作用，采用毒理学实验方法，研究了 0.1、1.0、10.0 mg/L 浓度的硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂、染色体畸变和微核的影响。研究结果表明，硫丹抑制蚕豆根尖细胞的有丝分裂。经硫丹处理后，蚕豆根尖细胞有丝分裂指数则逐渐降低，降低的程度随硫丹的浓度和染毒时间的增加而增强。随着硫丹的浓度和染毒时间的增加，蚕豆根尖细胞的染色体畸变率和微核率不断提高。有丝分裂指数与染色体畸变和微核率都呈负相关，染色体畸变率与微核率呈正相关，并具有明显的剂量-效应关系。在本试验条件下硫丹达到一定剂量浓度会对蚕豆根尖细胞造成 DNA 损伤，具有明显的遗传毒性。

2. 单细胞凝胶电泳实验（彗星试验）是一种快速、简单、直接的 DNA 损伤研究手段，能广泛应用于多种组织来快速检测环境基因毒性物质。本文通过彗星试验测定了硫丹对蚯蚓体腔细胞和白三叶草叶片细胞 DNA 的损伤作用。试验结果显示，在设定的四个检测时间（7d、14d、21d、28d），经不同浓度硫丹处理，蚯蚓体腔细胞和白三叶草叶片细胞 DNA 均有损伤，而且随着浓度的增加和时间的延长，彗星拖尾长度、Olive 尾矩的值均有上升的趋势，这说明 DNA 损伤程度与硫丹的浓度和处理时间均有效应关系。表明硫丹对蚯蚓和白三叶草造成了基因损伤。

本研究首次利用广泛分布的白三叶草作为受试生物材料，进行污染物的彗星试验检测试验。通过实验发现，和对照处理相比，经过硫丹处理后白三叶草叶片细胞能够通过彗星试验检测 DNA 损伤，而且随硫丹处理浓度的增加和暴露染毒时间的延长，细胞核产生的伤害程度也随之增加，具有较高的灵敏性。表明白三叶草叶片能应用于植物彗星实验，研究环境污染对植物 DNA 的损伤。

3. 采用三种不同方法，分别对土壤微生物总 DNA 进行提取效果的比较，结果发现运用化学试剂和酶结合的策略能够获得高质量、高产量的基因组 DNA，较其他方法具有明显的优势和效果，并且获得的产物经纯化后更适用于随后的分子生物学实验。

4. 采用扩增细菌 16Sr DNA V3 区的通用引物，通过改变扩增反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTP、引物的条件，并采用 Nest-PCR 方法，优化了含有“GC”结构引物的 PCR 扩增方法，获得了较好的扩增产物，使得 DGGE 电泳图谱条带更清晰，可分辨的条带数量也更多。

5. 利用 DGGE 指纹分析技术研究了硫丹对土壤微生物群落多样性的影响。通过对不同培养时间（7d、14d、21d、28d）、不同浓度（0.1、1.0、10.0 mg/kg）硫丹污染下土壤微生物 DNA 进行 DGGE 多样性的分子指纹图谱分析，发现随着培养时间不同，各处理之间的土壤微生物群落多样性出现了一定的差异。在硫丹作用下，土样中一些细菌种群的生长受到抑制，随着硫丹或作用时间的提高或延长，其相关条带由深变浅，甚至消失。而另一些细菌种群的得到富集，其条带由无到有。在整个试验过程中，随着硫丹浓度的升高，与对照相比各泳道条带间的 Jaccard 指数相似性相应降低，在一定浓度和作用时间范围内，硫丹对土壤细菌种群的改变的影响存在剂量-效应关系。表明硫丹对土壤微生物群落结构有着明显的影响。

关键词： 硫丹； 蚕豆； 蚯蚓； 白三叶草； 土壤微生物； 微核试验； 彗星试验；
DGGE 试验

Abstract

Persistent organic pollutants (POPs) are a family of organic pollutants that are persistent, bioaccumulative and easily cause adverse effects on human and organisms. POPs have been the concern of all over the world. They present immunotoxicity, endocrinotoxicity, reproductive and developmental toxicity, carcinogenesis and so on. The ecotoxicity studies on POPs should be strengthened. Endosulfan is one of the most commonly used organochlorine insecticides. It is being extensively used in crops field due to its broad spectrum of activity and relatively low cost. As a result of its widespread use, endosulfan has been ubiquitously detected in atmosphere, soils, sediments, surface water, rainwaters and foodstuffs. Taking into account the magnitude of use, environmental levels and human and ecological effects of this compound, many countries have recognized the hazards of wide application of this pesticide. Today, Endosulfan has been banned or severely restricted in over 30 countries, but it continues to be widely used in some developing countries like China and Thailand. Studies concerning effects of endosulfan on soil organisms are needed in order to evaluate its toxicity. The aim of the present study was to assess the genotoxic effects of endosulfan in *Vicia faba*, earthworm (*Eisenia foetida*), white clover (*Trifolium repens* L.) and soil microorganism. From molecule level, DNA damage and effects on soil microbial diversity induced by endosulfan were evaluated. Our objective was to get a more comprehensive understanding on the effects of endosulfan and provide more information about the potential ecological risk of this pesticide on the soil ecosystem.

The main results are showed as follows:

1. *Vicia*-micronucleus test is applied in most fields, as a detecting means. In order to prove up the influence of endosulfan towards *Vicia faba*, cell mitosis, chromosomal aberrations and micronucleus were researched. The results showed that when seeds were treated with different endosulfan concentrations, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/L, the cell mitosis of seeds were inhibited. With the increasing of endosulfan concentration and poisoned time, the inhibited effect were both enhanced. With the increasing of endosulfan concentration and poisoned time, the frequency of the chromosomal aberration and micronucleus rate increased. There were significant influences on the chromosomal aberrations and micronucleus of seeds treated with

endosulfan, which effects were relative to endosulfan concentration and poisoned time. It was very clear that this pesticide with a certain concentration had effects on cytogenetical toxicity of *Vicia faba* root tip cells.

2. The comet assay has been widely used in the fields of genetic toxicology and environmental biomonitoring, which was a new tool for genotoxicity study. In the present study, earthworms were exposed with endosulfan concentrations of 0.1, 1.0 and 10.0 mg/kg in the soil. The white clover roots were immersed in hydroponic pots containing nutrient solutions of different endosulfan concentrations, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/L. Tissues of each treatment were collected on the 7th, 14th, 21st and 28th days of treatment process. Significant effects from both concentrations and time of exposure were observed. Under our experimental conditions, the induction of DNA damage in *Eisenia foetida* and *T.repens* specimens appeared to be dose-dependent throughout the exposure period. And endosulfan induced DNA damage on earthworm and white clover nuclei.

In this research, the potential for DNA damage, as measured by the Comet assay, to act as a biomarker of genetic toxicity in white clover plants was considered. A significant increase of DNA migration was observed on the nuclei obtained from *T.repens* leaves. During the exposure period, DNA damage increased as the exposure concentrations of the pesticide increased and DNA migration showed a dose-response relationship. The *T.repens* comet assay is as sensitive as the comet assay using earthworm cells which could be used in genotoxicity study of environmental pollutants. To our knowledge, this is the first report describing the use of *T.repens* for genotoxicity assessment of environmental pollutants using the comet assay. Based on experimental evidence obtained, we can suggest that DNA damage of leaf cells of *T.repens* may potentially be used as a bioindicator for detecting genotoxicants in ecosystem.

3. In our study, three soil DNA extraction methods which based on different lytic principles for isolation of the total farmland microbial DNA were compared. The results showed that the chemica-enzymatic method was better than other methods. The chemica-enzymatic method could obtain the best DNA with the highest molecular weight and purity, which was more propitious to molecular ecologystudy.

4. The PCR method ,as there are “GC clamp” with the primer,was optimeized through the change of Mg²⁺、dNTP、primers. Primer, The traditional PCR and Nest-PCR strategy were

compared. The result showed that with the Nest-PCR strategy, the aim gene fragment was best amplified. It was more suitable for DGGE study.

5. DGGE method was applied to analyse the relative genetic complexity of microbial communities in soil treated with different endosulfan concentrations, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/kg. The target gene was separated by DGGE, and the cluster analysis was carried. From the result we can see that there were abundant bacterial communities at the different treated soil. The result showed that there were a certain differences in bacterial communities diversity in soil treated with different concentrations of endosulfan. The results showed that many bacteria were inhibited in soil treated with endosulfan. The Jacarrd indexes among the different samples and control were reduced throughout the exposure period. With the increasing of endosulfan concentration and poisoned time, some bands had been changed. It means that the mutual benefit communities were developed and others were restrained or disappeared. From the result we also can get the conclusion that DNA sequence of soil microorganism was affected by endosulfan.

Keywords: endosulfan; *Vicia faba*; earthworm; white clover; soil microorganism; micronucleus test; comet assay; DGGE method

缩略词表

| | | |
|------------------|---|---------------|
| POPs | Persistent Organic Pollutants | 持久性有机污染物 |
| POPRC | Persistent Organic Pollutants Review Committee | 持久性有机污染物审查委员会 |
| OECD | Organization of Economy and Cooperation Development | 联合国经济合作与发展组织 |
| WHO | World Health Organization | 世界卫生组织 |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations | 联合国粮农组织 |
| ADI | Acceptable daily intake | 日允许摄入量 |
| LC ₅₀ | Lethal concentration for 50% | 致死中浓度 |
| DGGE | Denaturing gradient gel electrophoresis | 变性梯度凝胶电泳 |
| TGGE | Thermal gradient gel electrophoresis | 温度梯度凝胶电泳 |
| SSCP | Single strand conformation polymorphism | 单链构象多态性 |
| SCGE | Single Cell Gel Electrophoresis | 单细胞凝胶电泳 |
| MN | Micronucleus | 微核 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid | 乙二胺四乙酸 |
| SD | Standard deviation | 标准偏差 |
| OTM | Olive Tail Moment | Olive 尾距 |
| CTAB | Cetyltrimethyl Ammonium Bromide | 十六烷基三甲基溴化铵 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| EB | Ethidium Bromide | 溴化乙锭 |
| TEMED | etramethylethylenediamine | 1,2-双(二甲氨基)乙烷 |

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解山东农业大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权山东农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名： 刘伟

导师签名： 朱鲁生

日期： 2009.6.12

第一章 前言

1. 持久性有机污染物的危害

持久性有机污染物(Persistent Organic Pollutants)简称 POPs, 是一类半挥发性有毒物, 具有较低的水溶性和较高的脂溶性, 可通过各种环境介质(大气、水、生物体等)长距离迁移, 最终影响人体健康和世界环境的天然或人工的有机污染物。其具有持久性、远距离输送性和生物蓄积性三个特点。

持久性是指在环境中对于正常的生物降解、光解和化学分解作用有较强抵抗能力, 因此它们一旦排到环境中, 可以在大气、水体、土壤和底泥等环境中存留数年甚至数十年或更长的时间 (Carrera et al., 2001; Van et al., 2001; Tittlemier et al., 2002)。例如, 2, 3, 7, 8-四氯代二苯并二噁英(2, 3, 7, 8-TCDD)在土壤中的半衰期一般为 10 年, 在底泥的半衰期为 9.9~98 年; 其同系物 2, 3, 7, 8-TCDF 同样具有很强的滞留性, 且在底泥中的半衰期长达 61 年之久(Geyer et al., 2000)。

远距离传输性是指 POPs 具有半挥发性, 它们易于从土壤、生物体和水中挥发到大气中并以蒸汽形式存在或吸附在大气颗粒物上, 又由于它们在气相中很难发生降解反应, 所以会在大气环境中不断地挥发、沉降、再挥发, 进行远距离迁移后而沉积。目前, 已在全球范围内检测出 POPs 的存在, 包括极地地区(孟阳等, 2008)。Weber 和 Goerke(1996)研究发现北极各类鱼体内的 pp-DDE 呈显著增加趋势。Skaare(2002)研究了北极熊体内的(多氯联苯)PCBs 含量, 在 21~228 ng/g(平均值为 67 ng/g), 严重影响到北极熊的数量和健康。卢冰等(2005)通过测定北极海洋沉积物中 POPs 的含量, 并对其分布特征和分子地层学记录进行了研究。远距离传输性特性使 POPs 影响到全球范围, 表现出所谓的“全球蒸馏效应”。

生物蓄积性是指 POPs 是亲脂疏水性物质, 它们易于进入生物体的脂肪组织, 并且积累的浓度会随着食物链的延长而升高, 即生物放大作用。研究发现生物放大作用可使最高级的捕食者体内的 POPs 浓度比环境中的浓度高很多个数量级。孟阳等(2008)报道通过食物链的传递与浓缩, 污染物得到了不同程度的富集, 其中生活在水体中的鱼类对有机污染物有很强的富集能力达到 1121 倍。正是由于 POPs 具有这些高毒性、持久性、长距离传输性和生物积累性的特点, 使其成为当今最主要关注的污染物质。

2. 审议把硫丹列入《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》的提案

为了减少 POPs 对全球的影响, 2001 年 114 个国家和地区共同签署了《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》(简称 POPs 公约), 旨在减少或消除持久性有机污染物的排放, 以保护人类健康和生态环境免受其危害。首批被《斯德哥尔摩公约》列入控制名单的 POPs 有 12 种(类), 其中有机氯杀虫剂类有 8 种: 滴滴涕、氯丹、灭蚁灵、艾氏剂、狄氏剂、异狄氏剂、七氯、毒杀酚; 工业化学品 2 种: 六氯苯和多氯联苯; 工业生产或燃烧过程无意产生的副产品 2 种: 二噁英(多氯二苯并-p-二噁英)、呋喃(多氯二苯并呋喃)。

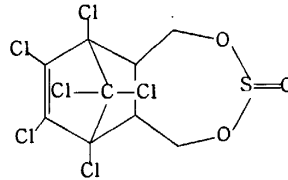
根据《斯德哥尔摩公约》第 8 条规定, 任一缔约方均可向秘书处提交旨在将某一化学品列入公约的提案, 只要信息基本符合公约要求, 秘书处将转交持久性有机污染物审查委员会(简称 POPRC), 由其依据公约的规定, 分阶段对增列问题进行审议。通过审议后, 缔约方大会决定是否将该化学品列入 POPs 进行控制。

自 2005 年 POPRC 已经召开了三次会议, 共审议了包括硫丹在内的 10 种化学品。2008 年 10 月又召开第四次会议, 进一步审议包括硫丹在内的 8 种物质列入 POPs 的问题。根据审议的进展和结果, 硫丹很快会被列入 POPs 进行控制。

3. 硫丹研究概括

3.1 硫丹结构和理化性质

硫丹又称赛丹、硕丹、安杀丹、安都杀芬, 化学名为 1,2,3,4,7,7-六氯双环(2,2,1)庚-2-烯-5,6-双羟甲基亚硫酸酯, 分子式为 $C_9H_6Cl_6O_3S$, 分子量为 406.9, 化学结构式如下:



硫丹原药在常温常压下为固体, 纯品是白色晶体, 具有二氧化硫气味, 蒸气压 1.2Pa, 熔点为 106℃; 不溶于水, 溶于二甲苯、氯仿、丙酮等有机溶剂; 在碱性质中不稳定, 并缓慢水解为二醇和二氧化硫; 对日光稳定。农业生产中用的硫丹有 2 种形式: α -硫丹、 β -硫丹。

3.2 硫丹使用和残留限量

硫丹最早由德国 FarbwerkHoechst 公司 1954 年研制开发, 为有机氯杀虫剂, 具有触杀和胃毒作用, 杀虫谱广, 广泛用于棉花、果树、蔬菜、茶叶等作物上, 我国已大面积使用, 据统计, 我国硫丹的使用始于 1994 年, 到 2004 年 11 年间, 估计使用量为 25700t。

WHO 估测 1984 年全世界的硫丹产量为 10,000 t (ASTDR, 2000), 其在包括美国在内的美洲、欧洲和中国在内的亚洲都使用过。

美国、日本、欧盟等国家十分重视农药残留对人类健康的影响, 各国对硫丹的使用情况都做了严格规定。2005 年 12 月欧盟立法禁止使用硫丹; 2006 年 5 月, 日本为了加强食品中农业化学品残留的管理, 开始执行“肯定列表制度”, 规定水产品中硫丹的最大残留限量(MRLs)为 0.004 mg/kg; WHO 和 FAO 规定硫丹的每天允许摄入量(ADI)为 0.006 mg/kg。中国《食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2005)规定, 硫丹在农产品中的最大残留限量为 0.5~1.0 mg/kg, 而在水产品中的残留限量未做出具体规定。

3.3 硫丹在环境介质中迁移转化

环境介质中的硫丹可能有两个来源: 首先是农业生产中大量使用的硫丹, 其次是硫丹生产场废弃物的排放。农业生产中以雾剂形式喷洒于植物体表面的硫丹, 有一部分挥发进入大气, 通过大气运动进行长距离输送。黏附在农作物上和废弃物中的硫丹在雨水冲刷、淋溶及地表径流的作用下, 被转运至土壤和水中。在环境中, 硫丹可以形成硫丹硫酸盐和硫丹二醇, β -硫丹比 α -硫丹具有更长的持久性; 硫丹硫酸盐的毒性与硫丹相当, 并且在环境中的持久性更长(Anon, 1984)。

在水中, 硫丹主要降解为硫丹二醇。硫丹在水中的半衰期大约为 4d, 但在厌氧和低 pH 的环境中半衰期会延长。硫丹在土壤中的半衰期从 60d (α -硫丹) 到 800d (β -硫丹) 不等 (Romeo and Quijano, 2000)。

3.4 硫丹毒理效应研究

目前国内外学者对硫丹毒理效应及其作用机制做了一些研究。

硫丹对动物中枢神经系统、免疫系统、生殖系统及脑、肝、肾等器官有损害, 人体吸入、摄入或经皮肤吸收后会引起中毒, 主要危害是过度接触导致的急性中毒。硫丹对大鼠的急性经口 LD_{50} 为 80~110mg/kg, 其中 α 异构体为 76mg/kg, β 异构体为 240mg/kg, 对家兔的急性经皮 LD_{50} 为 359mg/kg (朱鲁生等, 1996)。

Singh 等 (1995) 报道雄性大鼠急性或亚慢性接触硫丹都可出现生殖毒性, 表现为血清促性腺激素水平的变化。朱心强等 (2002) 研究表明大鼠长期大剂量接触硫丹能引起精子生成减少, 异常精子比例增多, 并能引起肝脏和睾丸组织脂质过氧化和 DNA 氧化损伤。杨新玲等 (2004) 研究表明硫丹主要损害的是小鼠脑内的多巴胺 (DA) 能系统, 对体外培养的 DA 能细胞(PC₁₂ 细胞)的增殖有毒性作用, 其机制可能与细胞凋亡有

关。Cabaleiro 等 (2008) 报道硫丹影响雄鼠前额叶皮层生物胺和氨基酸的含量和代谢, 导致雄鼠神经器官相关功能受到影响。

硫丹对水生生物具有较强的急性毒性。已有研究显示, 硫丹对淡水鱼类和海水鱼类 96 h 的 LC_{50} 范围分别为 0.17~4.4 $\mu\text{g/L}$ 和 0.09~3.45 $\mu\text{g/L}$ 。对水生甲壳动物的半数致死浓度 (LC_{50}) 有差异。大型蚤 (*Daphnia magna*) 幼体 48 h 的 LC_{50} 为 950 $\mu\text{g/L}$, 桃红对虾 (*Penaeus duorarum*)、马氏沼虾 (*Macrobrachium malcolmsonii*) 96 h 的 LC_{50} 分别为 0.004 $\mu\text{g/L}$ 和 0.16 $\mu\text{g/L}$ (胡国成等, 2007)。Chuah 等 (2007) 研究了硫丹对水蚤 (*Moina macrocopa*) 繁殖能力的影响, 结果表明水体中硫丹浓度为 0.0004mg/L 时, 染毒 15d, 水蚤产卵率减少了 70%; 当硫丹浓度达到 0.002 mg/L 时, 水蚤产卵率竟减少了 97%。Ilaria 等 (2008) 进行了硫丹对蟾蜍 (*Bufo bufo*) 急性毒理试验研究, 48 h 的 LC_{50} 为 0.043mg/L。通过扫描电镜观察到蟾蜍暴露硫丹 24h 后, 其分泌腺囊泡组织形态已经发生改变, 导致腮部呼吸和渗透调节功能减弱。Sanjay 等 (2006) 采用彗星实验研究了硫丹对鲈鱼 (*Channa punctatus*) 的毒理效应, 结果表明腮组织细胞和肾组织细胞 DNA 均受到损伤, 并有明显的剂量效应关系。

硫丹对蛋白质代谢的影响主要表现在诱导或抑制不同功能的酶类。由于硫丹及其代谢产物与生物体内的酶分子产生非共价性结合, 从而导致酶活性降低。硫丹对大型蚤 (*Daphnia magna*) 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽超氧化物酶的活性有显著影响, 而对过氧化氢酶的活性没有显著影响 (胡国成等, 2007)。硫丹对鱼类头肾细胞的吞噬作用有显著影响。当硫丹质量分数高于 10mg/kg 时, 可抑制弗氏虹银汉鱼 (*Melanotaenia fredericki*) 头肾细胞的吞噬作用, 诱导圆尾麦氏鲈 (*Macquaria ambigua*) 和虫纹鳕 (*Murray cod*) 头肾细胞的吞噬作用, 硫丹还可以调节这 3 种鱼粒细胞的活性 (Harford et al., 2005)。Soto 等 (1994) 报道硫丹在人乳腺癌 MCF-7 细胞体外增殖试验中具有雌激素活性, 并经不同的实验室证实。2002 年亚洲和环太平洋农药行动网站报道在印度喀拉拉邦的卡塞略达地区 Padre 村, 由于长期大量喷施硫丹防治腰果种植园的害虫, 导致居住在种植园附近的 400 个家庭中的 156 人患有包括癌症、癫痫症、中枢神经紊乱和先天性畸形等严重疾病。

史雅娟 (2005) 探讨了硫丹在人工土壤环境条件下对赤子爱胜蚓 (*Eisenia Foetida*) 的毒性影响研究, 结果表明硫丹对赤子爱胜蚓 7d、14d 的 LC_{50} 分别为 69.08mg/kg 和 31.95mg/kg; 硫丹浓度为 25mg/kg 处理 14d 的生长抑制率达到 88.03%, 说明硫丹对蚯蚓的生长具有严重抑制作用; 硫丹对蚯蚓的繁殖能力有明显的抑制作用, 各个浓度处理组中蚯

蚓幼虫的数目都远远少于空白对照中的蚯蚓数目。硫丹对土壤原生动物的影响实验表明, 硫丹处理使得鞭毛虫、纤毛虫和肉足虫种群密度减少, 存在显著的剂量效应关系, 研究表明硫丹对土壤动物的生态效应造成了严重影响。De'bora 等 (2008) 研究了硫丹对鬼针草的毒理效应, 结果表明硫丹干扰了鬼针草根尖细胞分裂过程中纺锤体的正常迁移, 造成细胞染色体发生畸变, 随着硫丹浓度的增大, 染色体畸变率越高。

4. 常用的生态毒理学研究方法

4.1 蚕豆微核实验

微核实验创建于 20 世纪 70 年代初, 首先由 Countryman 和 Schmid (1976) 利用啮齿类骨髓细胞建立了微核测定方法。经 30 多年的发展, 许多国家和国际组织已将其规定为新药、食品添加剂、农药、化妆品、环境化学物质等毒理安全性评价必做的实验。由于蚕豆是一种很好的细胞遗传学研究材料。蚕豆的染色体组型为六对相当大的染色体, 而且根尖含有较多的分裂相细胞, 生长速度快, 其根尖的分生组织细胞周期在适宜条件下仅 20h 左右, 而且大部分时间处于对诱变剂敏感的间期, 非常适合显微观察。蚕豆与小鼠在分类上属于同一个层次, 蚕豆细胞染色体的损伤可以在一定程度上反映同样暴露条件下高等动物遗传物质的损伤 (Reed, 1959; 陈光荣等, 1983)。自 1982 年由 Degrassi 和 Rizzoni 建立蚕豆根尖细胞微核技术以来其深受人们的重视, 蚕豆根尖微核试验具有准确、快速、有明显的剂量一效应关系等特点, 操作更简便, 也更适于大批量样品的检测。此试验原理是蚕豆根尖在分裂时, 染色体要进行复制, 在复制过程中常发生断裂, 断裂下来的片断在正常情况下能复位愈合, 这样细胞可以维持正常生活。如果在细胞分裂时受到外界诱变因子的作用, 不仅会阻碍染色体片断的愈合, 而且有随着诱变因子作用断裂程度加重的趋势, 于是在细胞分裂中会出现一些染色体片断, 这些片断由于不具着丝点而不受纺锤丝牵动, 游离在细胞质中。当新的细胞核形成时, 这些片断就独自形成大小不等的小核, 这种小核就是微核。由于产生的微核数与外界诱变因子的强弱成正比, 所以可以用微核出现的百分率来评价环境因子对生物遗传物质影响的程度。1986 年中国国家环保局将该技术检测水污染的测试方法编入《环境监测技术规范》以用于水环境监测。美国国家环保局也肯定了蚕豆根尖细胞学试验在环境突变性检测中的作用, 对许多环境致癌物都作了标准化的试验, 建立了庞大的数据库, 并建议在全世界范围内推广; 其又被国际诱变剂、致癌剂防护委员会推荐为检查致癌剂、诱变剂常用的遗传毒理方法之一。

4.2 单细胞凝胶电泳实验

单细胞凝胶电泳实验(single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星实验(Comet Assay), 是近年来发展起来的一种快速、敏感、简便的测定和研究细胞 DNA 损伤的新技术。经过不断改进和完善, 用该方法检验的基因损伤已成为鉴别遗传毒性物质的灵敏标志物, 广泛应用于毒理学、生物学、医学、环境生物监测等领域(Mitchelmore et al., 1998; Lee et al., 1999; Steinert, 1999)。

二十世纪七十年代, Peter Cook 等(1976)制定了一种用非离子去污剂使细胞溶解来研究核结构的方法。这种处理除去胞膜、胞质和核质, 并使核小体破裂(几乎所有的组蛋白均被浓盐提取), 剩下的就是由核基质或 RNA、蛋白质组成的支架以及 DNA 所构成的类核, 其 DNA 的双螺旋以核小体的组蛋白为核心形成负超螺旋结构。超螺旋的存在使 DNA 不能自由旋转, Cook 等提出一个模型, DNA 间断的附加于基质, 有效的形成一系列环状、而不是线性分子。当加入嵌入剂溴乙锭时, 负超螺旋松散, 环状结构从类核核心伸展开来, 形成一个晕圈。同样, 用电离辐射来破坏环状结构时可发现相似的效应, 单链断裂就足以使超螺旋松散。彗星试验最常用的形式是细胞被包埋于琼脂糖中后, 用去污剂和浓盐溶解, 这样 DNA 就被固定, 用于继后的电泳。彗星试验最早由 Ostling 和 Johanson (1984)阐述, 他们参考 Cook 等的类核模型, 用松散的超螺旋的 DNA 对彗星尾巴加以描述, 事实上, 彗星尾巴可被简单的看作被电场拉向一边的晕圈。Singh 等(1988)首次提出碱性电泳技术, 可检测出单链 DNA 断片, 使 SCGE 灵敏性大大提高。经过不断改进, 彗星实验技术通过固定 DNA 核中迁移出来的 DNA 片断来定量检测 DNA 双或单链损伤和碱性条件下的不稳定结构, 得到重要发展和应用。

目前采用的彗星实验可以分为中性凝胶电泳、半碱性凝胶电泳和碱性凝胶电泳三大类。不同 pH 下彗星实验的灵敏度和检测范围不同, 中性电泳仅可检测 DNA 双链的断裂, 半碱性彗星实验则可以检测 DNA 双链的断裂、单链的断裂和延迟修复位点, 但在 pH 13 条件下碱性彗星实验检测的灵敏度大大提高, 可以检测 DNA 上的碱基不稳定位点、双链的断裂、单链断裂和延迟修复位点等多种类型的 DNA 损伤(Mitchelmore and Chipman, 1998)。根据实验所采用的电泳胶板的不同, 单细胞凝胶电泳可以分为单层凝胶、双层凝胶和三层凝胶电泳技术。现在最常用的是采用三层凝胶的碱性单细胞凝胶电泳, 就是使细胞核埋于三层琼脂糖的中间层, 形成类似“三明治”的结构。

彗星实验的原理: 包埋于低琼脂糖中的细胞, 在强碱的条件下以裂解液和高浓度的盐溶液解离, 在解离的过程中包埋在琼脂糖中细胞的细胞膜、核膜及其它膜结构受到破坏, 细胞内的蛋白质、RNA 和其它成分可以扩散到裂解液中, DNA 因为分子量大不能

进入裂解液，只能留在原位。在有少量组蛋白的条件下，DNA 仍保持高度超螺旋结构，但当 DNA 受到损伤产生断裂时，碱性条件下 DNA 则从链上损伤的地方开始解旋，正常的 DNA 超螺旋结构变得松弛，DNA 环向外伸展，链缺口暴露了负电荷，在电场中带负电荷的 DNA 断片向正极移动。由于完整的 DNA 分子量较大，移动速率较慢；断裂的 DNA 分子量较小移动速率较快，因此经溴化乙锭染色后在荧光显微镜下可以观察到细胞核 DNA 呈“彗星”状。DNA 受到的伤害越严重，产生的断片就越多，电泳时拖尾也越长且荧光密度越大，所以可以通过测定 DNA 迁移部分的迁移长度和荧光密度来测定 DNA 损伤程度（王小红等，2001）。

4.3 变性梯度凝胶电泳实验

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术。它的分辨精度比聚丙烯酰胺凝胶电泳更高，可以检测到一个核苷酸水平的差异。Muyzer 等(1993)首先将 DGGE 技术应用于微生物分子生态学研究，证明该技术在揭示微生物遗传多样性和微生物种群变化方面具有独特的优越性。

变性梯度凝胶电泳是研究重金属、有机污染物对微生物群落结构影响最为常用的分子生物学技术。该技术是根据序列的不同，将片段大小相同的 DNA 序列分开。双链 DNA 分子中 A,T 碱基之间有 2 个氢键，而 G,C 碱基之间有 3 个氢键连接，因此 A,T 碱基对对变性剂的耐受性要低于 G,C 碱基对。由于这四种碱基的组成和排列差异，使不同序列的双链 DNA 分子具有不同的解链温度。首先将 DNA 进行 PCR 扩增，得到长度相同或相近的片段，然后在电泳中通过线性增加变性梯度分开不同序列的产物。其原理是 DNA 依据其序列的特异变性点熔化解链，各自单独的序列将在各自特定的变性点开始熔解。部分解链的 DNA 分子在凝胶中基本上停止了迁移，而完整螺旋形式的分子继续向前移动，这样不同的片段就被 DGGE 有效分离。一个引物末端常需附加 30-50 个富含 GC 序列的 GC 夹板，以便百分之百的将有可能变化的序列检测出来。

用 DGGE 进行微生物生态研究时，为了使目的序列能够完全解链，在 PCR 扩增目的片段时，会在某引物的 5'端人为掺入一段富含 GC 碱基的序列，称之为“GC 夹”，用以调节目序列的解链行为。GC 发卡结构是一个富含 GC 碱基的序列，由于高的 GC 含量，所以自身配对而成为一种特殊的稳定结构，在一般情况下难以被拆开。将 GC 发卡结构连接于 DNA 双链分子一端，使得该 DNA 就难以完全解链成为单链 DNA，在用 PCR-DGGE 对土壤微生物多样性研究中，在正向引物的 5'端加 GC 发卡结构后，就使得

扩增出的 PCR 产物在含有变性剂的电泳胶中难以完全解链而保持部分解链，从而使得这些 PCR 产物在 DGGE 中能够被完全分离。而无发卡结构的 PCR 产物会在含有变性剂的电泳胶的某个梯度以上完全解链成为两条单链，而单链 DNA 在 DGGE 中的电泳行为取决于 DNA 分子的大小，与 DNA 的碱基顺序无关，所以在所有长度相同的此类 PCR 产物会在 DGGE 中解链成长度相同的单链 DNA，它们具有相似的电泳行为，所以在 DGGE 中不能被完全分开。有关的实验观察及理论推算表明 GC 发夹长为 30bp 就足能用于绝大多数 DNA 片段的 DGGE 分析，所以设计一个适合于直接检测基因组 DNA 片段、特别是带有较长碱基的 GC 发夹片段尤为重要（罗海峰等，2003）。

4.4 温度梯度凝胶电泳技术

温度梯度凝胶电泳（Thermal gradient gel electrophoresis, TGGE）的原理与变性梯度凝胶电泳（DGGE）类似，除了利用核酸分子的大小和带电荷数的多少以外，还利用了核酸分子的分子构象。稳定的构象由氢键和范德华力共同维系，并受环境温度、盐离子浓度、pH 值等因素影响，如果环境温度升高到某一限定点就可以破坏氢键和范德华力，这时分子即处于变性状态，此过程就称为热变性，TGGE 就是利用不同构象的分子具有不同的变性温度（ T_m ）来进行分离的。在正常情况下，经过 PCR 的 16S rDNA 分子呈双链结构状态；当温度升高到一定值时，16S rDNA 双链开始解开，由完整的双链变为分叉双链；如果温度继续升高，rDNA 双链完全解开，变为单链 rDNA。这种分子构象的改变会影响分子在电泳时的迁移行为，因为 rDNA 双链的打开直接导致迁移率下降。这种影响在两条链即将完全解开时最大，此时分子的电泳速度最慢；而当全部形成单链时，泳动速度又会变快。利用这一特点，TGGE 就可以在聚丙烯酰胺凝胶上得到所分析样品的遗传指纹图谱。相比于 DGGE 技术在环境微生物研究领域的应用，TGGE 技术目前的应用范围要小得多，但国内外已有人开始应用 TGGE 进行微生物分子生态学研究。高平等（2003）利用 TGGE 对焦化废水处理系统活性污泥细菌种群的动态变化和多样性进行了研究，在 8 个监测时期中同一曝气池活性污泥的 16S rDNA V3-PCR TGGE 指纹图谱基本一致，并得到了图谱间的相似性系数。

4.5 单链构象多态性分析技术

单链构象多态性（single strand conformation polymorphism, SSCP）分析技术是 1984 年 Noumi 等（1984）首次建立的 DNA 分析方法。至今，该项技术已成为一种快速、敏感、筛查已知突变位点，识别未知突变，并广泛应用于多态性的分析。该方法原理是：经 PCR 扩增的目的片段在变性剂或低离子浓度下经高温处理使之解链并确保成为

DNA 单链, 然后在一定浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, DNA 单链的迁移率除与 DNA 链的长短有关外, 更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。在非变性条件下, DNA 单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象, 这种构象由 DNA 单链碱基决定, 其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用 (主要为氢键) 来维持。相同长度的 DNA 单链其顺序不同, 甚至单个碱基不同, 所形成的构象不同, 电泳迁移率也不同, PCR 产物变性后, 单链产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 因靶 DNA 中发生单碱基置换, 或个别碱基插入或缺失时, 因迁移产生变化会出现泳动变位, 从而可将变异 DNA 与正常 DNA 区分开。相同长度的单链 DNA 因其顺序不同或单个碱基差异, 所形成的构象就会不同, 其在凝胶中泳动速度不一样, 从而显示出带型的差异, 即多态型。

4.6 实时荧光定量 PCR 技术

所谓的实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative, PCR) 就是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中, 引入了一种荧光化学物质, 随着 PCR 反应的进行, PCR 反应产物不断累计, 荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环, 收集一个荧光强度信号, 这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化, 从而得到一条荧光扩增曲线图, 利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线, 通过标准曲线对未知模板浓度进行定量分析的方法 (Schmittgen, 2001)。

Feris 等 (2003) 在研究重金属污染梯度高流变区微生物群落时, 利用荧光定量 PCR 技术量化 16S rRNA 基因拷贝数和 α - , β - , γ - Proteobacteria cyanobacteria 四个系统进化类群, 发现淤泥中重金属离子梯度与类群 III 正相关, 与类群 II 负相关, 与类群 I 或 IV 无相关性, 从而为预测河流重金属污染的长期效应提供了进一步研究的基础。Skovhu 等 (2004) 运用交替假单胞菌属的特异性引物, 快速检测出目标细菌 DNA 模板在总 DNA 模板中的比例, 进而推算出目标细菌在环境样本中的丰度。Okano 等 (2004) 通过对氨单加氧酶基因 (amoA) 进行定量检测来确定土壤中氨氧化细菌 (AOB) 群落大小, 同时研究了铵离子浓度对氨氧化细菌群落的影响。发现随着铵离子浓度增加, 氨氧化细菌数量也呈不同程度增长, 而细菌总数稳定在一定的范围。

5. 本研究的目的意义

环境污染物进入环境后, 会对环境中的生物产生不同程度的危害。生物在受害致死以前, 其行为、生理、生化已发生反应, 可以选择这些在分子和细胞水平上的指标测定

污染物对生物的影响。近几十年来,分子生物学理论和技术的发展,给生态毒理学研究提供了新的思维和研究工具,改变了生态毒理学研究的基本格局,使生态毒理学研究从经典的整体器官水平向细胞和分子水平飞跃(周启星等,2004)。农药这类环境污染物首先必须进入生物体,到达靶位点后,才可能产生生物学效应。这些生物反应从分子相互作用到细胞损伤及至整个生物体的毒性显现都反映了生物系统与环境因子的相互作用,这些作用可发生在分子、细胞及个体水平上,使生物体产生功能、生理、生化变化。如果这些生物反应先于严重的结构损害,就有助于确定生物体所处的污染状态及其潜在危害,为严重毒性伤害提供早期警报。指示生物及其生物标志物检测能提供污染物环境生物效应的信息,对生态毒理研究和环境危险评价具有重要意义(万斌,2000)。

有关持久性有机污染物的污染状况和毒性评价是目前环境领域的研究热点之一。硫丹作为一种即将被列入 POPs 名单的污染物,研究其对生态系统及人类健康的影响非常重要。然而,从目前所掌握的材料来看,硫丹的生态毒理研究,尤其是分子生态毒理研究工作还不够深入。本项目将采用现代分子生物学方法,利用微核试验、彗星试验、DGGE 分子指纹分析技术,从分子水平上研究硫丹对土壤微生物、动植物的分子毒性效应,以期从分子水平上来揭示污染生态过程,对探讨持久性有机污染物对生态系统的影响以及为建立快速、有效、实用的生物监控和测试技术具有重要意义。

第二章 硫丹对蚕豆根尖细胞致畸效应的研究

蚕豆是经典的研究好材料，它具有三个优点：(1)染色体数目少 ($2n=12$)，个体较大，便于观察分析；(2)生长速度快，其根尖的分生组织细胞周期在适宜条件下仅20h左右，而且大部分时间处于对诱变剂敏感的间期；(3)实验重复性好，可信度高(Reed, 1959)。蚕豆与小鼠在分类上属于同一个层次，蚕豆细胞染色体的损伤可以在一定程度上反映同样暴露条件下高等动物遗传物质的损伤(陈光荣等, 1983)。蚕豆根尖微核实验方法及染色体畸变实验方法近年来逐渐应用于环境诱变剂的检测及致突变研究，该植物检测方法被认为是用作致突变性分析的一种很好的测试系统(钱晓薇, 2004)。蚕豆根尖细胞微核实验技术在环境污染物检测中已被我国定为“生物检测技术”而得到广泛的应用(屈艾等, 2001)。本章研究了不同浓度硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂指数、染色体畸变率、微核率的影响，以期探明硫丹对植物细胞的致畸效应。

1. 材料与方法

1.1 供试植物

松滋青皮豆 (*Vicia faba*)，由华中师范大学生命科学学院遗传学教研室筛选出来的微核试验敏感品种。种子成熟晒干后用牛皮纸袋装好放入4℃冰箱内保存备用。

1.2 供试试剂和主要仪器

| | | |
|--------|---------|------------------------|
| 硫丹 | 纯度 98 % | 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司 |
| 丙酮 | 分析纯 | 齐鲁石化公司研究院试剂厂 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市广成化学试剂厂 |
| 盐酸 | 分析纯 | 山东省莱阳市化工厂 |
| 冰乙酸 | 分析纯 | 天津市博迪化工有限公司 |
| 碱性品红 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 偏重亚硫酸钠 | 分析纯 | 天津市博迪化工有限公司 |

主要仪器：HPG-280B 型光照培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司)，YS100 光学显微镜(日本尼康)，IX71 荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯)，电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司)。

1.3 试剂配制

- (1) 卡诺氏液：无水乙醇 3 份加冰乙酸 1 份配成。固定根尖时随用随配。
- (2) 席夫氏(Schiff)试剂：称 0.5g 碱性品红加蒸馏水 100mL 置三角烧瓶中煮沸 5min，

并不断搅拌使之溶解。冷却到 58℃时过滤于深棕色试剂瓶中，待滤液冷至 25℃时再加入 10mL 1mol/L HCl 和 1g 偏重亚硫酸钠充分振荡使其溶解。塞紧瓶口，用黑纸包好，置于暗处至少 24h，检查染色液如果是无色透明即可使用。此染色液在 4℃冰箱中可保存 6 个月左右，如出现沉淀就不能再用。

(3) SO₂ 洗涤液：吸取 10%偏重亚硫酸钠溶液 5mL，加 1mol/L HCl 5 mL，再加蒸馏水 100mL 配成。现用现配。

1.4 试验方法。

1.4.1 蚕豆浸种催芽：

将当年或上一年的松滋青皮豆种子按需要量放入盛有蒸馏水的的烧杯中，置 25℃的温箱内浸泡 24~36h。待种子吸胀后，用纱布松松包裹置解剖盘中，保持湿度，在 25℃的温箱中催芽 12h~24h。待种子初生根露出 2~3mm 时，选取发芽良好的种子，放入铺有薄层湿脱脂棉的解剖盘内，仍置于 25℃的温箱中继续催芽，保持湿度。再经 36~48h，种子大部分的初生根长至 1.5~2cm，根毛发育良好，这时就可作为实验之用。

1.4.2 药剂处理根尖：

每一处理选取 6~8 粒初始根生长良好、根长较一致的种子，放入盛有药剂的培养皿中，让药剂浸泡住根尖即可。本试验药剂设三个剂量组，加水将药液浓度分别配为 0.1、1.0 和 10.0 mg/L，同时设溶剂（丙酮）对照组。置 25℃的温箱内培养，分别于药剂处理时间 12h、24h、36h、48h 时取材。

1.4.3 根尖细胞修复培养

将处理后的种子，用蒸馏水浸洗 3 次，洗净后的种子再放入新铺好的湿脱脂棉的解剖盘内，按前述培养条件使根尖细胞修复 22~24h，亦可在培养皿中用蒸馏水浸住根尖修复培养。

1.4.4 固定根尖细胞

将修复培养后的种子，从根尖顶端切下 1cm 长的幼根放入空青霉素瓶中，加卡诺氏固定液，固定 24~48h。固定后的幼根 如不及时制片，可换入 70%的乙醇中，置 4℃的冰箱内保存备用。

1.4.5 孚尔根染色

固定好的幼根，在青霉素瓶中用蒸馏水浸洗 2 次。吸净蒸馏水，再加入 5mol/L HCl 将幼根泡住，连瓶放入 28℃水浴锅中水解幼根 25min 左右，视幼根软化的程度可适当

增减时间,当幼根被软化即可。用蒸馏水浸洗幼根2次。在暗室或遮光的条件下加席夫试剂,每瓶用量以淹住幼根液面2mm为好。在遮光条件下染色4~6h。除去染液,用SO₂洗涤液浸洗幼根2次。

1.4.6 制片:

将幼根放在载玻片上,用解剖针截下1mm的幼根。滴上少许的蒸馏水,用解剖针将根尖捣碎。加盖玻片,注意不要有气泡。

1.4.7 镜检

光学显微镜观察压片结果,统计根尖组织中,间期细胞的微核数及中、后、末期细胞中的染色体变异情况。微核识别的标准:是主核大小的1/3以下,并于主核分离的小核;小核着色与主核相当或稍浅;小核形态可为圆形、椭圆形、不规则形等。观察染色体畸变类型主要有:染色体断片、落后染色体、染色体环、染色体桥等。每一处理统计4个根尖,每个根尖统计1000个细胞。

1.4.8 结果计算

有丝分裂指数:

有丝分裂指数=处于分裂期的细胞数/总细胞数×%。

染色体畸变畸变率:

染色体畸变率=染色体畸变细胞数/分裂细胞数×%。

测试样品微核千分率(MN%)的计算为:

$$MN\% = \frac{\text{测试样品观察到的MN数}}{\text{测试样品观察到的细胞数}} \times 1000\%$$

2. 结果与分析

2.1 硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响

硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响见表1,其影响的大小随硫丹的浓度和染毒时间不同而异。随着硫丹浓度的增大,蚕豆根尖分裂细胞减少,有丝分裂指数下降,表现出明显的抑制效应。下降的程度随硫丹的浓度和染毒时间的增加而增加,在各种处理中,以10mg/L染毒48h细胞的有丝分裂指数为最低,它约为相同时间对照处理根尖细胞有丝分裂指数的44%左右。

表 1 硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂指数 (%) 的影响

Table.1 Effects of endosulfan on mitotic index (%) of root tip cells of *Vicia faba*

| 硫丹浓度 Concentration (mg/L) | 蚕豆根尖细胞有丝分裂指数 (%) | | | |
|---------------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 12h | 24h | 36h | 48h |
| CK | 8.25±0.48 | 7.50±0.87 | 7.25±0.75 | 6.75±0.85 |
| 0.1 | 6.75±0.63 | 6.75±0.85 | 5.50±0.65 | 4.75±0.63* |
| 1.0 | 6.25±0.62* | 5.25±0.63* | 4.75±0.48* | 3.50±0.29* |
| 10.0 | 5.50±0.50* | 4.75±0.47* | 3.75±0.47* | 3.00±0.41* |

注：各组与对照组比较，* 代表 $p<0.05$

2.2 硫丹对蚕豆根尖细胞染色体畸变的影响

硫丹对蚕豆根尖细胞染色体畸变的影响见表 2，从表 2 可见硫丹有明显的诱发蚕豆根尖细胞染色体畸变的作用，畸变率的高低与硫丹的浓度和染毒时间有关。3 个处理组的染色体畸变率均明显高于对照组 ($p<0.05$)，且随着染色体畸变率随着硫丹浓度的增加而升高。

表 2 硫丹对蚕豆根尖细胞染色体畸变率 (%) 的影响

Table.2 Effects of endosulfan on frequency of chromosomal aberrations (%) of root tip cells of *Vicia faba*

| 硫丹浓度 Concentration (mg/L) | 蚕豆根尖细胞染色体畸变率 (%) | | | |
|---------------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 12h | 24h | 36h | 48h |
| CK | 0.90±0.07 | 1.00±0.05 | 0.97±0.08 | 1.20±0.07 |
| 0.1 | 1.25±0.64* | 1.52±0.10* | 1.90±0.12* | 2.15±0.09* |
| 1.0 | 1.50±0.07* | 1.82±0.13* | 2.10±0.10* | 2.32±0.14* |
| 10.0 | 2.10±0.14* | 2.40±0.12* | 2.70±0.14* | 2.82±0.13* |

注：各组与对照组比较，* 代表 $p<0.05$

经硫丹染毒处理的蚕豆根尖细胞内存在着多种染色体畸变类型，如染色体断片、落后染色体、染色体桥、染色体环和多极分裂等。正常的细胞如（附录 附图 1）所示。

①染色体断片是指一个染色体发生一处或多处断裂而不重接且远远分开所出现的一个或多个无着丝粒节段。这是一种不可逆的导致细胞致死的毒害。（附录 附图 2）

②落后染色体的形成主要有两种情况：一种是发生在细胞有丝分裂前中期，当染色体由不规则排列逐渐整齐排列于赤道板上时，有个别染色体或染色体片断未能按时到达赤道板的位置，位于远离赤道板的位置；另一种则发生在细胞有丝分裂后期，正常细胞的染色体都移向两极，而个别染色体或染色体片断滞留于两极之间，与染色体的主体部分移向两极的速度和进程不同。（附录 附图 3）

③染色体桥的形成是细胞分裂异常和染色体畸变的主要特征之一。桥是由于染色体断裂再融和形成的，当两个染色单体的着丝粒已经分别移向相对的两极后，二者的臂仍粘连在一起，形成后期桥。硫丹胁迫下的蚕豆根尖细胞内的染色体桥有单桥、双桥等类型。这是一种非致死的轻度毒害。（附录 附图 4）

④染色体环是由于染色体断裂再融合所形成的，在细胞分裂中期和后期均有染色体环的出现。（附录 附图 5）

2.3 硫丹对蚕豆根尖细胞微核率的影响

采用微核试验测定的毒死蜱对蚕豆根尖细胞微核率影响的试验结果见表 3，由表 3 可见，硫丹能诱发较高频率的微核，3 个不同浓度的硫丹所诱发的微核率均明显高于对照组 ($p < 0.05$)。蚕豆根尖细胞微核率随着处理液中硫丹浓度的增大而增加，具有明显的剂量-效应关系。

表 3 硫丹对蚕豆根尖细胞微核率 (%) 的影响

Table.3 Effects of endosulfan on frequency of micronucleus (%) of root-tip cells of *Vicia faba*

| 硫丹浓度 Concentration (mg/L) | 蚕豆根尖细胞微核率 (%) | | | |
|---------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 12h | 24h | 36h | 48h |
| CK | 4.25±0.629 | 4.50±0.29 | 4.00±0.41 | 4.25±0.48 |
| 0.1 | 8.25±1.25* | 9.25±0.75* | 11.75±0.75* | 12.75±0.63* |
| 1.0 | 9.50±0.65* | 1.75±0.85* | 13.00±0.71* | 14.00±0.41* |
| 10.0 | 14.00±1.22* | 15.50±0.65* | 18.25±0.75* | 19.25±0.48* |

注：各组与对照组比较，* 代表 $p < 0.05$

3. 讨论

农药对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响，主要原因可能是农药的毒害作用超过了植物

自身的保护作用，污染物处理可能降低了核酸酶活性，使 DNA 合成速率变慢，延长了分裂间期；或与 DNA 结合，造成 DNA 的交联，阻碍了 DNA 复制的顺利进行。由于细胞进入 S 期需要足够的触发蛋白，污染物处理也可能影响了细胞触发蛋白的合成 (Shahin, 1991)。本研究发现，经硫丹处理后，蚕豆根尖细胞有丝分裂指数则逐渐降低，降低的程度随硫丹的浓度和染毒时间的增加而增加。

染色体畸变是由于染色体或染色单体断裂造成的染色体或染色单体缺失，或引起各种重排，从而出现染色体结构异常的现象。细胞经化学药物的作用易导致分裂过程滞留染色体形成落后染色体、染色体桥、染色体断片、染色体环等染色体畸变，这些仍然留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝粒断片或环，在末期以后，单独形成 1 个或多个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内而形成微核。周宏治(2000)研究表明甲基对硫磷在低浓度 0.65%~0.75% 下使用，诱导微核率为 6.50%~9.66%，基本无污染。当甲基对硫磷浓度达到 1.13%~2.45% 之间时，诱导微核率为 15.50%~21.25%，造成对环境的中度污染。当甲基对硫磷浓度达到 3.77% 以上时，诱导微核率在 31.30% 以上，造成对环境的重度污染。刘伟等 (2006) 研究了毒死蜱、马拉硫磷、氰戊菊酯三种农药对蚕豆根尖细胞微核率的影响，结果表明在设定的浓度范围内，随着浓度的增大，微核率均随之升高。当农药的剂量达到 10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，微核率与对照相比均有极显著差异 ($p < 0.01$)。表明在试验条件下这三种农药达到一定剂量浓度会对蚕豆根尖细胞造成遗传损伤。卜宁等 (2008) 研究了不同浓度农药百菌清、氯氰菊酯对蚕豆根尖细胞的遗传损伤。结果表明，百菌清、氯氰菊酯均能诱发较高的微核率。不同浓度的百菌清和氯菊酯农药均可使蚕豆根尖细胞有丝分裂指数增大，并能诱导蚕豆根尖细胞产生较高频率的染色体畸变，且为多种类型的染色体畸变。黎杰强等 (2008) 用万灵、三氯杀螨醇、多菌灵 3 种常用农药不同质量浓度液处理蚕豆根尖，结果表明，各处理组诱导的根尖细胞微核率与阴性对照组相比均有极显著差异，并且处理组细胞分裂中期、后期、末期均出现多种染色体畸变类型(染色体断片、染色体桥、染色体粘连等)。

本试验研究表明，硫丹各浓度处理组均能诱发较高的微核率，且随着药剂浓度的升高而致使蚕豆根尖细胞微核率增加，并能诱导蚕豆根尖细胞产生较高频率的染色体畸变，且为多种类型的染色体畸变。在本试验条件下硫丹 0.1、1.0、10.0 mg/L 三个药剂浓度均对蚕豆根尖细胞造成 DNA 损伤，具有明显的遗传毒性。受试农药引起的致畸效应，大部分研究认为在于其有效成分中的有机化合物对细胞分裂的抑制或干扰。硫丹为有机氯类杀虫剂，有资料表明其所含成分对细胞分裂有着抑制或“麻醉”的作用，它们破坏细

胞微管等有丝分裂结构，对细胞中染色体 DNA 造成损伤，导致分裂中染色体的异常，最终诱发微核形成。

有丝分裂指数、染色体畸变率和微核率都是判断细胞有丝分裂正常与否的三项重要指标。有人指出，它们之间有一定的关系（段昌群，1995），但也有人认为，染色体畸变与微核率是相互独立的遗传毒理学指标体系（Evans, 1988）。本实验结果表明，当硫丹的浓度和染毒时间在一定范围时，有丝分裂指数与染色体畸变率和微核率都呈负相关，染色体畸变率与微核率呈正相关。但畸变率比微核率大，主要原因是一些染色体小片段可能在分裂过程中丢失，无法以微核的方式表达，因此，处于分裂期细胞的畸变率更能反映药物对遗传物质的毒害作用。

第三章 硫丹对蚯蚓和白三叶草的基因毒性

单细胞凝胶电泳(Single Cell Gel Electrophoresis, 简称SCGE)技术, 又称为彗星试验(comet assay), 可以定量检测真核细胞中多种DNA的损伤, 如单链断裂、双链断裂、碱性不稳定位点、不完全切除修复位点和DNA交联等(Fortini et al., 1996; Tsuda and Kosaka, 1998; Gichner et al., 1998; Ning et al., 2002)。彗星试验能敏感地探测单细胞水平的DNA链断裂(0.1 DNA break/109 Da), 具有所需细胞数少、试验周期短等优点, 其试验方法简便快捷(孟紫强等, 1998; 林爱军等, 2006; Ali et al., 2008)。

蚯蚓是生态系统中的一个重要组成部分, 是陆生生物与土壤生态环境信息传递的桥梁, 是农田生态系统中土壤物质生物小循环中的重要一环(梁继东等, 2003; 贾秀英等, 2005)。蚯蚓在土壤中有有机物质的分解转化上具有重要作用, 同时其活动可以改善土壤的结构, 增强土壤的透气和排水保水功能。因此在土壤中保持健康的蚯蚓生态种群对于土壤环境的保护具有重要价值。而从生态学上来看, 蚯蚓处于陆地生态食物链的底部, 对大部分杀虫剂和重金属都具有富积作用。这些被富积的化学物质可能并不对蚯蚓造成严重的伤害, 但却可能影响食物链中更高级的生物(张壬午, 1986)。利用蚯蚓作为土壤环境的指示生物, 可以提供一个保护整个土壤动物区系的安全域值(Puurtinen et al., 1997; Michael et al., 2001)。研究农药对蚯蚓的生态毒性是评价农药安全的一个重要指标(梁继东等, 2003; 宋玉芳等, 2002; Thompson et al., 1970), 蚯蚓作为土壤的污染的指示生物已得到了广泛的应用。

白三叶草(*Trifolium repens* Linn) (white clover) 为豆科三叶草属, 种植多年生牧草, 长 30~60cm, 主根短, 侧根发达, 有根瘤固 N, 可大量固定空气中的 N 素, 白三叶草和茶树一样, 喜温凉湿润气候, 较耐荫耐湿, 生长最适温度 19~24℃; 对土壤要求不严, 在 pH4.5-8.5 的土壤上均可生长。白三叶草是世界范围内种植的重要优良牧草, 也可作鱼食; 是城市、庭院、道路绿化植物水土保持草种(高原、矿区种植), 目前已被农业部列为向全国推广果园生草覆盖技术的首选草种, 是亚热带丘陵区茶园内间作植物, 在果园土壤管理中得到了普遍应用, 分布十分广泛。白三叶草对环境污染高度敏感, 是一种很好的生物监测材料(Sandra Citterio, 2002; Aina, 2006)。

本章采用单细胞凝胶电泳技术, 以蚯蚓体腔细胞和白三叶草叶片细胞为实验材料, 初步探索了硫丹对其 DNA 的损伤效应, 以期对硫丹的基因毒性研究提供一定的科学依据。

第一节 硫丹对蚯蚓的基因毒性实验

1. 材料与方法

1.1 药品试剂

| | | |
|---------|---------|------------------------|
| 硫丹 | 纯度 98 % | 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司 |
| 丙酮 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市广成化学试剂厂 |
| 溴化乙锭 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 愈创木酚 | 生化试剂 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 博山化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 正常熔点琼脂糖 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 低熔点琼脂糖 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 愈创木酚甘油醚 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 乙二胺四乙酸 | 分析纯 | 天津市巴斯夫化工有限公司 |
| 二甲基亚砜 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 曲拉通 | 生化试剂 | 天津市科密欧化学试剂开发中心 |
| 肌氨酸钠 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 磷酸二氢钾 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |

1.2 供试动物

赤子爱胜蚓(*Eisenia Foetida*), 购于天津市贾立明蚯蚓养殖有限公司, 体重约 300~600mg, 是国际上常用于蚯蚓毒性试验的品种, 对污染物具有中等的敏感性。试验前在土壤中预培养一段时间后, 实验时取环带明显且大小较一致的健康成蚓。

1.3 实验方法

1.3.1 供试土壤

人工土壤按照 OECD(1984)方法配制, 人工土壤由 10%的苔鲜泥炭细土, 20%的高岭粘土(高岭土大于 50%), 69%的工业石英砂(含 50%以上 0.05-0.2mm 的细小颗粒)和 1%

的 CaCO_3 组成，每个处理总重 500g。

1.3.2 染毒方法

称取 500g 人工土壤于一烧杯中，按不同等级浓度添加硫丹溶液，加水至规定含量，大约为人工土壤的 35%，然后放入 10 条蚯蚓，用塑料薄膜(预先扎孔)封口，置 $20\pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养箱中。于药剂处理后第 7、14、21、28 d 取出蚯蚓，进行试验。药剂处理浓度设定为溶剂对照组(丙酮)，0.1, 1.0, 10.0mg/kg 四个处理。硫丹的添加方法：将硫丹以一定药量溶于易挥发的溶剂(丙酮)中，然后与 10g 人工土壤充分混匀，待丙酮充分挥发后，再与 490g 人工土壤充分混匀，并加水至规定含量。

1.3.3 蚯蚓体腔细胞提取

(1)将滤纸放入皮氏培养皿中，用生理盐水湿润。取出蚯蚓，用生理盐水洗净蚯蚓身体表面的泥土，放入培养皿中过夜，吐泥。

(2)吸取 1mL 的生理盐水到 1.5mL 离心管中，将清腹后的蚯蚓放置其中，2-3min 后，取出。

(3)吸取 1mL 的体腔细胞浸提液(4°C)至离心管中，将蚯蚓放入其中，蚯蚓受到刺激后，会将体腔细胞排出到介质中，2-3min 后，将蚯蚓取出。

(4)将装有蚯蚓体腔细胞的 eppendorf 管 4°C 下离心。

(5)离心后，移去上清液，吸取 1mL PBS 溶液(4°C)至 eppendorf 管中，将体腔细胞在 PBS 溶液中混匀，再次离心。

(6)移走离心后的 PBS 上清液，吸取 100 μL 的 PBS(4°C)至离心管中，将体腔细胞在 PBS 溶液中混匀，制备成细胞悬浮液，待用。

1.3.4 电泳胶板的制作

本实验采用目前最常用的“三明治”三层凝胶结构，第一层为正常熔点的琼脂糖，第二层是低熔点琼脂糖和细胞核悬浮液的混合层，第三层是低熔点琼脂糖。

先制备第 1 层琼脂糖磨砂显微镜载玻片，用移液枪吸取 130~150 μL 0.65% 正常熔点琼脂糖，加上洁净的盖玻片，置冰袋冷却，之后用手指肚缓慢滑去盖玻片。吸取 10 μL 细胞悬浮液与 75 μL 低熔点琼脂糖混和，迅速将细胞混合液滴到第一层胶上，加盖玻片让其均匀铺开，置 4°C 15min，使琼脂固化。待第 2 层琼脂糖凝固后轻轻取下盖玻片，再滴加 50 μL 0.5% 低熔点琼脂糖，并迅速盖上干净的盖玻片再放置到 4°C 下，待其凝固后取下盖玻片。

1.3.5 细胞裂解

移开盖玻片，将载玻片浸入新配制的 4℃裂解液中，在 4℃冰浴中放置至少 1h，但时间不能过长，长时间的裂解可能导致裂解液沉淀。

1.3.6 DNA 解旋

轻轻移去盖玻片后将载玻片水平并列置于电泳槽阳极端，电泳槽中盛有新配制碱性电泳缓冲液(300mmol/LNaOH, 1.0mmol/L Na₂EDTA)约覆过载玻片 2.5mm, (预冷, 约 400mL)放置 30min。

1.3.7 电泳

调整电泳槽中缓冲液面高度，使电泳仪的电压为 25V(恒压)，电流为 300mA，电泳 15min。

1.3.8 中和、染色

电泳结束后取出玻片用蒸馏水冲洗 3 次，并用滤纸吸去多余的水分，放小瓷盘，沿器壁加入 0.4mol/L Tris-HCl (pH=7.5)缓冲液，将载玻片淹没 15min，再将 Tris-HCl 吸去，用滤纸将盘内液体吸干，再缓缓加入无水乙醇，将载玻片浸埋 1h，吸取乙醇，晾干或室温下过夜。

1.3.9 观察和分析

各组载玻片加入 EB 染色剂染色 20min 后，用荧光显微镜观察，每处理平行电泳三块玻片，每块玻片测定 50 个细胞，用随机软件在自动曝光条件下拍照获取彗星图像后，用 CASP 软件分析测量 DNA 迁移的各种参数。

2. 结果与分析

2.1 硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤程度(尾长)的影响

用 CASP 软件分析所得随机图像，获取彗星图像见附录 附图 7、图 8，所得硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 迁移的尾长的影响如表 4 和图 1 所示。

由表 4 和图 1 可以看出，0.1, 1.0, 10.0mg/kg 三个剂量组硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 均有损伤作用，而且随着浓度的增加，彗星拖尾长度随之增加，这说明 DNA 损伤程度随硫丹的剂量增加而增大。相同浓度处理下，随着时间的增长，受损细胞的 DNA 拖尾长度也随着增大，这说明 DNA 损伤程度随硫丹作用时间的增长而增大。各处理组相比，受损细胞的 DNA 的彗星拖尾长度出现显著性差异($p < 0.05 \sim p < 0.01$)。

表 4 硫丹不同浓度处理蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤(尾长)变化

Tab 4 Changes of comet tail length in earthworm coelomocytes under different expose dose of endosulfan

| 硫丹浓度 Concentration (mg/kg) | 蚯蚓体腔细胞彗星试验尾长变化(μm) ($\bar{x} \pm SD$) | | | |
|----------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 7d | 14d | 21d | 28d |
| CK | 6.22±2.58 | 6.50±2.88 | 6.83±2.63 | 7.10±2.54 |
| 0.1 | 26.75±7.25 | 40.57±12.26 | 45.27±9.59 | 56.40±11.38 |
| 1.0 | 51.42±10.43 | 62.77±8.67 | 65.13±5.74 | 75.42±8.01 |
| 10.0 | 62.14±6.69 | 66.30±11.83 | 71.40±10.89 | 90.29±12.52 |

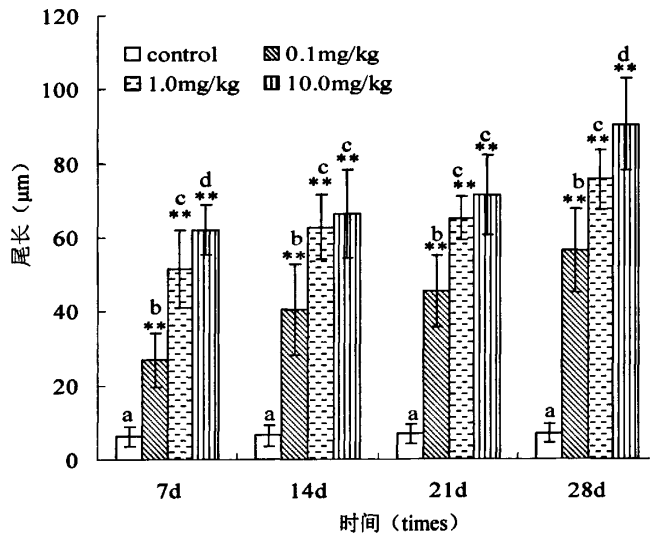


图 1 硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤程度(尾长)的影响

(**：与对照组比较, $p < 0.01$; a/b/c/d: 组间进行比较, $p < 0.05$)

Fig. 1 Effect of endosulfan on earthworm coelomocytes comet tails length

(**：compared with the control group, $p < 0.01$; Different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ level between treatments)

2.2 硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤程度(Olive 尾距)的影响

用 CASP 软件分析所得随机图像, 所得硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 迁移的 Olive 尾

矩的影响如表 5 和图 2 所示。

表 5 硫丹不同浓度处理蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤(Olive 尾矩)变化

Tab 5 Changes of comet OTM in earthworm coelomocytes under different expose dose of endosulfan

| 硫丹浓度 Concentration (mg/kg) | 蚯蚓体腔细胞彗星试验 Olive 尾矩变化($\bar{x} \pm SD$) | | | |
|----------------------------------|---|------------|------------|------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 7d | 14d | 21d | 28d |
| CK | 0.43±0.33 | 0.55±0.44 | 0.58±0.38 | 0.62±0.45 |
| 0.1 | 5.27±2.37 | 11.38±5.85 | 11.67±5.18 | 16.67±4.18 |
| 1.0 | 15.66±8.62 | 21.97±6.86 | 22.67±4.39 | 28.71±9.03 |
| 10.0 | 20.59±3.59 | 23.97±6.06 | 24.62±7.45 | 38.63±8.06 |

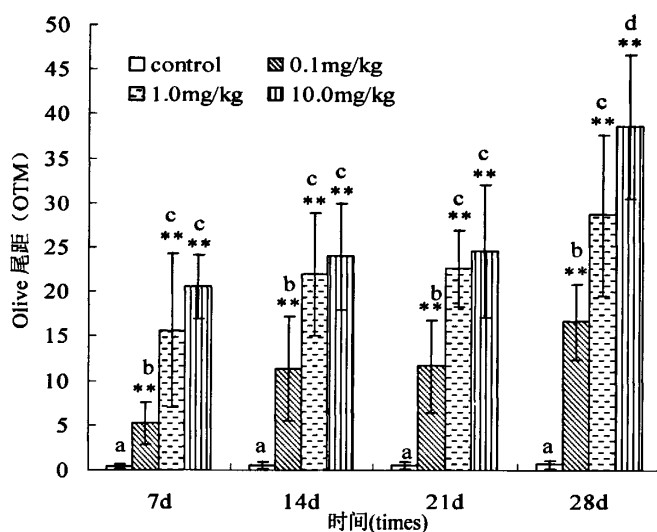


图 2 硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤程度(Olive 尾矩)的影响

(**：与对照组比较， $p < 0.01$ ；a/b/c/d：组间进行比较， $p < 0.05$)

Fig. 2 Effect of endosulfan on earthworm coelomocytes comet OTM

(**：compared with the control group, $p < 0.01$; Different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ level between treatments)

由表 5 和图 2 可以看出，0.1, 1.0, 10.0mg/kg 三个剂量组硫丹对蚯蚓体腔细胞 DNA 均有损伤作用，而且随着浓度的增加，彗星 Olive 尾矩的值随之增加，这说明 DNA 损伤程度随硫丹的剂量增加而增大。相同浓度处理下，随着时间的增长，受损细胞的 DNA 损伤程度也随着增大，这说明 DNA 损伤程度随硫丹作用时间的增长而增大。各处理组

相比, 受损细胞的 DNA 的 Olive 尾矩出现显著性差异($p < 0.05 \sim p < 0.01$)。

第二节 硫丹对白三叶草的基因毒性实验

1. 材料与方法

1.1 药品试剂

| | | |
|---------|---------|------------------------|
| 硫丹 | 纯度 98 % | 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司 |
| 丙酮 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市广成化学试剂厂 |
| 溴化乙锭 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 博山化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 正常熔点琼脂糖 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 低熔点琼脂糖 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 硝酸钾 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硝酸钙 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸镁 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 乙二胺四乙酸 | 分析纯 | 天津市巴斯夫化工有限公司 |
| 磷酸二氢钾 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硼酸 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 钼酸 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氯化锰 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 硫酸锌 | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 硫酸亚铁 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸铜 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |

1.2 供试植物

白三叶草种子由山东农业大学草业科学提供。

1.3 实验方法

1.3.1 植物种子催芽和育苗

挑选大小一致，饱满无虫的植物种子，表面消毒后用自来水冲洗干净并以双蒸水充分冲洗，然后于 20℃ 以蒸馏水浸泡 24h，期间换水 2~3 次，待其充分吸涨后取出，用湿润脱脂纱布包裹置于 20℃ 恒温培养箱中催芽，期间保持湿润，待种子出芽后，移栽至蛭石（预先以自来水和蒸馏水充分清洗）中，加入 Hoagland 营养液育苗备用。

1.3.2 染毒方法

将发芽后的种子培养 4 周后，选取大小、长势一致的幼苗转移至 500mL Hoagland 营养液中，并且加入硫丹溶液使其终浓度为调整到 0.1, 1.0, 10.0mg/L，并设溶剂对照组(丙酮)处理。于药剂处理后第 7、14、21、28 d 采集白三叶草叶片，进行试验。处理期间每天换一次营养液，以保证营养液的浓度和硫丹药液浓度维持处理水平。

1.3.3 白三叶草叶片的处理和细胞核分离

采集处理好的叶片，放于已在冰上预冷的玻璃培养皿上进行叶片冷冻，10 min 后采用机械分离的方法获得细胞核，向培养皿加入一定体积的磷酸盐缓冲液 (PBS)，用刀片在该缓冲液中轻轻将叶片顺叶脉切开并轻轻转动培养皿，使叶片的细胞核进入缓冲液获得叶片细胞核的悬浮液。

1.3.4 电泳胶板的制作

用移液枪吸取 130~150 μ L 0.65% 正常熔点琼脂糖，加上洁净的盖玻片，置冰袋冷却，之后，用手指肚缓慢滑去盖玻片。吸取 50 μ L 细胞混和液，换枪头，在吸取 50 μ L 低熔点琼脂糖，并用枪头浸在胶液中，反复吸取吹打混匀细胞液。迅速盖上干净的盖玻片，再放置到 4℃ 下使其凝固 10min。待第 2 层琼脂糖凝固后轻轻取下盖玻片，再滴加 50 μ L 0.5% 低熔点琼脂糖，并迅速盖上干净的盖玻片再放置到 4℃ 下，待其凝固后取下盖玻片。

1.3.5 DNA 解旋

轻轻移去盖玻片后将载玻片水平并列置于电泳槽阳极端，电泳槽中盛有新配制碱性电泳缓冲液(300mmol/L NaOH, 1.0mmol/L Na₂EDTA)约覆过载玻片 2.5mm，(预冷，约 400mL)放置 30min。

1.3.6 电泳

调整电泳槽中缓冲液面高度，使电泳仪的电压为 25V(恒压)，电流为 300mA，电泳 15min。

1.3.7 中和、染色

电泳结束后取出玻片用蒸馏水冲洗 3 次，并用滤纸吸去多余的水分，放小瓷盘，沿

器壁加入 0.4mol/L Tris-HCl(pH=7.5)缓冲液, 将载玻片淹没 15min, 再将 Tris-HCl 吸去, 用滤纸将盘内液体吸干, 再缓缓加入无水乙醇, 将载玻片浸埋 1h, 吸取乙醇, 晾干或室温下过夜。

1.3.8 观察和分析

每载玻片加入染色剂染色 20min 后, 用荧光显微镜观察, 每处理平行电泳三块玻片, 每块玻片测定 50 个细胞, 用随机软件在自动曝光条件下拍照获取彗星图像后, 用 CASP 软件分析测量 DNA 迁移的各种参数。

2. 结果与分析

2.1 硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 损伤程度(尾长)的影响

用 CASP 软件分析所得随机图像, 获取彗星图像见附录 附图 9、图 10 所示, 所得硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 迁移的尾长的影响如表 2 和图 3 所示。

由表 6 和图 3 可以看出, 0.1, 1.0, 10.0mg/kg 三个剂量组硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 均有损伤作用, 各处理组相比, 受损细胞的 DNA 的彗星拖尾长度出现显著性差异 ($p < 0.05 \sim p < 0.01$)。而且随着浓度的增加, 彗星拖尾长度随之增加, 这说明 DNA 损伤程度随硫丹的剂量增加而增大。

表 6 硫丹不同浓度处理白三叶草叶片细胞 DNA 损伤(尾长)变化

Tab 6 Changes of comet tail length in white clover leaves under different expose dose of endosulfan

| 硫丹浓度 Concentration (mg/kg) | 白三叶草叶片细胞彗星试验尾长变化(μm) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) | | | |
|----------------------------------|---|------------------|-------------------|------------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 7d | 14d | 21d | 28d |
| CK | 9.00 \pm 1.14 | 11.00 \pm 0.22 | 9.20 \pm 1.30 | 10.40 \pm 1.95 |
| 0.1 | 16.20 \pm 1.16 | 24.80 \pm 4.38 | 33.57 \pm 5.71 | 44.86 \pm 7.10 |
| 1.0 | 21.33 \pm 1.15 | 37.34 \pm 4.92 | 51.60 \pm 6.06 | 57.83 \pm 8.70 |
| 10.0 | 35.00 \pm 3.65 | 50.11 \pm 5.97 | 59.36 \pm 10.32 | 64.17 \pm 5.98 |

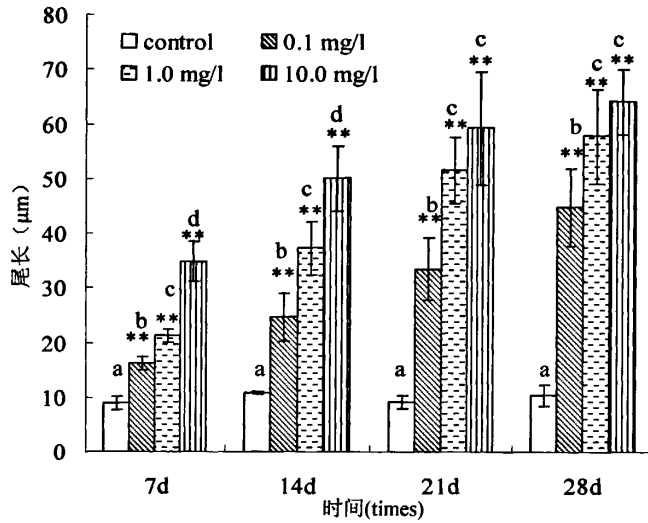


图 3 硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 损伤程度(尾长)的影响

(*: 与对照组比较, $p < 0.01$; a/b/c/d: 组间进行比较, $p < 0.05$)

Fig. 3 Effect of endosulfan in white clover leaves comet tails length

(** : compared with the control group, $p < 0.01$; Different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ level between treatments)

2.2 硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 损伤程度(Olive 尾矩)的影响

用 CASP 软件分析所得随机图像, 获得硫丹对白三叶草叶片细胞 DNA 迁移的 Olive 尾矩的影响如表 7 和图 4 所示。

表 7 硫丹不同浓度处理白三叶草叶片细胞 DNA 损伤(Olive 尾矩)变化

Tab 7 Changes of comet OTM in white clover leaves under different expose dose of endosulfan

| 硫丹浓度 Concentration (mg/kg) | 白三叶草叶片细胞彗星试验 Olive 尾矩变化(μm) ($\bar{x} \pm SD$) | | | |
|----------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | 处理时间 Treatment time | | | |
| | 7d | 14d | 21d | 28d |
| CK | 4.268±0.394 | 4.715±0.989 | 3.830±0.151 | 5.069±1.014 |
| 0.1 | 5.721±0.447 | 10.598±2.665 | 14.704±3.313 | 16.108±3.386 |
| 1.0 | 10.638±0.574 | 16.583±1.468 | 18.073±4.647 | 22.739±6.357 |
| 10.0 | 13.146±1.286 | 22.096±1.884 | 24.461±5.634 | 25.185±7.209 |

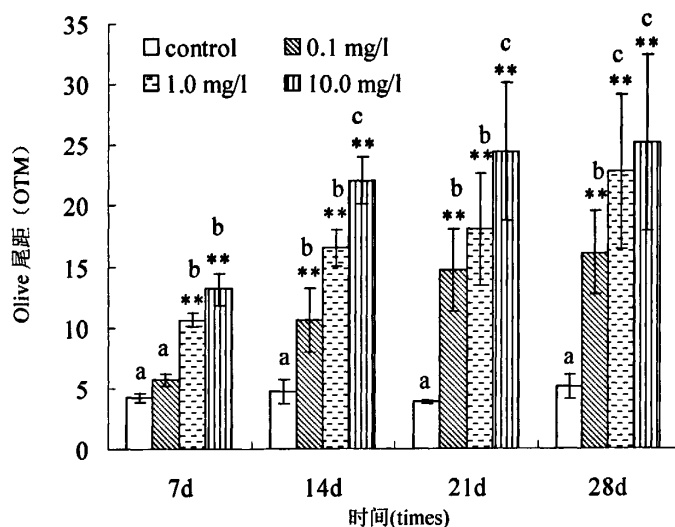


图 4 硫丹对蚕豆白三叶草叶片 DNA 损伤程度(Olive 尾矩)的影响
 (*: 与对照组比较, $p < 0.01$; a/b/c/d: 组间进行比较, $p < 0.05$)

Fig. 4 Effect of endosulfan on comet OTM in white clover leaves
 (**: compared with the control group, $p < 0.01$; Different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ level between treatments)

由表 7 和图 4 可以看出, 硫丹处理后, 各剂量组对白三叶草叶片细胞 DNA 均有损伤作用, 而且随着浓度的增加, 彗星 Olive 尾矩的值随之增加, 这说明 DNA 损伤程度随硫丹的剂量增加而增大。各处理组相比, 受损细胞 DNA 的彗星 Olive 尾矩出现显著性差异($p < 0.05 \sim p < 0.01$)。

3. 讨论

自从 Singh 等 (1988)建立了彗星试验以来, 该实验因快速、简便、灵敏等特性, 被广泛的应用于基因损伤和生物检测研究 (Lee et al., 1999)。经过不断改进和完善, 用该方法检验的基因损伤已成为鉴别遗传毒性物质的灵敏标志物 (Mitchelmore et al., 1998; Steinert, 1999)。彗星试验能够检测到受到物理或化学影响造成的单个细胞的 DNA 损伤 (Rojas et al., 1999; Reinecke et al., 2004)。比较以往的 DNA 损伤研究技术, 彗星实验可以在 DNA 发生修复之前, 快速检验 DNA 损伤, 而不需要等到有丝分裂才开始进行, 因此对 DNA 损伤的测试更为灵敏 (Chen et al., 2004; Qiao et al., 2007)。虽然国内外对彗星实验进行报道的文献有很多, 但是以蚯蚓和白三叶草为研究对象, 通过彗星实验方法, 研究硫丹对的基因毒性的研究并不多。

本研究发现硫丹不同浓度处理后, 均可对蚯蚓和白三叶草细胞 DNA 造成损伤, 同对照组相对比具有显著性差异。本实验结果表明, 0.1mg/kg~10.0mg/kg 硫丹均可导致检测

材料细胞 DNA 迁移距离显著增长和 Olive 尾距的显著升高 ($p < 0.01$), 导致明显的 DNA 损伤, 且随着染毒剂量的增加呈现明显的剂量-效应关系。Bajpayee 等(2006)采用彗星试验测定了硫丹对中国仓鼠和人体淋巴细胞的 DNA 损伤, 结果也发现, 随着硫丹的浓度的升高, 细胞 DNA 的损伤程度逐渐增大, 具有明显的剂量-效应关系。由实验结果可以看出, 在同一种浓度硫丹暴露下, 随着暴露时间的延长, 蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤程度逐渐增加, 引起细胞 DNA 迁移距离显著增长和 Olive 尾距也显著升高 ($p < 0.01$)。本实验室 Song 等 (2009) 研究中曾将蚯蚓于莠去津中分别暴露 7d、14d、21d 和 28d, 结果显示: 在相同暴露浓度下, 随着暴露时间的延长, 蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤程度也是逐渐增加, 具有时间-效应关系。

硫丹引起生物体细胞DNA损伤的过程不是一个瞬间过程, 而是一个缓慢的过程, 其原因可能在于: 第一, 硫丹的代谢产物可能也具有一定的DNA损伤能力, 使得其在代谢过程中加重了体细胞DNA损伤; 第二, 硫丹是通过抑制生物体细胞DNA的损伤修复而引起DNA损伤积累的, 使得随着时间的增加, DNA损伤增加。Sharma 等 (2007) 研究报告0.25ug/L的硫丹就可对鱼 (*Mystus vittatus*) 造成基因损伤。Yuquan 等 (2000)采用彗星试验、姐妹染色体交换试验和微核试验研究了硫丹对HepG2细胞株毒性测试, 发现硫丹造成了显著的DNA损伤。这些试验表明硫丹对生物体具有基因毒性。

彗星试验在国外有关研究领域内已得到了广泛应用, 但在以前研究中, 彗星实验多是利用动物细胞研究 DNA 的损伤和修复。植物基因毒性评价系统是进行环境污染原位监测的最好方法之一 (Tomos et al., 2000), 而且利用植物彗星实验进行环境致突变物的检测 (Gabriele et al., 2001), 表明植物彗星实验和动物细胞彗星实验一样可靠, 提供了环境污染检测的一种手段, 所以有必要进一步拓展植物彗星实验的研究, 建立环境污染引起植物 DNA 损伤的监测系统, 及时有效的进行环境污染的基因毒性研究。

本研究首次利用白三叶草作为受试生物材料, 进行污染物的彗星试验检测试验。通过实验发现, 和对照处理相比, 经过硫丹处理后白三叶草叶片细胞能够以彗星试验检测 DNA 损伤, 而且随硫丹处理浓度的增加和暴露染毒时间的延长, 细胞核产生的伤害程度也随之增加。由此表明白三叶草叶片能应用于植物彗星实验, 研究环境污染对植物 DNA 的损伤。

第四章 硫丹对土壤微生物群落多样性的 DGGE 分子指纹分析

传统的土壤生态系统中微生物群落多样性及结构分析大多是将微生物进行分离培养,然后通过一般的生物化学性状,或者特定的表现型来分析,局限于从固体培养基上分离微生物。培养基的成份影响微生物的生长状况,故培养基的选择可强烈影响所得菌落的多样性。据估计,土壤中可培养的微生物一般只占微生物总量的 0.1%~1%左右,最多不超过 10% (Muyzer et al., 1999; Edrick et al., 2000),而大多数虽然存在而无法被培养。由于自然环境中微生物原始生存状态的复杂性,用常规的分​​离培养方法难以全面的评估微生物群落多样性 (Amann et al., 1995; Engelen et al., 1998; 邢德峰等, 2006)。随着分子生物学新技术向环境科学领域的不断渗透,不经过传统培养,直接从土壤中提取微生物总 DNA,利用微生物遗传多样性来进行污染物环境风险的评价的方法,正被广泛采用 (Torsvik et al., 1998; Yang et al., 2000; 李志岗等, 2001)。PCR-DGGE 方法是基于从土壤样品中直接提取出微生物群体的基因组 DNA 后,选择对大多数细菌的 16Sr DNA 基因都能有效扩增的引物进行特异性的 PCR 扩增,然后对 PCR 产物运用 DGGE 电泳方法进行分离和鉴定,从而得出土壤微生物群体多样性的信息。

第一节 土壤微生物基因组提取方法的确立

土壤中总 DNA 提取效率是决定微生物区系分析准确性的先决条件,作为土壤微生物群落分子分析方法的基础,最重要的一步就是从土壤样品中尽量毫无偏差地提取出高质量的、具有代表性的微生物总基因组 DNA,从而确保实验结果的高保真性。获得了高质量的 DNA 后,选取恰当的引物和采用合适的扩增条件是获得土壤微生物多样性目的条带的必要手段。因此,建立有效而合理的基因组提取及扩增方法是分析微生物群落结构所不可缺少的重要步骤。

1. 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤

供试土样采自山东农业大学教学基地田间土壤,时间是 2008 年 9 月下旬,土壤的含水量在 10%左右。取样方法是按照 5 点采样法,除去土壤表面的杂草、枯枝落叶和 1cm 左右的表层土,采样深度约为 20cm。取回后,剔除石砾和植物残体等杂物,立即过 40

目筛，装袋，于 4℃ 冰箱中保存待用。测得土壤理化性质如表 8 所示。土壤理化性质的测定方法参照文献（鲁如坤，2000）。

表 8 土壤理化性质

Table 8 The physical and chemical character of soil

| 土壤类型 | 有机质 g/kg | 速效钾 mg/kg | 有效氮 mg/kg | 速效磷 mg/kg | 田间最大 持水量 % | pH 值 |
|------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|------|
| 棕壤土 | 17.6 | 125.7 | 132.3 | 18.4 | 18.5 | 7.6 |

1.1.2 供试试剂

| | | |
|----------|------|----------------|
| 氯仿 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 博山化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 十二烷基硫酸钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市广成化学试剂厂 |
| 乙二醇四乙酸 | 分析纯 | 天津市巴斯夫化工有限公司 |
| 盐酸 | 分析纯 | 天津市巴斯夫化工有限公司 |
| 异丙醇 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 异戊醇 | 生化试剂 | 天津市科密欧化学试剂开发中心 |
| 三羟甲基氨基甲烷 | 生化试剂 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| CTAB | 生化试剂 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 溴化乙锭 | 生化试剂 | Sigma 公司 |
| 蛋白酶 K | 生化试剂 | A mersco 公司 |

1.1.3 分子生物学材料

Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、Mg²⁺、dNTP、DNA 分子量标准 DL2000、DNA 纯化回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司；PCR 产物回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司。

寡聚核苷酸引物：

本研究所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 供试仪器

| | |
|--|-----------------|
| HPS-280 型生化培养箱 | 哈尔滨东联电子技术开发有限公司 |
| 202 型电热鼓风干燥箱 | 龙口先科仪器公司 |
| BCD-200C 冰箱 | 青岛海尔集团 |
| 微波炉 | 广州美的集团 |
| PHSJ-3F 精密 pH 计 | 上海精密雷磁公司 |
| LDZX-50B 立式电热蒸汽灭菌锅 | 上海悦丰仪表有限公司 |
| Centrifuge5804 台式高速冷冻离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| TGL-16G 高速台式离心机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| LX-100 掌上离心机 | 江苏海门其林贝尔公司 |
| LQP-B 制冰机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| KQ-500DB 型数控超声波清洗器 | 昆山市超声仪器有限公司 |
| 万分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| 百分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| DYY-6C 电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| 2.5、10、20、100、200、1000、5000uL 微量取液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| MyCycler PCR 扩增仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| Gel Doc XR 凝胶成像仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 电热恒温水浴锅 | 北京长风仪器仪表公司 |

1.1.5 土壤总 DNA 的提取

采用三种不同的方法对土壤基因组进行提取，以期建立了一种高效、简便的土壤 DNA 提取方法，为在分子生物学水平上研究农田土壤微生物提供了基础，同时为土壤微生物分子生态学的其他方面的研究提供参考。

1.1.5.1 方案 a 采用 Zhou 所报道的方法

参照 Zhou (1996) 的方法，并加以改进：

- (1) 称取土壤样品 5g，加入 13.5 mL 的 DNA 提取缓冲液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，100 mM EDTA(pH 8.0)，100 mM 磷酸钠 (pH 8.0)，1.5 M NaCl，1% CTAB]；
- (2) 加入 100 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL)，于 225rpm 摇床 37 $^{\circ}$ C 摇动 30min；
- (3) 加入 1.5 mL 20% SDS，65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h，并每 10-20min 轻轻颠倒几下；

(4) 室温 6000×g 离心 10min, 收集上清, 转移到 50 mL 离心管中;

(5) 土壤沉淀再加入 4.5 mL 提取液和 0.5 mL 20%的 SDS, 涡旋 10s, 65℃水浴 10min, 室温 6000×g 离心 10min, 收集上清合并于上次上清;

(6) 重复上述操作, 收集上清与前两次上清合并;

(7) 上清液与等体积的氯仿-异戊醇(24:1 体积比)混合, 离心, 吸取水相转移至另一 50mL 离心管中;

(8) 以 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 1 h 或过夜;

(9) 室温 16000×g 离心 20min, 收集核酸沉淀;

(10) 用冷的 70%乙醇洗涤沉淀, 重悬于灭菌的无离子水中, 最终体积为 500μL。

1.1.5.2 方案 b 采用 Kuse (1997) 所报道的方法, 并加以改进。

(1) 称取土壤样品 5g, 加入 20 mL 的 DNA 提取缓冲液 [50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS], 于 70℃水浴中 1h(每隔 10-20min 轻轻颠倒几下);

(2) 6000rpm 离心 10min, 将上清转移至新离心管中;

(3) 沉淀加 1.5mL 提取液(50 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 100mM NaCl), 放置在 -20℃冰浴和 65℃水浴中反复冻融, 循环 3 次;

(4) 10000rpm 离心 10min 取上清;

(5) 合并上清, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 充分混匀后 10000rpm 离心 15min, 吸取上清至新离心管中, 等体积加入异丙醇, 轻轻混匀并放入冰箱中 4℃过夜;

(6) 10000rpm 离心 15min, 弃上清收集核酸沉淀;

(7) 加入预冷的 70%乙醇洗涤两次, 空气干燥后, 重悬于灭菌的无离子水中, 最终体积为 500μL。

1.1.5.3 方案 c 采用 Tsai (1991) 所报道的方法

(1) 称取土壤样品 5g, 加入 10mL 磷酸盐缓冲液, 于 150rpm 摇床 30℃摇动 15min;

(2) 10000rpm 离心 20min, 弃上清;

(3) 取沉淀加入裂解液 I (150 mM NaCl; 100 mM EDTA)7.5mL, 50mg/mL 溶菌酶 2.5mL, 37℃水浴 2h(每隔 10-20min 轻轻颠倒几下);

(4) 10000 rpm 离心 15min 取上清, 沉淀加裂解液 II(150 mM NaCl;500 mM Tris-HCl;10%SDS)10mL, 放置在-20℃冰浴和 65℃水浴中反复冻融, 循环 3 次;

(5) 10000rpm 离心 15min 取上清;

(6) 加入等体积的氯仿/异戊醇, 充分混匀后 10000rpm 离心 15min, 吸取上清至新

离心管中，加入等体积异丙醇，轻轻混匀并放入冰箱中 4℃ 过夜；

(7) 10000rpm 离心 15min，弃上清收集核酸沉淀；

(8) 加入预冷的 70%乙醇洗涤两次，空气干燥后,重悬于灭菌的无离子水中，最终体积为 500 μ L。

1.1.6 不同方法所得粗提 DNA 质量测定

提取所获得的 DNA 的质量通过琼脂糖凝胶电泳检测，试验中采用 0.8%的琼脂糖进行电泳。

实验步骤：

(1) 凝胶制备：称 1.0g 琼脂糖加入三角瓶中，倒入 100mL 1 \times TAE 溶液，混匀，于微波炉中加热熔化，待稍冷却后，倒入凝胶槽中，水平插上样品梳，等待胶凝固；

(2) 小心拔出梳子，将凝胶连同凝胶槽一同放入加有足够 1 \times TAE 缓冲液的电泳槽中，缓冲液高出凝胶表面约 0.5cm，校准水平；

(3) 取 1 μ L 加样缓冲液点于封口膜上，再移取 5 μ L DNA 样品混合于加样缓冲液，然后用微量移液器将样品加入凝胶的样品孔中，再吸取 5 μ L 的 λ -Hind digested Marker 加入一端点样孔中；

(4) 接通电极，将电压调制到 120v，电泳时间为 45min，使 DNA 样品由阴极向阳极移动；

(5) 电泳结束后，在 EB 染色液中染色 10min，去离子水浸洗 2min 后，在 Gel XR 凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

1.1.7 粗提 DNA 的纯化

按照 1.1.5 所述的三种 DNA 提取方法提取的 DNA 还是粗提的 DNA 溶液，其中还含有大量的其他杂质，如多糖、蛋白质、RNA，最主要的是含有酶促反应抑制剂腐殖酸类物质，因此，粗提 DNA 溶液还需要经过纯化，才能用于 PCR 等后续的分析。

本实验采用上海生工生物工程技术有限公司的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 SK1132 对粗提 DNA 进行纯化，以期能尽可能去除其中的各类杂 DNA 质。具体步骤如下：

(1) 通过琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其它杂质尽可能分开，然后在紫外灯下用干净的手术刀割下含需回收 DNA 的琼脂块，放入 1.5mL 离心管中；

(2) 按 400 μ L/100mg 琼脂糖凝胶的比例加入 Binding Buffer II，置于 50-60℃ 水浴中 10min 使胶彻底融化。加热融胶时，每 2min 混匀一次；

(3)将融化的胶溶液转移到套放在 2 mL 收集管内的 UNIQ-10 柱中,室温放置 2min。
8000rpm 室温离心 1min;

(4)取下 UNIQ-10 柱,倒掉收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中,加入 500 μ l Wash Solution, 8000rpm 室温离心 1min;

(5)重复步骤 4 一次;

(6)取下 UNIQ-10 柱,倒掉收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中,12000rpm 室温离心 15s。

(7)将 UNIQ-10 柱放入一根新的 1.5mL 离心管中,在柱子膜中央加 40 μ L Elution Buffer, 室温放置 2min;

(8)12000rpm 室温离心 1min,离心管中的液体即为回收的 DNA 片段,于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存;

(9)取 5 μ L 纯化的 DNA 样品与 1 μ L 加样缓冲液混合,然后用微量移液器将样品加入凝胶的样品孔中,再吸取 5 μ l 的 λ -Hind digested Marker 加入一端点样孔中,在 0.8%的琼脂糖凝胶板上进行电泳。电泳后经 EB 染色,在 Gel XR 凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

1.1.8 不同提取方法对后期实验适用性分析

由于从土壤中提取的总 DNA 需要用于后期的分子生物学分析实验,所以要对三种不同法获得的 DNA 进行后期实验的适用性分析,主要通过对特定目的片断进行扩增的效果比较,来选取合适的提取方法。该分析包括对目的片断的扩增以及扩增产物的电泳检测。

进行 V3 可变区的常规 PCR 扩增:

用于 PCR 扩增的引物序列为:

正向引物 338F: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG
GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3':

反向引物 518R: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'

(正向引物的 5' 端连接 GC 发卡主要是为了增加 DNA 双链解链区的数量)

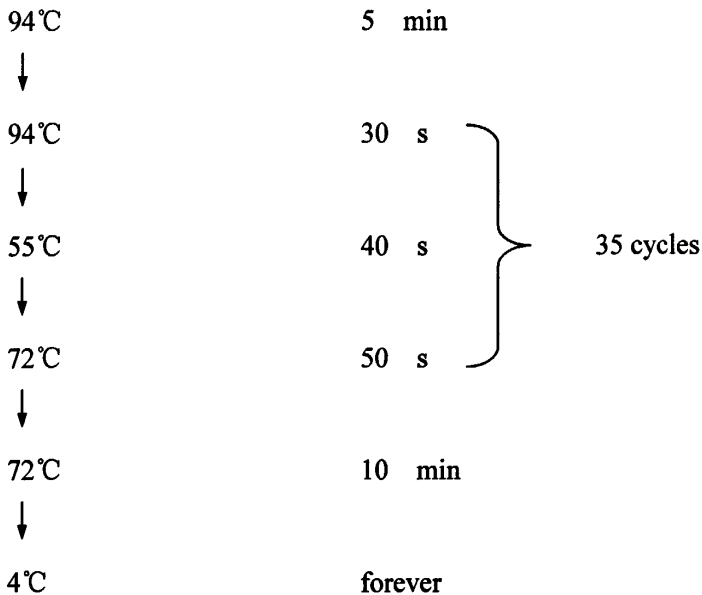
表 9 PCR 扩增反应体系 (50 μ L)

Table 9 Amplification reaction system of PCR (50 μ L)

| 组成成分 | 加入量 |
|-------------------------|--------------|
| 10 \times PCR buffer | 5.0 μ L |
| Mg ²⁺ (25mM) | 5.0 μ L |
| dNTP (10mM each) | 2.0 μ L |
| 引物 338F (10 μ M) | 1.0 μ L |
| 引物 518R (10 μ M) | 1.0 μ L |
| Taq 酶 (5U/ μ L) | 1.0 μ L |
| 模块 (纯化后的 DNA) | 1.0 μ L |
| ddH ₂ O | 34.0 μ L |

依次在 0.2mL 的 PCR 薄壁管中加入 ddH₂O、10 \times PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、338F、518R、模板 DNA，混匀后瞬间离心，置于 PCR 仪上进行 PCR 扩增循环，预热后向各管中加入 Taq 酶，继续循环，PCR 反应条件如下：

PCR 反应条件为：



反应结束后取 5 μ L 扩增产物与 1 μ L 加样缓冲液混合，然后用微量移液器将样品加入凝胶的样品孔中，再吸取 5 μ L 的 DL2000 Marker 加入一端点样孔中，在 1.2%的琼脂糖凝胶板上进行电泳。电泳后经 EB 染色，在 Gel XR 凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

2. 结果与分析

2.1 三种方法获得基因组 DNA 的电泳检测

通过与标准分子量 DNA Marker 比较，可以比较不同方法所获得的基因组 DNA 的分子量大小，片断的均匀程度并粗略估计其含量。我们采用了 λ -Hind digested Marker 作为标准分子量 DNA，结果显示(图 5)，三种方法均可以获得土壤微生物总 DNA，所得 DNA 的大小在 23kb 左右。由方法 a 所获得的 DNA，可形成一条较亮的条带，DNA 片段大小比较均一，且获得的产物的量较多，提取效果较好。而由方法 b, c 所得的 DNA 片段比较分散，形成弥散带，所以 DNA 的质量较差，条带的亮度较暗，提取的效果同方法 a 相比较差。

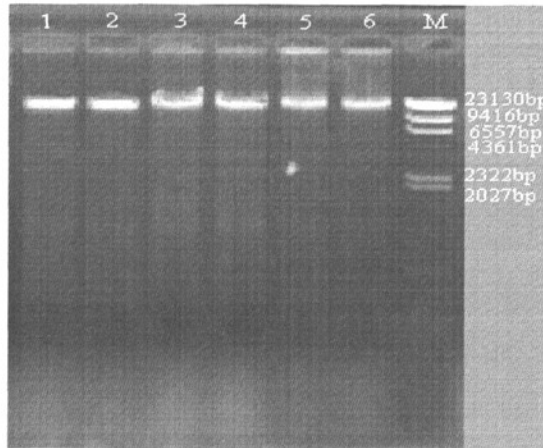


图 5 三种不同方法提取效果的电泳图谱

(M: λ -Hind digested Marker; 1, 2:方法 a 提取结果; 3, 4:方法 b 提取结果; 5, 6:方法 c 提取结果)

Fig.5 Electrophoretogram of DNA extraction from the soil using three different extraction methods

(M: λ -Hind digested Marker ; 1,2: the result of the method a;3,4:the result of the method b; 5,6: the result of the method c)

2.2 纯化后 DNA 的电泳检测

纯化后的 DNA 的电泳图见图 6，由电泳图可以看出，方法 a 提取的 DNA 经纯化后有较为清晰的单泳条带，且大小一致，说明粗提的 DNA 经纯化后得到了较高含量的回收产物。而方法 b 则得到了一条较为模糊的条带，说明 DNA 的均匀性得以提高，但回收后 DNA 的含量却进一步降低，可能会对后期的扩增产生一定影响。方法 c 提取的 DNA 产物经纯化后，条带十分模糊，这与该方法所提的 DNA 质量较差，含量低有关。

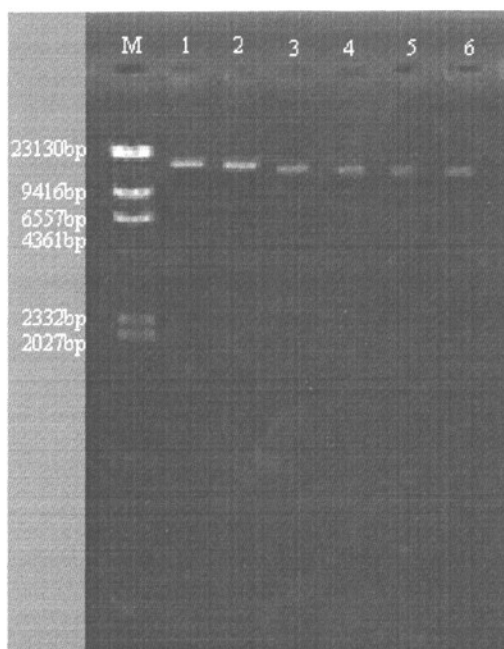


图 6 三种方法纯化后的电泳图谱

(M: λ -Hind digested Marker; 1, 2:方法 a 提取结果; 3, 4:方法 b 提取结果; 5, 6:方法 c 提取结果)

Fig.6 Electrophoretogram of purified DNA with three different extraction methods

(M: λ -Hind digested Marker ; 1,2: the result of the method a;3,4:the result of the method b; 5,6: the result of the method c)

2.3 不同方法提取的 DNA 扩增效果检测

虽然通过纯化后 DNA 的纯度得以提高，在一定程度上去除了腐殖酸和蛋白质的污染，减轻其对后期分子生物学实验的干扰，但仍需要对所纯化的 DNA 进行检测，以判断其对后期实验的适用性。我们采取两对引物对目的片断进行 PCR 括增，扩增结果及

分析如图 7。

试验结果显示用方法 a 所提 DNA 扩增得到的 PCR 产物亮度最高，其产量及浓度最高，而方法 b 所提 DNA 扩增得到的产物亮度要比方法 a 弱，表明产物的较少，扩增效果稍差，而由方法 c 所提 DNA 扩增得到目的产物并没有被观察到，可能是由于产物量过低，或未扩增。从结果可以看出，方法 a 是一种最适合本实验的提取方法，而方法 b 也是一种可以采用的策略，方法 c 则不适用于本实验。表明这三种提取方法对本试验所用土壤 DNA 的提取效果存在较大差异。

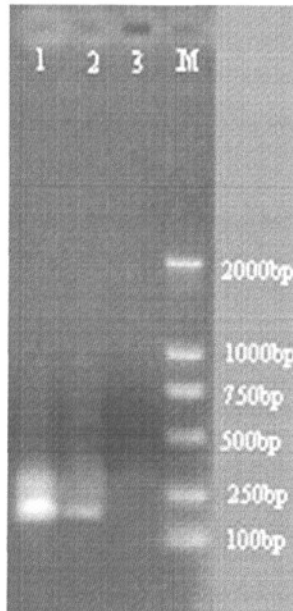


图 7 以三种不同方法提取得到的 DNA 为模板扩增得到的 V3 片段电泳图谱

(M: DL2000 Marker; 1:方法 a 提取的 DNA; 2:方法 b 提取的 DNA; 3:方法 c 提取的 DNA)

Fig.7 Agarose gel electrophoretogram of V3 fragment amplified by three different DNA

(M: DL2000 Marker; 1: DNA extracted with method a; 2: DNA extracted with method b; 3: DNA extracted with method c)

3. 讨论

近年来，国内外学者采用不同的原位提取方法获取土壤微生物 DNA，认为提取土壤微生物 DNA 的关键是最大限度地保证 DNA 的破膜释放，并且尽可能避免腐殖质的污染 (Smalla, 1993; Duarte, 1998; Elsas, 1998)。由于土壤成分和类型的复杂性，很

难找到一种适用所有土壤的 DNA 提取方法,而且土壤中含有大量的腐殖质和有机质成分,容易造成 DNA 产率降低,因此,从土壤中高效地提取 DNA 具有相当难度。本研究在原位裂解法的基础上,比较了三种基于不同裂解原理的组合方法,探讨了在土壤微生物中提取 DNA 的方法,旨在建立一种高效、可靠和适合于微生物分子生态学研究的 DNA 提取方法。本研究方法 a 采用酶-化学联合原位提取法,其中十二烷基磺酸钠(SDS)被广泛应用于 DNA 提取中来裂解细胞(Sambrook et al., 1989),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)可以有效的降低腐殖质酸的影响(Yeates and Gillings, 1998),因此选定这两种物质作为裂解液的主要成分。方法 a 提取的样品 DNA 效率最高,说明酶化学试剂与化学试剂的联合使用,能够对土壤中的 DNA 进行有效的裂解,而由于相对比较温和,从而较好地保证了整个基因组 DNA 的完整性。而由化学法与物理法相结合的方法 b 则由于使用冻融法,对细胞及 DNA 的破碎能力较强,使其断裂比较严重且不均匀,造成提取的 DNA 效果较差。方法 c 由化学、物理和酶法联合使用,可能是由于化学试剂及酶已经对土壤中的细胞进行了较大程度的裂解,而冻融的方法使裂解出的 DNA 片段进一步断裂,造成对 DNA 的破碎过于强烈,使得 DNA 的质量与提取效率过低。通过对三种方法提取 DNA 效果的电泳检测比较,纯化效果比较,以及用两种不同引物进行的 PCR 扩增结果的比较,相互补充印证了方法 a 在本试验中的优越性,因此在整个试验中我们的样品均以此方法进行提取。

第二节 常规 PCR 扩增方法的优化

本实验中所用的引物为对细菌通用的引物 338F 和 518R,采用不同的方法对目的基因(V3 可变区)进行 PCR 扩增,通过对不同策略扩增效果的比较,以期找到一种尽可能地提高扩增效率和产物产量的扩增策略。

1. 材料与方法

1.1 药品试剂

Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、 Mg^{2+} 、dNTP、DNA 分子量标准 DL2000、DNA 纯化回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;SYBR Green I 索来宝公司。

寡聚核苷酸引物,本研究所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 主要仪器

HPS-280 型生化培养箱

哈尔滨东联电子技术开发有限公司

| | |
|--|-----------------|
| 202 型电热鼓风干燥箱 | 龙口先科仪器公司 |
| BCD-200C 冰箱 | 青岛海尔集团 |
| 微波炉 | 广州美的集团 |
| PHSJ-3F 精密 pH 计 | 上海精密雷磁公司 |
| LDZX-50B 立式电热蒸汽灭菌锅 | 上海悦丰仪表有限公司 |
| Centrifuge5804 台式高速冷冻离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| TGL-16G 高速台式离心机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| LX-100 掌上离心机 | 江苏海门其林贝尔公司 |
| LQP-B 制冰机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| KQ-500DB 型数控超声波清洗器 | 昆山市超声仪器有限公司 |
| 万分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| 百分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| DYY-6C 电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| 电热恒温水浴锅 | 北京长风仪器仪表公司 |
| 2.5、10、20、100、200、1000、5000 μ L 微量取液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| MyCycler PCR 扩增仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| Gel Doc XR 凝胶成像仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| DCode 基因突变系统 | 美国 Bio-Rad 公司 |

1.3 试剂配制

① 40% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (Acrylamide/Bis 37.5:1)

| | |
|------------------------|----------|
| Reagent | amount |
| Arylamide | 38.93g |
| Bs-acrylamide | 1.07g |
| Add ddH ₂ O | to 100ml |

Filter through a 0.45 μ filter and store at 4 °C.

② 10% 过硫酸胺 (Ammonium persulfate)

| | |
|---------------------|--------|
| Reagent | amount |
| Ammonium persulfate | 0.1g |

Add ddH₂O 1.0mL

store at -20°C for about a week

③ 50×TAE Buffer

Reagent Amount

Tris Base 242g

Acetic acid glacial (冰乙酸) 57.1mL

0.5M EDTA pH8.0 100mL

Add ddH₂O to 1L

Store at room temperature

④ Denaturant stock solution (10%)

| | 40% Acrylamide/Bis (mL) | 50×TAE Buffer (mL) | Formamide (mL) | Urea (g) | ddH ₂ O |
|------|----------------------------|-----------------------|-------------------|----------|--------------------|
| 0% | 25 | 2 | 0 | 0 | To 100 mL |
| 10% | 25 | 2 | 4 | 4.2 | To 100 mL |
| 20% | 25 | 2 | 8 | 8.4 | To 100 mL |
| 30% | 25 | 2 | 12 | 12.6 | To 100 mL |
| 40% | 25 | 2 | 16 | 16.8 | To 100 mL |
| 50% | 25 | 2 | 20 | 21.0 | To 100 mL |
| 60% | 25 | 2 | 24 | 25.2 | To 100 mL |
| 70% | 25 | 2 | 28 | 29.4 | To 100 mL |
| 80% | 25 | 2 | 32 | 33.6 | To 100 mL |
| 90% | 25 | 2 | 36 | 37.8 | To 100 mL |
| 100% | 25 | 2 | 40 | 42 | To 100 mL |

1.4 实验方法

1.4.1 常规 PCR 扩增方法的优化

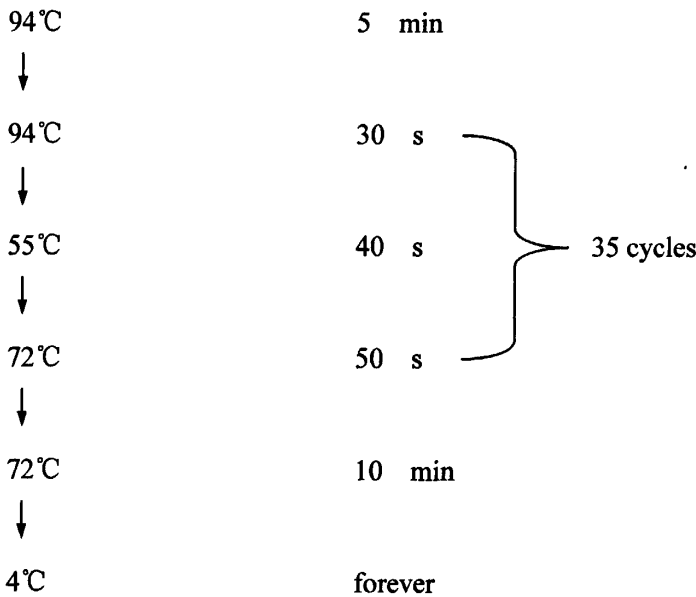
反应体系为 50μL，采用扩增细菌 V3 区的通用引物（338F、518R），通过改变扩增反应体系中的 Mg²⁺、dNTP、引物的条件来使产物获得最好的效果。

表 10 PCR 扩增反应体系 (50 μ L)

Table 10 Amplification reaction system of PCR (50 μ L)

| | 不同处理组 | | | | | |
|-----------------------------------|-------|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 10 \times PCR buffer/ μ L | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Mg ²⁺ (25mM) / μ L | 5 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 |
| dNTP (10mM each) / μ L | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| 引物 338F (10 μ M) / μ L | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 引物 518R (10 μ M) / μ L | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Taq 酶 (5U/ μ L) / μ L | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 模块 DNA/ μ L | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ddH ₂ O/ μ L | 34 | 33 | 31 | 32 | 31 | 29 |

依次在 0.2mL 的 PCR 薄壁管中加入 ddH₂O、10 \times PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、338F、518R、模板 DNA，混匀后瞬间离心，置于 PCR 仪上进行 PCR 扩增循环，预热后向各管中加入 Taq 酶，继续循环，PCR 反应条件如下：



反应结束后取 5 μ L 扩增产物与 1 μ L 加样缓冲液混合，然后用微量移液器将样品加入凝胶的样品孔中，再吸取 5 μ L 的 DL2000 Marker 加入一端点样孔中，在 1.2% 的琼脂糖凝胶板上进行电泳。电泳后经 EB 染色，在 Gel XR 凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

1.4.2 DGGE 凝胶电泳检测

1.4.2.1 制胶组分

①HI 注射器中胶溶液的配制：高浓度胶

16mL 55% Denaturant/10% gel

70 μ L 10% 过硫酸铵

18 μ L TEMED

②LO 注射器中胶溶液的配制：低浓度胶

16mL 45% Denaturant/10% gel

70 μ L 10%过硫酸铵

18 μ L TEMED

1.4.2.2 制胶步骤

(1) 将玻璃板固定并安置在模具上，卡紧模具上旋钮。

(2) 连接 Luer coupling 和注射器。

(3) 设置注射器固定器上的体积设定指示器为需要的凝胶体积。拧紧体积调节螺母。

16*16cm 凝胶(1cm 厚)，须设定为 14.5。

(4) 将配好的高、低浓度的凝胶溶液按照所需的体积吸入两个注射器式上扬器中，并固定上扬器。

(5) 将与细管相连的针头的一侧固定在凝胶夹具顶端，开始灌胶。

(6) 缓慢转动齿轮，稳定地传送胶溶液。

(7) 小心插入梳子到所需的深度。梳子要垂直。胶聚合约 60 min 或更长时间。

(8) 胶聚合后，小心取出梳子。

1.4.3 电泳

所用仪器系统为 BIO-RAD DCode™ Universal Mutation Detection System。

(1) 待胶溶液凝聚后，使用移液枪或注射器用蒸馏水冲洗掉加样孔内未聚合的残留胶

溶液，并将制好的凝胶及夹具安装好，并放入电泳槽内，在两块玻璃板之间加满 $1\times$ TAE 电泳缓冲液，盖上控温装置。连接电泳仪电源。(此时电源不打开)

(2) 依次打开电源、回流泵及控温装置，设置需要的温度为 60°C ，等待电泳缓冲液加热至设置温度。

(3) 当电泳缓冲液温度达到设置温度后，移去控温装置上的盖子，用移液枪将已混合的样品 PCR 产物加入到加样孔中。点样完毕后将控温装置的盖子移回原处。

(4) 待电泳缓冲液温度重新升高至设置温度后，打开电泳仪电源，设置电泳所需电压与时间，按开始键开始电泳。

1.4.4 DGGE 电泳条件

水温： 60°C

上样量： $30\mu\text{L}$ PCR 产物

电压： 150V

电泳时间： 6h

1.4.5 染色

采用 SYBR Green I 染色 30min 。

1.4.6 观察分析

采用 BIO-RAD 公司的 Gel DocXR 凝胶成像系统拍照，利用定量软件 Quantity One 进行分析。

2. 结果与分析

2.1 常规 PCR 的扩增结果

从电泳图 8 可以看出，采用常规 PCR 方法对目的基因进行的扩增中，处理组 1、2、3 得到了扩增产物（约 210bp 大小），而处理组 4、5、6 没有扩增出目的片段。处理组 3 扩增出的产物亮度最好，目的片段产量最多。处理组 1 和 2 扩增的产物条带亮度较弱，目的片段产量不理想。

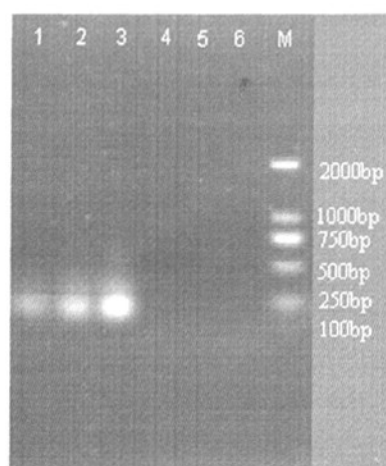


图 8 土壤 16SrDNA 基因 V3 区常规 PCR 扩增片段

(M: DL2000 Marker; 1:处理组 1; 2: 处理组 2; 3: 处理组 3; 4: 处理组 4; 5: 处理组 5; 6: 处理组 6)

Fig.8 PCR amplified 16Sr DNA(v3) gene of different soil samples with routine PCR strategy

(M: DL2000 Marker; 1: group 1; 2: group 2; 3: group 3; 4: group 4; 5: group 5; 6: group 6;)

2.2 DGGE 凝胶电泳结果

将常规 PCR 方法中处理组 1、2、3 所获得的扩增产物进行 DGGE 凝胶电泳，所得结果见图 9。从图中可以看出，处理组 3 扩增产物通过变性凝胶获得了较多的条带，目的片段产量最多，处理组 1 和 2 所获得条带数量较少。

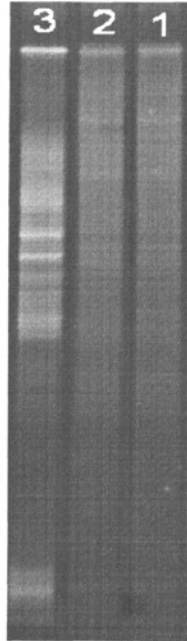


图 9 土壤 16SrDNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱

(1:处理组 1; 2: 处理组 2; 3: 处理组 3)

Fig.9 DGGE fingerprint of 16Sr DNA(v3) gene from different soil

(1: group 1; 2: group 2; 3: group 3)

3. 讨论

在目前的分子生态学研究中，许多实验技术都以 PCR 技术作为依托，在此基础上进行进一步的研究和分析。所以 PCR 产物的质量与产量是影响后期实验的重要因素，高质量的扩增产物，有利于后期的电泳分离以及文库的构建等，提高电泳的分离效果。从复杂的 DNA 模板通过 PCR 扩增基因，要受到许多参数的影响。PCR 最好的结果就是在凝胶中只观察到目的产物的单一条带，但是，较弱的带、多条带，甚至没有条带的情况时常出现。许多参数变化影响 PCR 的扩增结果，这些参数包括循环次数、 Mg^{2+} 、dNTP，引物和模板，同过改变这些条件来使产物获得最好的效果。对于复杂的环境样品，在运用 DGGE 分离技术的基础上，应先通过对 PCR 扩增方法进行优化，以提高扩增的效果，从而为后期的电泳分析提供良好的分析样品。

第二节 Nest-PCR 扩增方法

巢式 PCR (Nest-PCR)，也称嵌合 PCR，是指利用两套 PCR 引物对进行两轮 PCR

扩增反应。在第一轮扩增中，外引物用以产生扩增产物，此产物在内引物的存在下进行第二轮扩增。由于 Nest-PCR 反应有两次 PCR 扩增，从而降低了扩增多个靶位点的可能性，增加了检测的敏感性；又有两对 PCR 引物与检测模板的配对，增加了检测的可靠性，表现出灵敏度高、速度快、特异性强、高效等特点。本节在优化后的常规 PCR 基础上，利用常规 PCR 所获得的扩增产物为模板，再进行一般的 PCR 扩增。通过这种 Nest-PCR 以期提高 PCR 扩增的效果，从而使得目的条带在 DGGE 凝胶上能够得到良好的分离。

1. 材料与amp;方法

1.1 药品试剂

Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、Mg²⁺、dNTP、DNA 分子量标准 DL2000、DNA 纯化回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司；SYBR Green I 索来宝公司。寡聚核苷酸引物，本研究所用引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 主要仪器

| | |
|--|-----------------|
| HPS-280 型生化培养箱 | 哈尔滨东联电子技术开发有限公司 |
| 202 型电热鼓风干燥箱 | 龙口先科仪器公司 |
| BCD-200C 冰箱 | 青岛海尔集团 |
| 微波炉 | 广州美的集团 |
| PHSJ-3F 精密 pH 计 | 上海精密雷磁公司 |
| LDZX-50B 立式电热蒸汽灭菌锅 | 上海悦丰仪表有限公司 |
| Centrifuge5804 台式高速冷冻离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| TGL-16G 高速台式离心机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| LX-100 掌上离心机 | 江苏海门其林贝尔公司 |
| LQP-B 制冰机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| KQ-500DB 型数控超声波清洗器 | 昆山市超声仪器有限公司 |
| 万分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| 百分之一电子分析天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| DYY-6C 电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| 2.5、10、20、100、200、1000、5000μL 微量取液器 | 德国 Eppendorf 公司 |

| | |
|------------------|---------------|
| MyCycler PCR 扩增仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| Gel Doc XR 凝胶成像仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 电热恒温水浴锅 | 北京长风仪器仪表公司 |
| DCode 基因突变系统 | 美国 Bio-Rad 公司 |

1.3 DGGE 凝胶试剂配制

同本章第二节 1.3 部分。

1.4 Nest-PCR 实验方法

Nest-PCR 扩增反应有两个反应体系，需要两套扩增引物。扩增体系 I 的引物为 27F 和 1492R，它们来源于大肠杆菌 16Sr DNA 基因序列的保守区域，分别位于下游序列第 8-27 和 1492-1507 碱基位置，是通用细菌引物。

正向引物 27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

反向引物 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

PCR 反应体系如下:

表 11 PCR 扩增反应体系 (50 μ L)

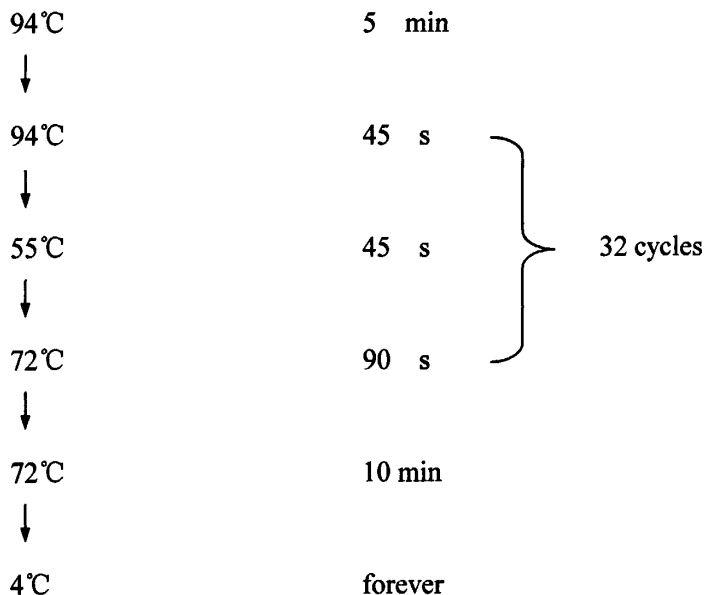
Table 11 Amplification reaction system of PCR (50 μ L)

| 组成成分 | 加入量 |
|-------------------------|--------------|
| 10 \times PCR buffer | 5.0 μ L |
| Mg ²⁺ (25mM) | 5.0 μ L |
| dNTP (10mM each) | 2.0 μ L |
| 引物 27F (10 μ M) | 2.0 μ L |
| 引物 1492R (10 μ M) | 2.0 μ L |
| Taq 酶 (5U/ μ L) | 0.5 μ L |
| 模块 DNA | 0.5 μ L |
| ddH ₂ O | 33.0 μ L |

依次在 0.2mL 的 PCR 薄壁管中加入 ddH₂O、10 \times PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、27F、1492R、模板 DNA，混匀后瞬间离心，置于 PCR 仪上进行 PCR 扩增循环，预热后向各

管中加入 Taq 酶，继续循环，PCR 反应条件如下：

PCR 扩增的程序如下：



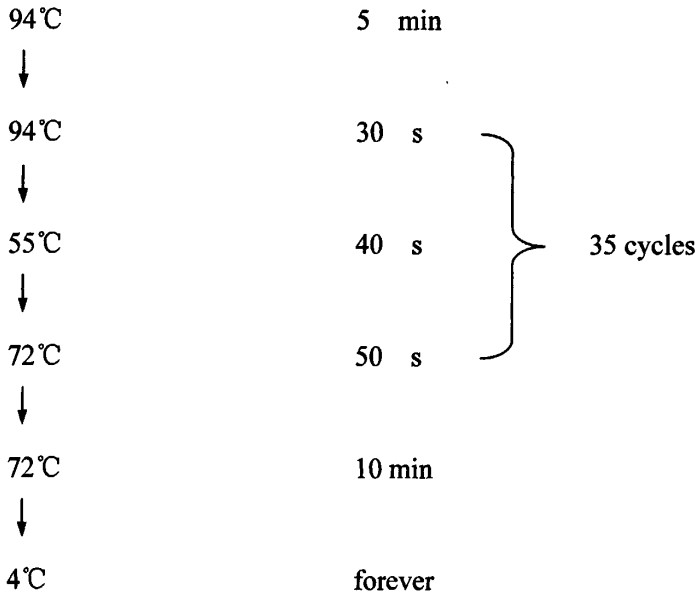
扩增体系 II：

表 12 PCR 扩增反应体系 (50μL)

Table 12 Amplification reaction system of PCR (50μL)

| 组成成分 | 加入量 |
|--------------------------|---------|
| 10×PCR buffer | 5.0 μL |
| Mg ²⁺ (25mM) | 6.0 μL |
| dNTP (10mM each) | 2.0 μL |
| 引物 338F (10μM) | 2.0 μL |
| 引物 518R (10μM) | 2.0 μL |
| Taq 酶 (5U/μL) | 1.0 μL |
| 模块 DNA (扩增体系 I 的扩增产物) | 1.0 μL |
| ddH ₂ O | 31.0 μL |

依次在 0.2mL 的 PCR 薄壁管中加入 ddH₂O、10×PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、338F、518R、模板 DNA，混匀后瞬间离心，置于 PCR 仪上进行 PCR 扩增循环，预热后向各管中加入 Taq 酶，继续循环，PCR 反应条件如下：



反应结束后取 5μL 扩增产物与 1μL 加样缓冲液混合，然后用微量移液器将样品加入凝胶的样品孔中，再吸取 5μl 的 DL2000 Marker 加入一端点样孔中，在 1.2%的琼脂糖凝胶板上进行电泳。电泳后经 EB 染色，在 Gel XR 凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

1.5 DGGE 凝胶电泳检测

同本章第二节 1.4.2 部分。

2. 结果与分析

2.1 Nest-PCR 扩增结果

扩增体系 I 获得的扩增产物电泳结果如图 10，从电泳图中看出土壤样品通过该体系得到了较好的扩增，得到的目的片段的大小约为 1700bp，与预期的结果相符，可以较好的满足下一步 PCR 扩增的需要。

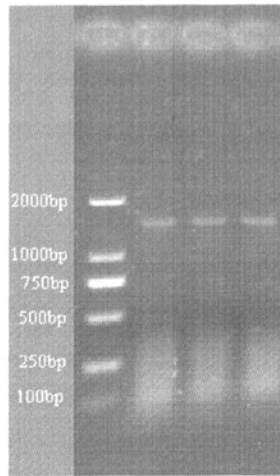


图 10 土壤 16SrDNA 基因 PCR 扩增片段

Fig.10 PCR amplified 16Sr DNA gene of different soil

扩增体系 II 获得的扩增产物和常规 PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳，电泳结果如图 11，从电泳结果来看，通过扩增体系 II PCR 扩增获得了较好的扩增产物，扩增出的基因片断大小约在 210bp 左右，与预期的结果相符，从电泳条带迁移情况来看，扩增 PCR 产物的大小较为一致。同常规 PCR 相比，Nest-PCR 所获得的扩增产物，亮度较量，PCR 产物的质量得到了较大程度的提高，这样就有利于后期的 DGGE 分析。

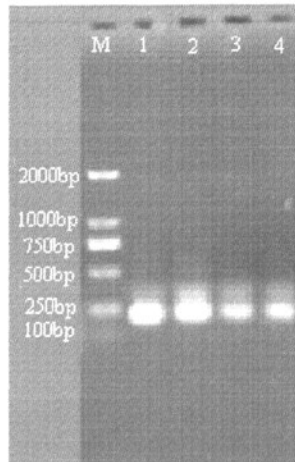


图 11 不同扩增方法获得的土壤 16SrDNA 基因 V3 区片段

(M: DL2000 Marker; 1, 2: Nest-PCR 方法; 3, 4: 常规 PCR 方法)

Fig.11 PCR amplified 16Sr DNA(V3) gene of different soil samples with different PCR strategy

(M: DL2000 Marker; 1,2: Nest-PCR strategy; 3,4: routine PCR strategy)

2.2 DGGE 凝胶电泳结果

将扩增体系 II 获得的扩增产物和常规 PCR 扩增产物进行 DGGE 凝胶电泳, 电泳结果如图 12, 从图中可以看出, 通过 DGGE 分析, 均得到了若干分离的条带。但相比之下, Nest-PCR DGGE 条带比较清晰, 条带数量更多。而常规 PCR 产物的 DGGE 条带比较模糊, 条带数量也较少。

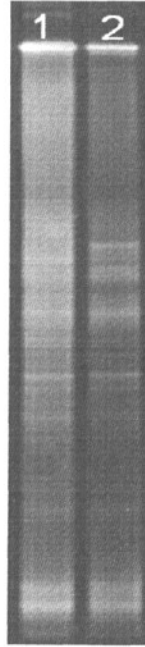


图 12 不同扩增方法获得的土壤 16S rDNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱

(1: Nest-PCR 方法; 2: 常规 PCR 方法)

Fig.12 DGGE fingerprint of 16S rDNA(V3) gene from different PCR strategy

(1: Nest-PCR strategy; 2: routine PCR strategy)

3. 讨论

为了提高 PCR 产物的特异性, 很多研究都在这方面做出了努力。Thompson 等(2002)利用修补 PCR 的方法降低异源双链和单链分子的产生。该方法是样品在 20 个循环的扩增后, 产物进行 10 倍稀释作为模板, 在新的反应液中重新进行 3 个循环的修补扩增。由于引物相对模板的浓度较大, 可以使引物容易与模板退火, 避免异源双链的产生。Zhang 等(2005)比较了酶处理、修补 PCR 和丙烯酸胺凝胶电泳纯化 3 种去除单链 DNA 分子的方法, 认为加入 7mol/L 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(d-PAGE)可以很好的分离

双链和单链 DNA 分子，回收双链 DNA 分子后进行 DGGE 分析，取得了良好的效果。所以，为了有利于后期电泳分离效果的提高，可以通过在 PCR 阶段采用不同的策略提高产物的质量与产量，从而为后期分析创造有利条件。

与常规 PCR 相比，Nest-PCR 所获得的 DGGE 电泳图谱条带更清晰，可分辨的条带数量也更多。其原因可能是土壤中微生物的含量比较丰富，种类组成也比较复杂。直接 PCR 虽能全面反映微生物的情况，但其获得的 DGGE 图像背景模糊，可分辨的条带数量也不多（邢德峰等，2006；吴鑫，2007）。相反，Nest-PCR 通过两轮扩增，放大了细菌种类数量之间的差异，使主要细菌类群突显出来，因而可分辨的条带数目也增多。从本文研究结果看，对复杂的土壤细菌的多态性进行 DGGE 电泳图谱分析，选择 Nest-PCR 比较理想。

第四节 硫丹对土壤微生物群落多样性的 DGGE 电泳分析

1. 材料与方法

1.1 实验材料

供试硫丹：

纯度 98%，购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

供试土壤：

同本章第一节 1.1.1 部分。

1.2 实验方法

1.2.1 土壤样品的处理及采样时间

称取 100g 新鲜的土壤，按不同等级浓度添加硫丹溶液，进行充分混匀，装于土壤培养罐中，置于 25℃ 恒温培养箱中避光培养。药剂处理浓度设定为溶剂对照组(丙酮)，0.1, 1.0, 10mg/kg 四个处理。每个处理设 3 个重复。整个试验过程中使土壤湿度保持在最大持水量的 50%~60%左右。于培养的第 7、14、21、28d 分别取样分析。

1.2.2 土壤总 DNA 的提取

同本章第 1 节 1.1.5.1 部分。

1.2.3 粗提 DNA 的纯化

同本章第 1 节 1.1.7 部分。

1.2.4 PCR 扩增

采用 Nest-PCR，具体同本章第 3 节 1.4 部分。

1.2.5 DGGE 电泳

同本章第 2 节 1.4.2 部分。

2. 结果与分析

2.1 不同时期 PCR 产物的琼脂糖电泳检测

硫丹不同处理后的土壤样品 V3 区的扩增结果，如图 13 所示。从电泳结果可以看出，不同时期的样品均得到了较好的扩增，得到的产物在 210bp 左右，从电泳条带迁移情况来看，扩增 PCR 产物的大小较为一致，与预期的结果基本相符，适用于变性梯度凝胶电泳中进行分离。

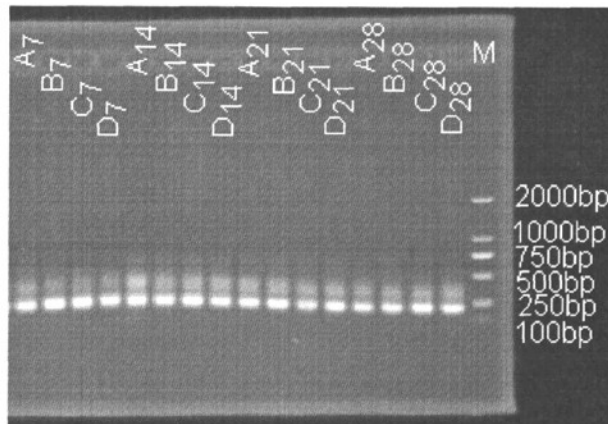


图 13 不同土壤处理 V3 区扩增片段

(M: DL2000 Marker; A 代表对照处理组; B 代表 0.1mg/kg 硫丹处理组; C 代表 1.0mg/kg 硫丹处理组; D 代表 10.0 mg/kg 硫丹处理组。下标(7, 14, 21, 28)代表硫丹处理的天数)

Fig.13 PCR amplified V3 gene of different soil samples

(M: DL2000 Marker; A represented treated with control; B represented treated with 0.1mg/kg endosulfan; C represented treated with 1.0 mg/kg endosulfan; D represented treated with 10.0 mg/kg endosulfan. The subscripts (7, 14, 21, 28) represented the day treated by endosulfan.)

2.2 硫丹处理 7d 土壤细菌群落多样性的 DGGE 分析

图 14 为硫丹处理 7d 时土壤细菌 16S rDNA V3 可变区片段的 DGGE 指纹图谱。从条带的数量和亮度来看，DGGE 条带的重复性较好。从整个图谱结果来看，各个处理间的样品具有较高的一致性，说明它们之间的菌群结构相似程度比较高。根据条带对比结

果可以看出, 硫丹污染条件下, 土样中有些细菌种群的生长受到了抑制, 如图中的 1 号条带和 2 号条带所代表的细菌种群, 随着硫丹剂量的增加, 条带变浅, 甚至消失。

通过 Quantity One 分析软件对 DGGE 指纹图谱进行生物信息学分析, 绘制不同浓度硫丹处理土样之间的遗传簇关系(图 15), 图中各泳道间条带所代表的遗传簇异同表示了各土样微生物之间多样性亲缘关系远近。聚类分析表明, 各重复土壤聚于一簇, 说明重复之间差别较小, 重复性较好。对照土样与高浓度土壤位置较近, 归为一簇, 并且它们之间的相似性指数达到 70%以上(表 13), 表明在染毒第 7d, 硫丹对土壤微生物影响较小, 其种群差异不明显, 基因多样性较为一致。

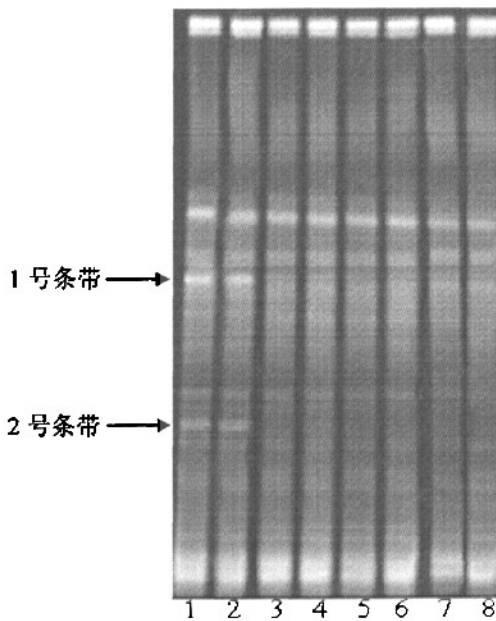


图 14 不同浓度硫丹处理 7d 后土壤扩增的 V3 区 DGGE 图谱
(1, 2 泳道: 对照处理组; 3, 4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; 5, 6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.14 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 7d
(1,2:control; 3,4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; 5,6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; 7,8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

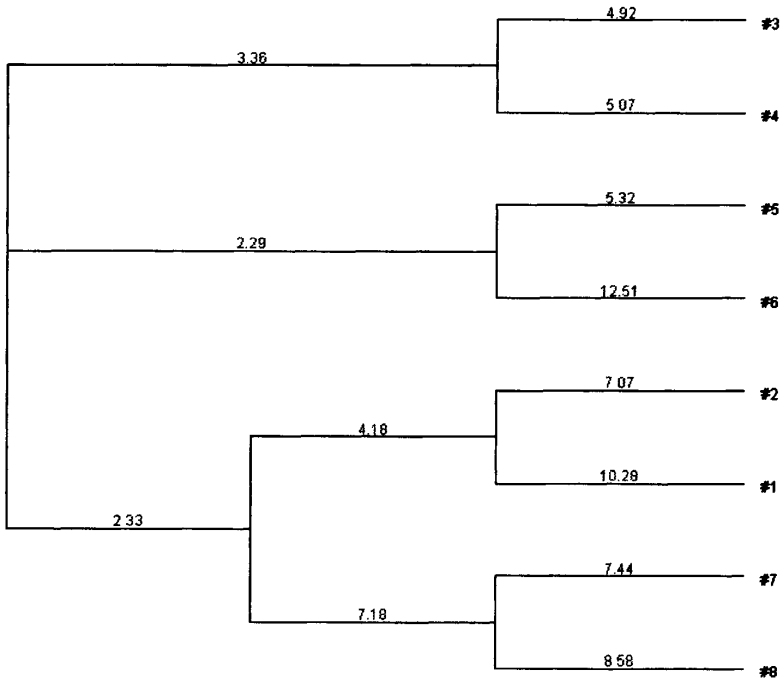


图 15 不同浓度硫丹处理 7d 后土壤总 DNA 扩增的 V3 区片段多样性聚类分析
 (#1, #2 泳道: 对照处理组; #3, #4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; #5, #6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.14 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 7d

(#1,#2:control; #3,#4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; #5,#6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; #7,#8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

表 13 不同硫丹处理土壤 7d 后微生物区系的 Jaccard 指数相似性(%)

Table13 The similarity of jaccard index of bacterial communities in soil treated with different concentration endosulfan for 7d

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 82.7 | 76.3 | 77.3 | 70.0 | 71.3 | 72.1 | 70.9 |
| 2 | 82.7 | 100.0 | 80.4 | 81.0 | 76.7 | 71.8 | 70.8 | 74.0 |
| 3 | 76.3 | 80.4 | 100.0 | 90.0 | 86.2 | 75.8 | 73.5 | 69.3 |
| 4 | 77.3 | 81.0 | 90.0 | 100.0 | 85.8 | 73.9 | 72.6 | 71.9 |
| 5 | 70.0 | 76.7 | 86.2 | 85.8 | 100.0 | 82.2 | 76.3 | 73.2 |
| 6 | 71.3 | 71.8 | 75.8 | 73.9 | 82.2 | 100.0 | 70.5 | 69.7 |
| 7 | 72.1 | 70.8 | 73.5 | 72.6 | 76.3 | 70.5 | 100.0 | 84.0 |
| 8 | 70.9 | 74.0 | 69.3 | 71.9 | 73.2 | 69.7 | 84.0 | 100.0 |

2.3 硫丹处理 14d 土壤细菌群落多样性的 DGGE 分析

与培养 7d 时相比, 土样培养 14d 后 DGGE 电泳图谱 (图 16) 发生了变化, 硫丹处理导致土壤细菌种群结构改变。根据条带对比结果可以看出, 硫丹污染条件下, 土样中有些细菌种群的生长受到了抑制, 如图中的 1 号条带和 2 号条带所代表的细菌种群, 随着硫丹剂量的增加, 条带消失。而也有些细菌在此条件下得到富集, 如图中 3 号条带, 其培养条带出现。在图 17 中, 0.1mg/kg 和 1.0mg/kg 处理土样聚在一簇, 与对照处理土样距离较远。表 14 中 Jaccard 相似指数也表明, 硫丹处理的两个低浓度之间的相似性指数比较接近, 而与对照的指数差异也较大。

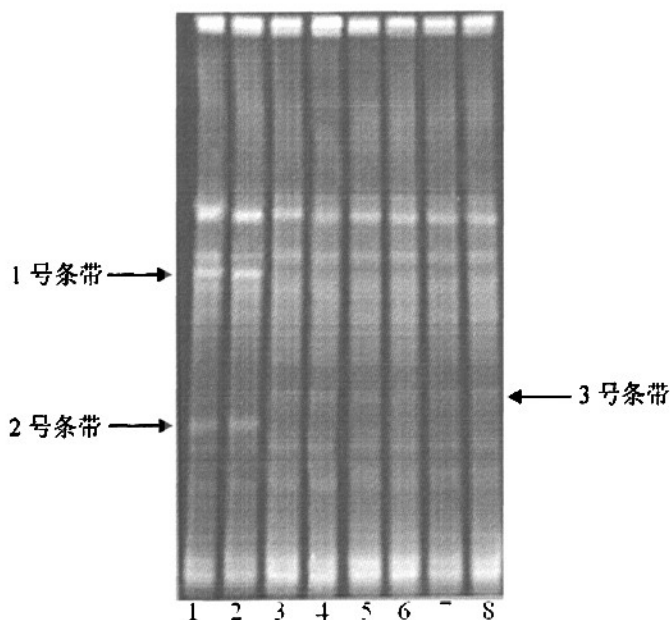


图 16 不同浓度硫丹处理 14d 后土壤扩增的 V3 区 DGGE 图谱

(1, 2 泳道: 对照处理组; 3, 4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; 5, 6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.16 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 14d

(1,2:control; 3,4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; 5,6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; 7,8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

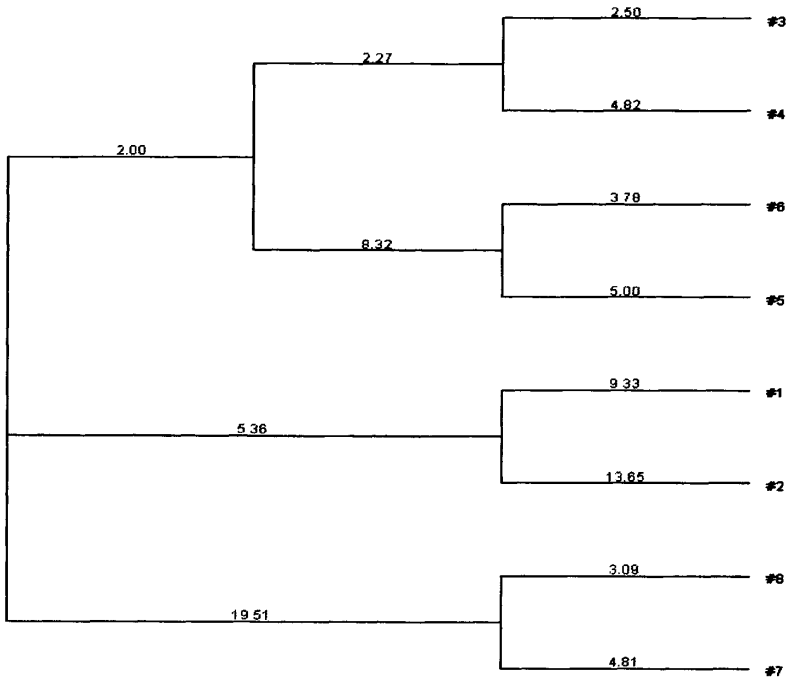


图 17 不同浓度硫丹处理 14d 后土壤总 DNA 扩增的 V3 区片段多样性聚类分析
(#1, #2 泳道: 对照处理组; #3, #4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; #5, #6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.17 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 14d

(#1,#2:control; #3,#4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; #5,#6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; #7,#8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

表 14 不同硫丹处理土壤 14d 后微生物区系的 Jaccard 指数相似性(%)

Table14 The similarity of jaccard index of bacterial communities in soil treated with different concentration endosulfan for 14d

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 89.0 | 78.7 | 74.2 | 65.4 | 67.9 | 63.7 | 67.9 |
| 2 | 89.0 | 100.0 | 68.4 | 68.2 | 72.8 | 74.3 | 50.4 | 51.3 |
| 3 | 78.7 | 68.4 | 100.0 | 92.7 | 80.8 | 82.5 | 70.5 | 73.7 |
| 4 | 74.2 | 68.2 | 92.7 | 100.0 | 80.0 | 82.1 | 67.3 | 70.2 |
| 5 | 65.4 | 72.8 | 80.8 | 80.0 | 100.0 | 91.2 | 60.9 | 60.4 |
| 6 | 67.9 | 74.3 | 82.5 | 82.1 | 91.2 | 100.0 | 59.6 | 59.2 |
| 7 | 63.7 | 50.4 | 70.5 | 67.3 | 60.9 | 59.6 | 100.0 | 92.1 |
| 8 | 67.9 | 51.3 | 73.7 | 70.2 | 60.4 | 59.2 | 92.1 | 100.0 |

2.4 硫丹处理 21d 土壤细菌群落多样性的 DGGE 分析

从图 18 可以看出, 至培养 21d 时, 4 种土样的 DGGE 电泳图谱与培养 14d 时, 继续发生变化。在图 19 中, 1.0mg/kg 和 10.0mg/kg 处理土样聚在一簇, 与对照处理土样距离较远。表 15 中 Jaccard 相似指数也表明, 硫丹处理的两个高浓度之间的相似性指数比较接近, 而与对照的指数差异也较大。从表中可以看到对照组同 3 个硫丹处理组的相似指数差异较大, 并且随着硫丹浓度的升高, 各泳道条带间的 Jaccard 指数相似性相应降低。

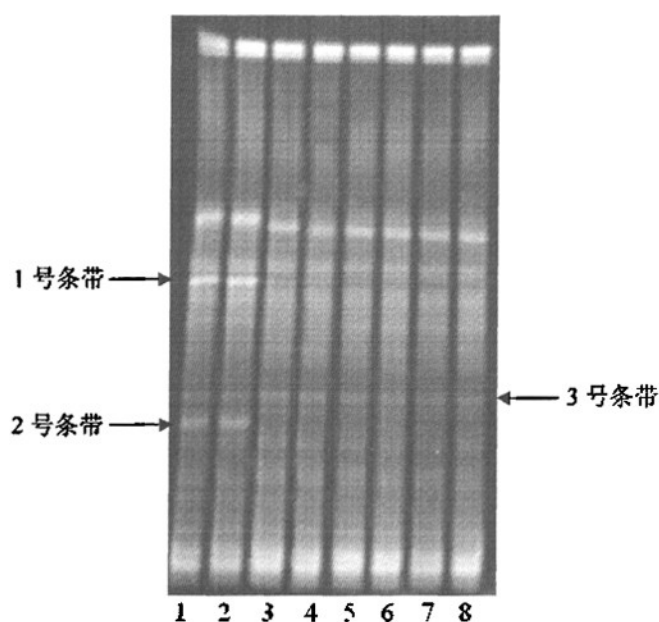


图 18 不同浓度硫丹处理 21d 后土壤扩增的 V3 区 DGGE 图谱
(1, 2 泳道: 对照处理组; 3, 4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; 5, 6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.18 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 21d
(1,2:control; 3,4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; 5,6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; 7,8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

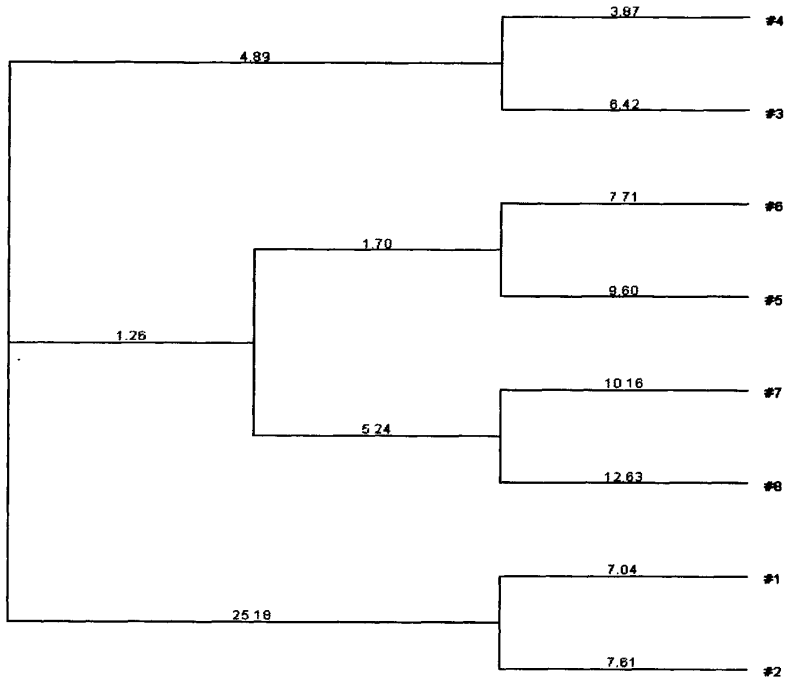


图 19 不同浓度硫丹处理 21d 后土壤总 DNA 扩增的 V3 区片段多样性聚类分析
(#1, #2 泳道: 对照处理组; #3, #4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; #5, #6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; #7, #8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.19 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 21d

(#1,#2:control; #3,#4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; #5,#6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; #7,#8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

表 15 不同硫丹处理土壤 21d 后微生物区系的 Jaccard 指数相似性(%)

Table15 The similarity of jaccard index of bacterial communities in soil treated with different concentration endosulfan for 21d

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 85.3 | 58.5 | 54.5 | 53.4 | 54.6 | 54.0 | 52.5 |
| 2 | 85.3 | 100.0 | 59.7 | 57.1 | 52.8 | 57.8 | 50.1 | 46.7 |
| 3 | 58.5 | 59.7 | 100.0 | 89.7 | 75.8 | 78.2 | 67.8 | 70.6 |
| 4 | 54.5 | 57.1 | 89.7 | 100.0 | 79.9 | 84.4 | 73.2 | 71.7 |
| 5 | 53.4 | 52.8 | 75.8 | 79.9 | 100.0 | 82.7 | 72.9 | 74.0 |
| 6 | 54.6 | 57.8 | 78.2 | 84.4 | 82.7 | 100.0 | 78.7 | 66.4 |
| 7 | 54.0 | 50.1 | 67.8 | 73.2 | 72.9 | 78.7 | 100.0 | 77.2 |
| 8 | 52.5 | 46.7 | 70.6 | 71.7 | 74.0 | 66.4 | 77.2 | 100.0 |

2.5 硫丹处理 28d 土壤细菌群落多样性的 DGGE 分析

图 20 表明，随着处理时间的进一步延长，到第 28d 时，硫丹对土壤微生物基因多样性的影响也变大。根据条带对比结果可以看出，高浓度硫丹处理（10mg/kg）土壤的细菌群落结构发生了较为显著的变化，土样中有些细菌种群的生长受到了抑制，在该高浓度下，一些条带变弱。而也有些细菌在此条件下得到富集，如图中 4 号条带，其培养条带出现，其亮度较高。对照组中的特异性条带仍然存在，其亮度进一步增大。1.0mg/kg 处理、10.0mg/kg 土样分别单独成簇（图 21）。从表可以看出，高浓度处理的 Jaccard 相似指数同对照处理相比，继续降低，相似指数仅为 46%。从表 16 可以看出，随着硫丹浓度的升高，各泳道条带间的 Jaccard 指数相似性相应降低，硫丹污染浓度与各泳道相似性之间存在较为明显的剂量-效应关系。

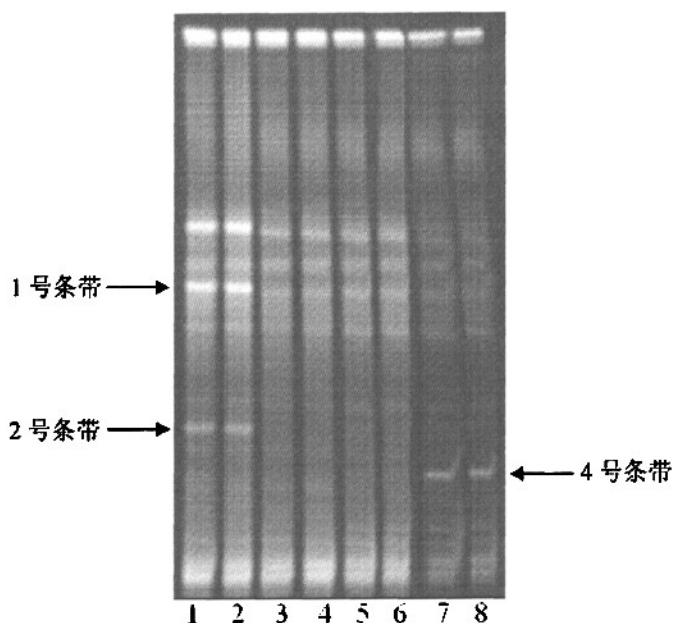


图 20 不同浓度硫丹处理 28d 后土壤扩增的 V3 区 DGGE 图谱

(1, 2 泳道: 对照处理组; 3, 4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; 5, 6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; 7, 8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.20 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 28d

(1,2:control; 3,4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; 5,6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; 7,8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

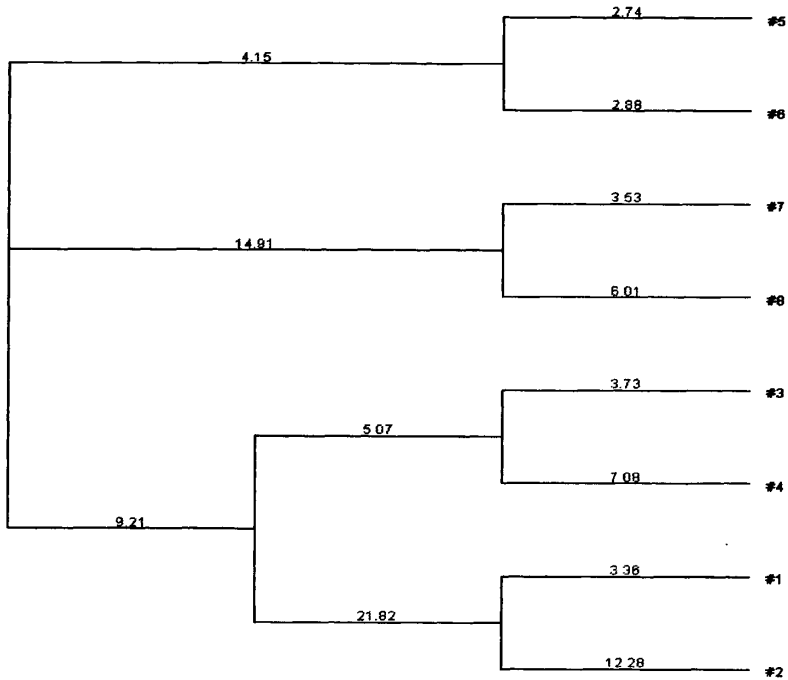


图 21 不同浓度硫丹处理 28d 后土壤总 DNA 扩增的 V3 区片段多样性聚类分析
(#1, #2 泳道: 对照处理组; #3, #4 泳道: 0.1mg/kg 硫丹处理组; #5, #6 泳道: 1.0mg/kg 硫丹处理组; #7, #8 泳道: 10.0 mg/kg 硫丹处理组。)

Fig.21 DGGE fingerprint of amplified V3 fragments from soil applied with endosulfan in different concentrations of 28d

(#1,#2:control; #3,#4: treated with 0.1mg/kg endosulfan; #5,#6: treated with 1.0 mg/kg endosulfan; #7,#8: treated with 10.0 mg/kg endosulfan)

表 16 不同硫丹处理土壤 28d 后微生物区系的 Jaccard 指数相似性(%)

Table16 The similarity of jaccard index of bacterial communities in soil treated with different concentration endosulfan for 28d

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 84.4 | 64.2 | 66.6 | 57.9 | 57.8 | 46.8 | 46.2 |
| 2 | 84.4 | 100.0 | 55.3 | 53.4 | 48.7 | 49.1 | 40.1 | 39.3 |
| 3 | 64.2 | 55.3 | 100.0 | 89.2 | 76.3 | 78.0 | 61.9 | 58.0 |
| 4 | 66.6 | 53.4 | 89.2 | 100.0 | 70.5 | 71.9 | 56.6 | 59.6 |
| 5 | 57.9 | 48.7 | 76.3 | 70.5 | 100.0 | 94.4 | 76.7 | 71.2 |
| 6 | 57.8 | 49.1 | 78.0 | 71.9 | 94.4 | 100.0 | 75.5 | 70.1 |
| 7 | 46.8 | 40.1 | 61.9 | 56.6 | 76.7 | 75.5 | 100.0 | 90.5 |
| 8 | 46.2 | 39.3 | 58.0 | 59.6 | 71.2 | 70.1 | 90.5 | 100.0 |

3. 讨论

DGGE 分子指纹分析技术, 直接利用 DNA 对微生物遗传特性进行表征, 可以快速、准确地鉴定自然生境或人工生境中的微生物个体, 并进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态性、重要基因定位、表达及调控的评价分析。由于 DGGE 技术避免了分离纯化培养所造成的分析上的误差, 通过指纹图谱直接再现群落结构, 目前已经成为微生物群落遗传多样性和动态性分析的强有力工具。Said 等(1999)通过分析 DGGE 条带图谱, 研究了长期使用 3 种苯脲类除草剂(敌草隆、利谷隆和绿麦隆)的土壤微生物多样性。结果发现除草剂污染的土壤和没有使用过除草剂的土壤微生物群落结构有显著的不同, 并且使用过除草剂的土壤微生物多样性明显减少。叶央芳(2004)采用 DGGE 技术研究了苯噻草胺对水稻田土壤微生物种群多样性的影响, 发现苯噻草胺处理土壤对土壤微生物种群的毒害作用不明显, DGGE 图谱上条带没有明显差异, 土壤微生物多样性没有明显下降, 研究表明苯噻草胺不会对微生物群落结构造成较大影响。Macur 等(2007)利用 DGGE 技术研究了除草剂 2,4-D 对田间土壤微生物群落多样性的影响, 结果表明随着药剂 2,4-D 浓度的增加, 土壤微生物群落出现了明显的差异, 当药剂 2,4-D 浓度达到 500mg/kg 时, 土壤微生物优势种群多样性出现了显著的减少。

本章采用 PCR-DGGE 技术, 运用 Quantity One 分析软件, 初步探讨了硫丹对土壤细菌种群变化的影响。结果表明, PCR-DGGE 指纹分析技术在研究土壤微生物分子生态方面具有较高的精确性和可靠性。通过对不同培养时间、不同浓度硫丹污染下土壤微生物 DNA 进行 DGGE 基因多样性的分子指纹图谱分析, 发现随着培养时间不同, 各处理之间的土壤微生物群落多样性出现了一定的差异。在硫丹作用下, 土样中一些细菌种群的生长受到抑制, 随着硫丹或作用时间的提高或延长, 其相关条带由深变浅, 甚至消失。而另一些细菌种群的得到富集, 其条带由无到有。在整个试验过程中, 随着硫丹浓度的升高, 各泳道条带间的 Jaccard 指数相似性相应降低, 硫丹污染浓度与各泳道相似性之间存在较为明显的剂量-效应关系。由此可见, 在一定浓度和作用时间范围内, 硫丹对土壤细菌种群的改变的影响存在剂量-效应关系。表明硫丹对土壤微生物群落结构有着明显的影响。

总之, 不经培养从土壤中直接抽提微生物的总 DNA, 由于避免了在培养过程中的筛选和富集作用, 能够更直接地反映土壤中微生物多样性及种群分布情况。本方法用于研究污染环境下的土壤微生物生态多样性研究, 较之传统培养过程更快也更准确, 对于

全面掌握污染环境微生物生态的变化具有重要意义。同时，新方法的引用，进一步丰富了土壤的农药环境质量指标，为通过基因多样性变化评估土壤硫丹污染程度提供了理论基础。

第五章 全文结论

硫丹是一种应用广泛的有机氯杀虫剂,由于其环境与健康问题已经引起国际环境保护组织、各国政府和民众的高度关注。由于硫丹即将被列入 POPs 名单,研究硫丹的生态毒性非常重要。鉴于土壤微生物、动物、植物在生态系统中的重要性,本研究主要采用分子生物学技术,分析了硫丹对蚕豆、白三叶草、蚯蚓和土壤微生物的毒性效应。通过研究主要得到了如下结论:

1. 采用毒理学实验方法,研究了不同浓度的硫丹对蚕豆根尖细胞有丝分裂、染色体畸变、微核的影响。研究表明,经硫丹处理后,蚕豆根尖细胞有丝分裂指数则逐渐降低,降低的程度随硫丹的浓度和染毒时间的增加而增加。有丝分裂指数与染色体畸变率和微核率都呈负相关,染色体畸变率与微核率呈正相关,并具有明显的剂量-效应关系。硫丹污染对蚕豆根尖细胞的有丝分裂、染色体畸变、微核具有明显的毒害作用。

2. 通过彗星试验测定了硫丹对蚯蚓体腔细胞和白三叶草叶片细胞 DNA 的损伤作用。试验结果显示,在整个染毒时期,不同浓度硫丹处理对蚯蚓体腔细胞和白三叶草叶片细胞 DNA 均有损伤,而且随着浓度的增加和时间的延长,这说明 DNA 损伤程度与硫丹的浓度和处理时间均有效应关系。表明硫丹对蚯蚓和白三叶草造成了基因损伤。

3. 本研究首次利用广泛分布的白三叶草作为受试生物材料,进行污染物的彗星试验检测试验。通过实验发现,和对照处理相比,经过硫丹处理后白三叶草叶片细胞能够通过彗星试验检测 DNA 损伤,具有较高的灵敏性。由此表明白三叶草叶片能应用于植物彗星实验,研究环境污染对植物 DNA 的损伤。

4. 通过三种不同的方法,分别提取土壤微生物总 DNA,对提取效果进行比较发现,运用化学试剂和酶结合的策略能够获得高质量、高产量的基因组 DNA,较其他方法具有明显的优势和效果,并且获得的产物经纯化后更适用于后期的分子生物学实验。

5. 采用扩增细菌 V3 区的通用引物(338F、518R),通过改变扩增反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTP、引物的条件,并采用 Nest-PCR 方法,优化了含有“GC”结构引物的 PCR 扩增方法,获得了较好的扩增产物,不但提高了对目的产物扩增的特异性,同时也使产量得以提高,使得 DGGE 电泳图谱条带更清晰,可分辨的条带数量也更多。

6. 采用 DGGE 分子指纹技术,避开传统的分离培养过程,对硫丹污染条件下的土壤微生物种群基因多样性进行了初步研究。运用 Quantity One 分析软件,通过对不同培养时间、不同浓度硫丹污染下土壤微生物 DNA 进行 DGGE 基因多样性的分子指纹图谱分

析,发现随着培养时间不同,各处理之间的土壤微生物群落多样性出现了一定的差异。在硫丹作用下,土样中一些细菌种群的生长受到抑制,随着硫丹或作用时间的提高或延长,其相关条带由深变浅,甚至消失。而另一些细菌种群的得到富集,其条带由无到有。在整个试验过程中,随着硫丹浓度的升高,各泳道条带间的 Jaccard 指数相似性相应降低,硫丹污染浓度与各泳道相似性之间存在较为明显的剂量-效应关系。表明硫丹对土壤微生物群落结构有着明显的影响。

第六章 附录

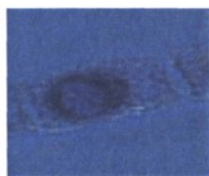


图 1: 正常细胞

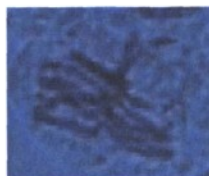


图 2: 染色体断片

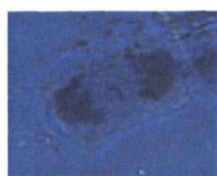


图 3: 落后染色体

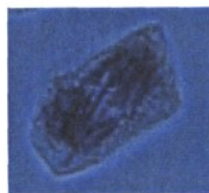


图 4: 染色体桥

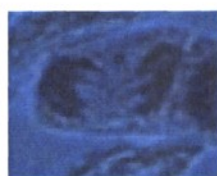


图 5: 染色体环



图 6: 微核

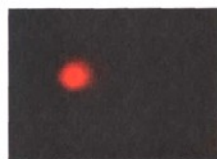


图 7: 对照组蚯蚓体腔细胞彗星图像

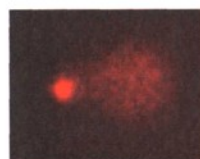


图 8: 处理组 DNA 损伤的蚯蚓体腔细胞彗星图像

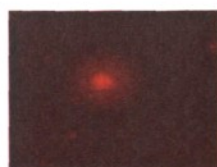


图 9: 对照组白三叶草细胞彗星图像

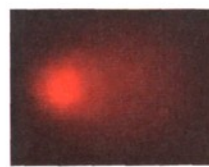


图 10: 处理组 DNA 损伤的白三叶草细胞彗星图像

参考文献

1. 卜宁, 张君, 王升厚, 马莲菊. 农药百菌清和氯氰菊酯对蚕豆根尖细胞遗传损伤的研究. 癌变畸变突变, 2008, 20 (2): 123-126
2. 曹佳, 林真, 余争平. 微核实验. 北京: 军事医学科学出版社, 2000
3. 陈光荣, 金波, 李明. 利用蚕豆根尖试验检测农药和诱变剂的损伤. 华中师范学院学报, 1983, (4): 101-108
4. 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨. 植物学报, 1995, 37 (1): 14-24
5. 高平平, 晁群芳, 张学礼, 王凌华, 赵立平. TGGE 分析焦化废水处理系统活性污泥细菌种群动态变化及多样性. 生态学报, 2003, 23 (10): 1963-1969
6. 贾秀英, 李喜梅, 杨亚琴, 胡凌飞, 朱越峰. Cu、Cr(IV)复合污染对蚯蚓急性毒性效应的研究. 农业环境科学学报, 2005, 24: 31-34
7. 金波, 陈光荣. 遗传毒理与环境检测. 武汉: 华中师范大学出版社, 1998
8. 黎杰强, 黄海琳, 李丹霞, 周月琼. 3 种常用农药对蚕豆根尖细胞的遗传毒性. 华南师范大学学报, 2007, 1: 112-117
9. 李志岗, 杨官品, 朱艳红. 水环境细菌 16SrDNA 限制性片段长度多型性及群落结构分析. 水生生物学报, 2001, 25(2): 111-114
10. 梁继东, 周启星. 甲胺磷、乙草胺和铜单一与复合污染对蚯蚓的毒性效应研究. 应用生态学报, 2003, 14: 593-596
11. 林爱军, 张旭红, 朱永官. Cd对小麦叶片DNA损伤的彗星实验研究. 环境科学学报, 2005, 25(3): 329-333
12. 刘伟, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 宋艳, 王秀国, 王倩, 钱博. 利用吸收光谱法和微核法测定三种农药对 DNA 损伤的作用, 农业环境科学学报, 2006, 25 (2): 531-534
13. 刘灿辉. 蚕豆根尖微核技术监测农药污染的研究. 重庆环境科学, 1994, 16 (2): 7-8
14. 卢冰, 陈荣华, 王自磐, 朱纯. 北极海洋沉积物中持久性有机污染物分布特征及分子地层学记录的研究. 海洋学报, 2005, 27: 167-173
15. 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, 147-195
16. 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发夹结构

- 的效应.生态学报, 2003, 23 (10): 2170-2175
17. 孟阳, 薛建良, 刘广民, 刘永健, 李金春子. 持久性有机污染物的环境分布与生物危害. 污染防治技术, 2008, 21 (6): 68-72
 18. 孟紫强, 张连珍. 应用 SCGE 技术研究细胞 DNA 损伤的原理与方法. 中国化学与分子生物学学报, 1998, 14 (5): 604-609
 19. 孟紫强. 环境毒理学基础. 北京: 高等教育出版社, 2003.
 20. 钱晓薇. 重铬酸钾对蚕豆根尖细胞致畸效应的研究. 遗传, 2004, 26 (3): 337-342
 21. 屈艾, 李宗芸, 朱卫中, 朱明明, 王秀琴, 温洪宇, 汪承润. 稀土多元复合肥和三种稀土元素的遗传毒性研究. 遗传, 2001, 23 (3): 243-246
 22. 史雅娟. 有机氯持久性有机污染物对土壤动物的生态效应研究. 中国科学院生态环境研究中心, 2005
 23. 宋玉芳, 周启星, 许华夏. 土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究. 应用生态学报, 2002, 13: 187-190
 24. 万斌. 生态毒理学中生物标志物研究进展. 国外医学卫生学分册, 2000, 27 (2): 110-113
 25. 王小红, 江洪, 夏明珠, 杨益寿. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展及其应用. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2001, 22: 5-7
 26. 王英彦, 汤大友. 蚕豆根尖细胞微核检测技术的污染指示性及其它指标的比较. 中国环境科学, 1987, 7 (5): 44-50
 27. 吴鑫. DGGE 指纹图谱分析太湖富营养化水体中细菌群落结构的变化. 上海: 上海交通大学, 2007
 28. 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析. 微生物学报. 2006, 46(2): 331-335
 29. 杨新玲, 蒋雨平, 翁建英. 硫丹对 PC₁₂ 细胞增值的影响及诱导其凋亡的研究. 中国临床神经科学, 2004, 12 (1): 5-9
 30. 叶央芳. 酰胺类除草剂苯噻草胺的微生物生态毒性研究及其降解. 浙江大学, 2004
 31. 张壬午, 李治祥, 白青云. 化学农药对蚯蚓的毒性与评价. 农村生态环境, 1986, (2): 14-18
 32. 周宏治. 农药甲基对硫磷污染环境的微核研究. 四川大学学报, 2000, 37: 62-66

33. 朱鲁生, 于建垒, 李光德, 王玉军, 徐玉新. 硫丹环境毒理研究进展. 环境科学进展, 1996, 4 (1) : 41-49
34. 朱心强, 郑一凡, 张群卫, 姜槐, 黄幸纾. 硫丹对成年大鼠生精功能的影响和氧化损伤. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16 (5): 391-395
35. Aina Roberta, Palin Lucio, Citterio Sandra. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. *Chemosphere*, 2006, 65: 666-673
36. Alberti A, Tizzoni M, Zani C. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Ann Ig*, 2003, 15(6): 953-957
37. Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, 2008, 71: 1823-1831
38. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 143-169
39. Angela E, et al. Mutagenicity test schemes and guidelines: U.S. EPA Office of pollution prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs. *Environ Mole Mutagen*, 1993, 21(1): 38-45
40. Anon. Environment Health Criteria 40-Endosulfan. IPCS (International Programme on Chemical Safety) – WHO Geneva, 1984
41. Bajpayee M, Pandey AK, Zaidi S, Musarrat J, Parmar D, Mathur N, Seth PK, Dhawan A. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ Mol Mutagen*, 2006, 47: 682-692
42. Carrera G, Fernandez P, Vilanova R M, Grimalt J O. Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas. *Atmospheric Environment*, 2001, 35: 245-254
43. Chen Y, Wang Z J. Detection of genotoxicity of soil pollution to earthworm to invivo exposure by comet assay. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42: 577-583
44. Chuah T S, Loh J, Hii Y S. Acute and Chronic Effects of the Insecticide-Endosulfan on Freshwater Cladoceran, *Moina macrocopa* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 79: 557-561
45. Cook P R, Brazell I A, and Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci*, 1976, 22: 303-324

46. Countryman, P.I. and Heddle, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 1976, 41: 321-332
47. De'bora J. Pe'rez, Mirta L. Menone, Elsa L. Camadro, et al. Genotoxicity evaluation of the insecticide endosulfan in the wetland macrophyte *Bidens laevis* L. *Environmental Pollution*, 2008, 153: 695-698
48. Duarte G F. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J Microbiol Methods*, 1998, 32: 21-29
49. Duineveld B M, Rosado A, Elsas J D, et al. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 4950-4957
50. Edrick D B, Peacock A, Stephen J R, Macnaughton S J, Brüggemann J, White D C. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41: 235-248
51. Elsas J D van, Smalla K. Extraction of microbial community DNA from soils. In: A D L Akkermans, J D van Elsas and F J de Bruijn. *Molecular Microbial Ecology Manua*. Kluwer Academic Publishers, 1995
52. Elsas J D. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environmen. *J Microbiol Methods*, 1998, 32: 133-154
53. Engelen B, Meinken K, von Wintzingrode F. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Mirobiol*, 1998, 64: 814-821
54. Evans H J. Mutation cytogenetics for harzadous matters inspection. *Mutat Res*, 1988, 240(3): 355-363
55. Feris K, Ramsey P, razar F C. Differences in hyporheic-zone microbial community structure along a heavy-metal contamination gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5563-5573
56. Ferrara G, Loffredo E, and Senesi N. Aquatic humic substances inhibit clastogenic events in germinating seeds of herbaceous plants. *J Agric Food Chem*, 49(3): 1652-1657

57. Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62:340-346
58. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, et al. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay, *Mutagenesis*, 1996, 11: 169-175
59. Gabriele J, Merten M, Ingo S. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutation Research*, 2001, 493: 95-100
60. Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Elsas J D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, 38:1-15
61. Geyer H J, Scheunert G, Kaune A, Zeeman M, Derek C G. Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans. *The handbook of environmental chemistry*, 2000
62. Gichner T, Ptacek O, Stavreva D A. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat Res*, 2000, 470: 1-9
63. Harford A J, O'Halloran K, Wright P F A. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aqua Toxicol*, 2005, 75: 330-342
64. Henshel, M C. Black, M C. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*, West Conshohocken PA: American Society for Testing and Materials, 1999, 341-349
65. Ilaria Bernab`o, Elvira Brunelli, Cecilia Berg, et al. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86: 447-456
66. Jia H L, Li Y F, Wang D G. Endosulfan in China 1-gridded usage inventories, *Environ Sci Pollut Res*, 2008, DOI 10.1007/s11356-008-0042-z
67. Kong Z M, Zang Y, Wu Q L. Monitoring the genotoxicity of Lake Taihu, using two kinds of micronucleus tests. *Environ Pollut*, 1998, 99(2):279-83

68. Kozdrój J, Elsas J D. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biol.Fertil.Soils*.2000, 31:372-378
69. Krsek M, Wellington E M H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Micrbiol.Methods*.1999, 39:1-16
70. Lee R F, Steinert S A, Nakayama K, Oshima Y. Use of DNA damage (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos, in: D.S.
71. Macur R E, Wheeler J T, Burr M D. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiological Research*,2007,162:37-45
72. Marco A D, Boccardi P, Simone C D. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutat Res*,1990,241(1):1-6
73. Marco A De, Simon C De e, Raglione M. Importance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of *Vicia faba* treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide. *Mutat Res*,1992,279(1):9-13
74. Marco A, Desimone C, Raglione M. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutat Res*,1995,344(2):5-12
75. Michael M, Declan J. Effect of earthworm cast formation on the stabilization of organic matter in fine soil fractions. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37: 251-254
76. Minissi S and Lombi E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat Res*,1997,393(2):17-21
77. Minissi S, Caccese D, Passafiume F. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat Res*, 1998, 420(3): 77-84
78. Mitchelmore C L, Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res*, 1998 (399): 135-147
79. Monarca S, Feretti D, Zani C. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant

- bioassays. *Environ Mol Mutagen*, 2005, 46(2):96-103
80. Monarca S, Rizzoni M, Gustavino B. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Environ Mol Mutagen*, 2003, 41(5):353-359
81. Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700
82. Muyzer G, Brinkhoff T, Nüble U. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In Akkermans A D L, van Elsas J D, de Bruijn F J, et al. *Molecular microbial ecology manual*, 3rd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1997, 1-27
83. Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 317-322
84. Ning S B, Song Y C, Patrick V D. 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. *Electrophoresis*, 2002, 23: 2096-2102
85. Noumi T, Mosher M E, Natori S. *J. Biol. Chem*, 259:10071, 1984
86. Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1008-1016
87. Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123: 291-298
88. Pesticide Action Network Asia & The Pacific. 2002. <http://www.panap.net/>
89. Ptacek O, Stavreva D A, Kim J K. Induction and repair of DNA damage as measured by the Comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings. *Mutat Res*, 2001, 491:17-23
90. Purohit H J, Kapley A, Moharikar A. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *Microbiol. Methods*. 2003, 52:315-323.
91. Puurtinen H M, Martikainen E. Effect of soil moisture on pesticide toxicity to an

- enchytraeid worm, *enchytraeus sp.* Arch Environ Contam Toxicol, 1997, 33: 34-41
92. Qiao M, Chen Y, Wang C X. DNA damage and repair process in earthworm after in-vivo and in vitro exposure to soils irrigated by wastewaters. 2007, Environmental Pollution, 148: 141-147
93. Reed J. Radiation Biology of *Vicia faba* in Relation to the General Problem. Black Well, 1959: 65-92
94. Reinecke S A, Reinecke A J. The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. Arch Environ Contam Toxicol, 2004, 46: 208-215
95. Rojas E, Lopez M C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B, 1999, 722: 225-254
96. Romeo F, Quijano M D. Risk assessment in a third world reality: An endosulfan case history. Int J Occup Environ Health, 2000, 6: 312-317
97. Said E L, Fantroussl L, Verseuere W. Effect of Phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16SrRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:982-988
98. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
99. Sandra Citterio, Roberta Aina, Massimo Labra, Alessandra Ghiani, Pietro Fumagalli, Sergio Sgorbati, Angela Santagostino. Soil Genotoxicity Assessment: A New Strategy based on Biomolecular Tools and Plant Bioindicators. Environ. Sci. Technol., 2002, 36 (12): 2748-753
100. Sanjay Pandey, N.S. Nagpure, Ravindra Kumar, et al. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 65: 56-61
101. Santegoeds C M, Nold S, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62:3922-3928
102. Schmittgen T D. Real-time quantitative PCR. Methods, 2001, 25(4): 383-385
103. Shahin S A, El-Amoodi K H. Induction of numerical chromosome aberrations during synthesis using the fungicides nimrod and rubigan in root tips of *Vicia faba* L. Mutat Res,

1991, 261(3): 169-176

- 104.Sharma S, Nagpure NS, Kumar R, Pandey S, Srivastava SK, Singh PJ, Mathur PK. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2007, 53: 617-623
- 105.Sigler W V, Turco R F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21:107-118
- 106.Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175: 184-191
- 107.Singh S K, Narayan R, Shanker R, Saxena D K. Endosulfan induced biochemical changes in the testis of rats. *Vet Hum Toxicol*, 1995, 37(6): 547-549
- 108.Skaare J U, Larsen H J, Lie E. Ecological Risk Assessment of Persistent Organic Pollutants in the Arctic. *Toxicology*, 2002, 181-182: 193-197
- 109.Skovhu T L, Ramsing N B, Holmstrom C, et al. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol*, 2004, 70(4): 2373-2382
- 110.Smalla K. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction mediated amplification. *J Appl.Bacteriology*, 1993, 74: 78-85
- 111.Smit E, Leeftang P, Gommans S. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67:2284-2291
- 112.Soto A M, Chung K L, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(4): 380-383
- 113.Steinert S A. DNA damage as bivalve biomarker and as an environmental assessment tool. *Biomarkers*, 1999 (4): 492-496
- 114.Teske A, Sigalevich P, Cohen Y, et al. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62:4210-4215
- 115.Thompson A R. Effects of nine insecticides on the numbers and biomass of earthworms

- pasture. Bull Environ Contam Toxicol, 1970, 5: 577-586
116. Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed template amplifications: formation, consequence and elimination by reconditioning PCR. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 2083-2088
117. Tittlemier S A, Blank D H, Gribble G W, Norstrom R J. Structure elucidation of four possible biogenic organohalogenes using isotope exchange mass spectrometry. Chemosphere, 2002, 46: 511-517
118. Tomos Gichner, Ondrej Ptáček, Diana A. Stavreva, Elizabeth D. Wagner, Michael J. Plewa. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. Mutation Research, 2000, 470: 1-9
119. Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology, 1998, 64: 53-62
120. Torsvik V L. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol, 1990, 56, 782-787
121. Tsuda S, Kosaka Y, Murakami M. Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. Mutat Res, 1998, 415: 191-200
122. Van W D J B, Wesseling C, Kromhout H, Monge P, Garcia M, Mergler D. Chronic nervous system effects of long-term occupational exposure to DDT. The Lancet, 2001, 357: 1014-1016
123. Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. Microbiol. Methods. 2001, 44: 253-262
124. Weber K, Goerke H. Organochlorine Compounds in Fish of the Antarctic Peninsula. Chemosphere, 1996, 33: 404-410
125. Song Y, Zhu LS., Wang J, Wang JH., Liu W, Xie H. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. Soil Biology & Biochemistry. 2009. 41: 905-909
126. Yang YH, Yao J, Hu S, et al. Effects of Agricultural Chemicals on DNA Sequence

- Diversity of Soil Microbial Community: A Study with RAPD Marker. *Microb Ecol*, 2000, 39: 72-79
127. Yeates C, Gillings MR. Rapid purification of NDA from soil for molecular biodiversity analysis. *Lett Appl Microbiol*, 1998, 27: 49-53
128. Yuquan L, Morimoto K, Takeshita T, Takeuchi T, Saito T. Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ Health Perspect*, 2000, 108: 559-561
129. Zang Y, Zhong Y, Luo Y. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ Pollut*, 2000, 108(2): 271-278
130. Zhang X, Yan X, Gao P. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *Microbiol. Methods*, 2005, 60: 1-11

致 谢

本研究是在我尊敬的导师朱鲁生教授的悉心指导全力支持下完成的。导师的知遇之恩以及三年来在工作、学习生活中所给予的无微不至的关怀和帮助将永远铭记在心。导师高尚正直的品德、严谨的治学态度、一丝不苟的工作作风、渊博的学识和敏锐的科学洞察力,不仅使我在科研技能和知识水平方面有很大的提高,而且将使我在以后的人生道路中受益匪浅。值此论文完成之际,向导师致以衷心的感谢!

在课题论文的开题、研究和撰写的过程中,得到王开运教授、罗万春教授、王金信教授、路福绥教授、姜林教授、姜兴印副教授、刘峰副教授、慕卫副教授、叶保华老师、薛超彬老师的悉心指导和无私帮助;环境科学系的王军老师、王金花老师、谢慧老师、李光德副教授、王玉军副教授、徐玉新副教授、李金玲老师在学习、生活上也给予了无私帮助;时呈奎老师、段祖安老师、王利老师在仪器使用方面给予了热心帮助。

在论文进行中,本实验室已毕业或在读研究生林爱军、王秀国、钱博、王倩、徐琦峰、宋艳、徐荣娟、时伟杰、曹锐、董晓丽、马婷婷、韩畅、孟琰、蒋金会、苏坤昌、苏郡、王琪、贾文涛、于长伟、邵波、侯欣欣等给予无私帮助;徐蓬军博士、夏晓明博士、庄占兴博士、刘政军博士、周洪旭博士、顾春波博士及农药学专业其他同学给予了很大帮助。

在此一并衷心感谢!

感谢我的家人、朋友在精神及物质生活上给予的支持!

刘 伟

2009年6月

攻读博士期间发表论文情况

1. Wei Liu, Lu-sheng Zhu, Jun Wang, Jin-hua Wang, Hui Xie, Yan Song. Assessment of genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.2009, 56: 742-746.
2. 刘伟, 朱鲁生, 王军, 王金花, 谢慧. 毒死蜱、马拉硫磷和氰戊菊酯对蚯蚓的急性毒性效应研究, *生态毒理学报*.2009. 4(4).
3. 刘伟, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 宋艳, 王秀国, 王倩, 钱博. 利用吸收光谱法和微核法测定三种农药对 DNA 损伤的作用, *农业环境科学学报*, 2006, 25 (2): 531-534.
4. Y. Song, L.S. Zhu, J. Wang, J.H. Wang, W. Liu, H. Xie .DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology & Biochemistry* .2009. 41:905-909.
5. Yan Song, Lu-sheng Zhu, Hui Xie, Jun Wang, Jin-hua Wang, Wei Liu, Xiao-Li Dong. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(5), 1059-1062.
6. 王倩, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 刘伟, 马婷婷, 董晓丽. 莠去津降解菌 HB-5 的最佳产酶培养基及发酵条件的研究, *环境科学学报*, 2007, 28 (2): 299-304.
7. 钱博, 朱鲁生, 谢慧, 王军, 刘伟, 徐奇峰, 宋艳, 徐荣娟. 毒死蜱降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性研究, *环境科学*, 2007, 28 (12): 2827-2832.
8. 徐荣娟, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 刘伟, 蒋金会. 溴苯腈在土壤及水中残留分析方法的研究, *农业环境科学学报*, 2007, 26 (5): 1837-1842.
9. 谢慧, 朱鲁生, 李文海, 王军, 刘伟, 王秀国, 王倩. 利用降解酶去除蔬菜表面农药毒死蜱残留, *农业环境科学学报*, 2006, 25 (5): 1245-1249.
10. 王秀国, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 刘伟, 王倩, 钱博. 细菌 HB-5 对除草剂莠去津酶促降解的初步研究, *环境科学学报*, 2006, 26(4): 579-583.
11. 宋艳, 朱鲁生, 王军, 谢慧, 刘伟, 王秀国, 王倩, 钱博. 涕灭威及其有毒代谢产物对 DNA 潜在损伤研究, *生态毒理学报*, 2006, 1(1): 40-44.