

文章编号: 1007-4627(2009)01-0076-04

离子注入对黑松花粉粒细胞核的损伤效应*

黄群策¹, 梁秋霞¹, 李国平²

(1 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052;

2 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

摘要: 利用激光扫描共聚焦显微技术和碱性单细胞凝胶电泳技术对经过离子注入后的黑松花粉粒内细胞核的直接损伤效应进行了观察鉴定。研究表明, 离子注入后可以直接损伤细胞核结构, 导致细胞核裂解。细胞核的损伤程度与注入离子的剂量密切相关, 即细胞核DNA分子的损伤程度随着注入离子剂量的增加而提高。

关键词: 黑松; 花粉粒; 细胞核; 离子注入; 损伤效应

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

经过20多年的研究和探索, 离子束生物工程作为一门新兴的交叉学科已经显现出其应有的技术特色, 其技术的实用性和对生物体遗传改良效果的普遍性已经被大量的实验结果所证实^[1]。关于离子束生物工程在未来的发展趋势, 前人的探索性研究结果已经引起了有关学者的关注^[2-6]。由于试验材料的特异性和学科发展的阶段性, 前人在研究低能离子注入所导致的生物学效应的过程中主要以生物个体(种子和植株)为研究材料, 从个体水平上研究离子束的生物效应, 其研究结果的局限性相当明^[7]。在辐射生物学研究中, 关于DNA的损伤与修复问题是重要的研究课题。

黑松花粉粒的形态比较大, 其内所携带的2个细胞核也比较大, 在离体条件下的存活时间比较长, 是研究离子束生物效应的良好材料。我们以黑松花粉粒为试验材料, 利用不同的注入剂量和单细胞凝胶电泳(SCGE)技术对其生物学效应进行了比较研究, 旨在对低能离子注入花粉粒之后细胞内DNA所受到的直接损伤效应进行有效的评估, 进而为从细胞水平和DNA分子水平上解释离子束诱发的突变机理提供参考资料。

2 材料与方法

黑松(*Pinus thunbergii* Parl.), 别名日本黑松(Japanese Black Pine), 为松科松属常绿乔木, 原产于日本和朝鲜, 我国江苏、浙江、安徽及河南等地均有栽培。在2005年4月上旬黑松花粉散发期间, 在河南郑州市滨河公园内人工栽培的成熟黑松树上采集刚开始散粉的雄球花, 将其置于室内让其自然干燥24 h, 以便让花粉粒可以从雄球花中散出。随后, 将收集到的花粉粒置于-20℃冰箱内保存备用。

离子注入试验是在郑州大学离子束生物工程重点实验室进口的俄罗斯产TITAN离子注入机上进行的。在进行离子注入前, 将待处理的花粉粒均匀地撒布在涂有少量胶水的培养皿表面, 将其放入真空小靶室内, 试验材料的表面与离子束发射方向垂直。注入的离子为N离子, 能量为30 keV, 设置8种离子剂量, 即 1×10^{15} , 3×10^{15} , 5×10^{15} , 7×10^{15} , 9×10^{15} , 11×10^{15} , 13×10^{15} 和 15×10^{15} ions/cm²。离子注入机的工作条件采用正常的参数, 即真空度为 5×10^{-2} Pa、采用脉冲注入(频率25 Hz)方式、束流为200 mA。以花粉粒同样撒布在涂有少量胶水的培养皿表面而无离子注入处理的材料作为真空对照处理(即 0×10^{15} ions/cm²)。

在试验中对黑松花粉粒细胞核的荧光染色与

* 收稿日期: 2008-01-22; 修改日期: 2008-07-28

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B-03)

作者简介: 黄群策(1958-), 男(汉族), 广西全州人, 教授, 博士, 博士生导师, 河南省特聘教授, 从事离子束生物技术的研究;

E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn

观察鉴定采用前人建立的常规研究方法, 即试验材料的花粉粒在经过4%戊二醛固定后, 利用10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma产品)试剂对其进行染色处理。随后, 利用激光扫描共聚焦显微镜在UV激发光状态下对试验材料进行观察鉴定, 以确定各份试验材料中细胞核的形态结构特点。对花粉粒细胞核的观察鉴定试验采用3次重复。

利用碱性单细胞凝胶电泳技术对试验材料的特异性进行了比较分析。以无钙镁磷酸缓冲盐溶液(PBS)配制0.5%常温熔点琼脂糖(NMA)溶液, 加热熔化后, 冷却至45 $^{\circ}\text{C}$, 取100 μl 滴于洁净的载玻片上, 立即盖上盖玻片, 使琼脂糖均匀地敷在载玻片上, 将其置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下10 min, 待琼脂糖冷却变硬, 将其作为第一层, 取下盖玻片。以PBS溶液为基础将试验材料的花粉粒配制成细胞悬浮液, 取等量花粉粒悬浮液与0.5%的低熔点琼脂糖(LMA)溶液在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下混合均匀, 迅速将其滴在第一层琼脂糖上面, 加上盖玻片, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下10 min, 使其呈现出硬化状态, 小心地取下盖玻片, 在其上滴加75 μl 浓度为0.5% LMA溶液, 将其作为第三层, 同样加上盖玻片, 让其冷却硬化。接着, 取下盖玻片, 将玻片立即浸入预冷的裂解液(2.5 mol/l NaCl, 100 mmol/l $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10 mmol/l Tris, 临用前加入1%肌氨酸钠, 1% Triton X-100 和10% DMSO, pH为10)中, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置1 h, 目的是使细胞裂解并使DNA松散。取出盖玻片, 吸去液体, 将其放置在水平电泳槽中, 加入电泳液(1 mmol/l $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 300 mmol/l NaOH), 液面高出玻片0.25 cm, 静置20 min, 待DNA解螺旋后, 在25 V和300 mA条件下进行30 min电泳处理。过后取出盖玻片以PBS溶液对其进行冲洗, 置于Tris-HCl缓冲液(pH为7.5)中进行染色处理。最后再用Leica TCS-SP2型激光扫描共聚焦显微镜对制片材料的形态特征进行观察鉴定。UV激光器激发, DAPI滤镜组合, 每组至少随机地测量1 000枚花粉粒。该项鉴定试验重复2次。

3 结果与分析

3.1 低能N离子注入对花粉粒细胞核的损伤状态

前人的研究结果已经证实, 在黑松成熟花粉粒内包含4个细胞, 即2个处于退化状态的原叶细胞、

1个生殖细胞和1个管细胞(营养细胞)。2个原叶细胞退化后仅仅留下线状结构, 因而在黑松花粉粒内包含着2个完整细胞, 它们分别具有1个细胞核。在本试验中, 花粉粒经过固定、DAPI染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下可以清晰地观察到花粉粒内的生殖细胞核和管细胞核(营养细胞核)。在对照材料的花粉粒内包含着2个细胞核, 上面为管细胞核, 近于圆型; 下面为生殖细胞核, 呈椭圆型。对照花粉粒内的细胞核形态一致, 结构完整。然而, 试验材料经过低能N离子注入处理之后, 其花粉粒内的细胞核形态结构发生了明显的变化, 其形态变异的程度随离子注入剂量的增加而显得明显。并且, 随着离子注入剂量的增加则其正常细胞核的频率会依次降低, 而异常细胞核的发生频率会依次提高(见表1)。在试验中, 经过对观察数据进行SPSS单因素方差分析确定, 各份被离子注入处理的材料与对照材料相比, 在细胞核正常率上存在着极显著的差异($p < 0.01$)。由此可见, 低能N离子注入处理会明显地破坏花粉粒内细胞核的形态结构, 其形态学上的损伤效应相当明显。

表1 低能N离子注入与黑松花粉细胞核的损伤

注入剂量($N \times 10^{15}$) /(ions/ cm^2)	正常细胞核(%)
0(ck)	96.9 \pm 2.4
1	74.0 \pm 4.8
3	49.2 \pm 5.2
5	32.5 \pm 6.0
7	29.9 \pm 6.9
9	24.3 \pm 5.5
11	16.8 \pm 3.5
13	9.0 \pm 2.3
15	8.5 \pm 2.5

观察结果表明, 在经过低能N离子注入处理后, 黑松花粉粒内异常细胞核形态结构的变异特征因离子注入剂量的不同而表现出一定的特异性。当离子注入剂量为 1×10^{15} ions/ cm^2 时, 在2个细胞核中有1个受到损伤, 受到损伤的细胞核在形态上表现为细胞核出现裂隙; 当离子注入剂量为 3×10^{15} ions/ cm^2 时, 2个细胞核均受到损伤, 细胞核出现缺刻现象; 离子注入剂量在 5×10^{15} 和 9×10^{15}

ions/cm²的范围内,细胞核的损伤程度更加明显,细胞核形态异常,表现为1个细胞核被裂解为2个,在1枚花粉粒细胞内存在着3—4个小核。离子注入剂量在 $11 \times 10^{15} - 15 \times 10^{15}$ ions/cm²的范围内,细胞核受到的损伤更严重,细胞核的异常频率更高,异常细胞核表现为细胞核原有的形态结构丧失,细胞核裂解成碎片,核质呈弥散状态(见图1)。

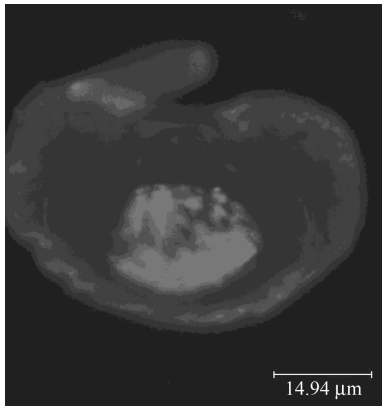


图1 经过离子注入后核质呈弥散状态

3.2 碱性单细胞凝胶电泳图像的特异性

在本试验中,利用碱性单细胞凝胶电泳技术对试验材料的特异性进行了比较分析。试验材料的花粉粒经过特殊去壁处理后,可以获得去壁花粉粒(原生质体)和游离细胞核。由于脱去了细胞壁,适合作为碱性单细胞凝胶电泳的材料。试验结果表明,离子注入处理会引起细胞核DNA单链断裂。在对照材料中花粉粒内的营养细胞核具有正常的形态结构,花粉粒内的生殖细胞核,经过电泳后它们并没有表现出“彗星状”尾部。

在经过低能N离子注入处理之后,黑松花粉粒内异常细胞核DNA发生单链断裂的现象很明显。前人的研究结果已经证实,当细胞核DNA解旋和发生DNA单链断裂后,在电泳电场作用下,断裂DNA会离开细胞核向阳极迁移,形成拖尾(即“彗星状”尾部)。观察鉴定结果表明,在被处理的试验材料中,形成“彗星状”尾部的细胞比率随着离子注入剂量的增加而提高,每个细胞核DNA(即“彗星状”尾部)迁移长度也随着离子注入剂量的增加而增长。在中低剂量范围内($1 \times 10^{15} - 7 \times 10^{15}$ ions/cm²),营养细胞核的电泳图像有其特色。在高剂量范围内($9 \times 10^{15} - 15 \times 10^{15}$ ions/cm²),营养细胞核和生

殖细胞核的电泳图像更能显示出其DNA“彗星状”尾部的形态特征(见图2)。

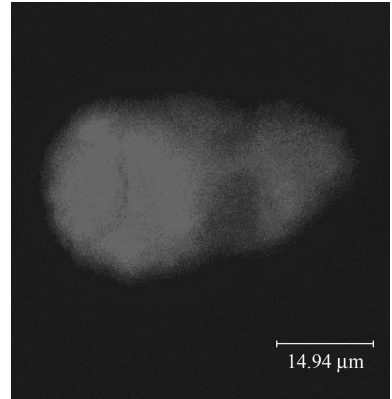


图2 经过离子注入后管细胞核呈“彗星状”尾部的形态特征

4 讨论

关于低能离子注入的细胞学效应研究,前人在以植物为试验材料的研究中主要涉及到离子注入后根尖细胞有丝分裂或花粉母细胞减数分裂期间的染色体畸变特征。由于黑松的花粉粒具有特殊的形态结构和在离体条件下存活时间比较长,它是低能离子束生物效应研究中比较好的试验材料。我们曾以黑松花粉粒和花粉管为试验材料,经过离子注入后对细胞骨架系统的损伤效应进行过研究,其研究结果进一步证实了离子束所导致的生物学效应^[8,9]。

在本试验中,利用机械方法去掉花粉粒的细胞壁,获得去壁花粉粒和花粉粒细胞核,它们适合于利用碱性SCGE技术评估离子注入对花粉粒细胞DNA的损伤程度。从本项研究中的碱性单细胞凝胶电泳图像来看,离子注入导致花粉粒细胞核呈现出“彗星状”外观形态,这表明细胞核DNA分子发生了单链断裂(SSB),由此揭示了离子注入可以诱发细胞核产生DNA损伤。并且,细胞核“彗星状”尾部的长度与离子注入剂量相关,这表明细胞核DNA分子的损伤程度随着注入离子剂量的增加而提高。

本试验利用细胞核荧光染色技术分析离子注入黑松花粉粒后所导致的细胞核损伤效应,并且应用单细胞凝胶电泳技术检测了离子注入导致的细胞核DNA损伤,从细胞水平和分子水平证实,离子注入对细胞核的直接损伤效应。由此所获得的试验结果一方面说明低能离子束对植物体诱变效应的真实性和可遗传性,另一方面也在细胞水平揭示了经过

离子注入后诱发生物体发生遗传性突变的机制, 这为离子束生物工程学的理论研究和应用研究提供了一些基础性试验依据。

参考文献 (References):

- [1] Yu Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology. New York, USA: Springer Science Business Media, Inc, 2006, 110.
- [2] Li Xingling, Wei Zengquan, Li Weijian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2001, 18(2): 125(in Chinese).
(李兴林, 卫增泉, 李文建等. 原子核物理评论, 2001, 18(2): 125.)
- [3] Huang Qunce, Qin Guangyong. Journal of Zhengzhou University, 2003, 35(4): 31(in Chinese).
(黄群策, 秦广雍. 郑州大学学报, 2003, 35(4):31.)
- [4] Huang Qunce. Journal of Zhengzhou University, 2007, 39(2): 167(in Chinese).
(黄群策. 郑州大学学报, 2003, 39(2): 167.)
- [5] Gu Yuehua. Nuclear Technques, 2000, 23(8): 587(in Chinese).
(顾月华. 核技术, 2000, 23(8): 587.)
- [6] Lazzaro M D, Donohue J M, Soodavar F M. Protoplasma, 2003, 220: 201.
- [7] Huang Qunce. Nuclear Physics Review, 2007, 24(1): 59(in Chinese).
(黄群策. 原子核物理评论, 2007, 24(1): 59.)
- [8] Huang Qunce, Liang Qiuxia, Li Guoping. Nuclear Physics Review, 2008, 25(3): 282(in Chinese).
(黄群策, 梁秋霞, 李国平. 原子核物理评论, 2008, 25(3): 282.)
- [9] Huang Qunce, Liang Qiuxia, Li Guoping. Nuclear Physics Review, 2008, 25(4): 409(in Chinese).
(黄群策, 梁秋霞, 李国平. 原子核物理评论, 2008, 25(4): 409.)

Damage Effects of Pollen Nuclei of *Pinus thunbergii* Induced by Ion Beam Implantation*

HUANG Qun-ce^{1, 1)}, LIANG Qiu-xia¹, LI Guo-ping²

(1 Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2 Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

Abstract: The damage of pollen nuclei of *Pinus thunbergii* induced directly by ion implantation were measured by the laser confocal microscopy technique and the single-cell gel electrophoresis test. The results showed that ion implantation caused the nuclei structure to be damaged, leading to the nuclei degradation. The results of statistical analysis showed that the damage grade of nuclei was very correlative with the ion dosage. The damage degree of DNA in the nuclei at the level of single cells was increased with the increase of the ion implantation dose.

Key words: *Pinus thunbergii*; pollen; nuclei; ion implantation; damage effect

* Received date: 22 Jan. 2008; Revised date: 28 Jul. 2008

* Foundation item: National Key Projects of China (2001BA302B-03)

1) E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn