

孟祥盈, 陈操, 白敏冬, 等. 羟基自由基对塔玛亚历山大藻 DNA 破坏研究[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(8): 22-26. Meng Xiangying, Chen Cao, Bai Mindong, et al. Damage to *Alexandrium tamarense* DNA caused by hydroxyl radicals[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(8): 22-26.

# 羟基自由基对塔玛亚历山大藻DNA破坏研究

孟祥盈<sup>1</sup>, 陈操<sup>1</sup>, 白敏冬<sup>1,2\*</sup>, 程超<sup>1</sup>

(1.大连海事大学轮机工程学院, 辽宁 大连 116026; 2.厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361005)

**摘要** 利用羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )压载水处理系统,采用大气压强电场放电技术制取 $\cdot\text{OH}$ 溶液对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)进行处理。通过普通光学显微镜、荧光显微镜和电子显微镜对 $\cdot\text{OH}$ 处理前后的塔玛亚历山大藻的细胞结构进行观测。结果表明, $\cdot\text{OH}$ 能有效破坏藻细胞,从而造成藻类死亡。利用随机扩增多态性DNA(random amplification polymorphic DNA, RAPD)和实时定量PCR(RT-PCR)相结合的技术检测 $\cdot\text{OH}$ 对DNA链的破坏作用。共得到了3条有显著差异的扩增产物。这3条扩增产物经测序,并通过NCBI(national center of biotechnology information)的比对分析,最终得到1条可用RT-PCR检测 $\cdot\text{OH}$ 对DNA破坏作用的基因序列。以上的结果表明, $\cdot\text{OH}$ 压载水处理系统能有效去除塔玛亚历山大藻,并对其DNA造成破坏。

**关键词** 塔玛亚历山大藻; 压载水处理系统; 羟基自由基; RT-PCR

中图分类号: X55 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1003-6504.2016.08.005 文章编号: 1003-6504(2016)08-0022-05

## Damage to *Alexandrium tamarense* DNA Caused by Hydroxyl Radicals

MENG Xiangying<sup>1</sup>, CHEN Cao<sup>1</sup>, BAI Mindong<sup>1,2\*</sup>, CHENG Chao<sup>1</sup>

(1. Institute of Marine Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China;

2. College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** This paper referred to a ballast water treatment system by using hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), in which the atmospheric pressure electric discharge technology was applied to produce hydroxyl radicals to treat *Alexandrium tamarense*. The morphology of *A. tamarense* before and after being treated by  $\cdot\text{OH}$  was observed by ordinary optical microscope, fluorescence microscope and electron microscope, respectively. The findings presented that  $\cdot\text{OH}$  effectively did damage to the algal cells and led to algae perishing and the damage of  $\cdot\text{OH}$  to DNA strand was detected by using combination of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and RT-PCR technology. In addition, three DNA bands with differences were found and sequenced; then sequence alignment was performed in the website of National Center of Biotechnology Information (NCBI). Finally, a gene sequence was found for RT-PCR analysis that further proved the damage to DNA strand. In conclusion, the ballast water treatment system of  $\cdot\text{OH}$  was capable to removes *A. tamarense* in water effectively, causing damages of the DNA strand.

**Key words:** *Alexandrium tamarense*; ballast water treatment; hydroxyl radical; RT-PCR

压载水是为了保证船体平衡和结构稳定而向压载舱注入的水。当船装载货物时压载水就会被排放出去。压载水内含有许多微生物。当它们被带到一个新的海洋环境中时,就会对当地的生态系统造成威胁。因此国际海事组织(International Maritime Organization, IMO)制定了压载水排放公约。该公约规定压载水排放后,体长小于 50  $\mu\text{m}$  的藻类不能超过 10 cells/mL。

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)是压载水中一种常见的有害藻类,其具有适应能力强、生存范围广的特点。塔玛亚历山大藻还是重要的赤潮藻类,其所产生的麻痹性贝毒素在一定条件下可通过食物链在鱼类、贝类等生物体内蓄积,对人类产生危害,成为影响水产品食用安全的重要因素。

目前,许多国际组织和研究机构在研究有效的方

《环境科学与技术》编辑部 (网址) <http://tjks.chinajournal.net.cn/> (电话) 027-87643502 (电子信箱) [hjkyjs@vip.126.com](mailto:hjkyjs@vip.126.com)

收稿日期 2015-10-30 修回 2015-12-30

基金项目: 中国杰出青年学者基金(NSFC)(61025001); 中国国家科技支撑项目(2013BAC06B00); 海洋科学研究公共利益的专项基金

作者简介: 孟祥盈(1983-),男,博士研究生,主要研究方向为海洋污染防控 (电子信箱) [dameng12@foxmail.com](mailto:dameng12@foxmail.com) \* 通讯作者,教授 (电子信箱) [mingdong\\_bai@163.com](mailto:mingdong_bai@163.com)

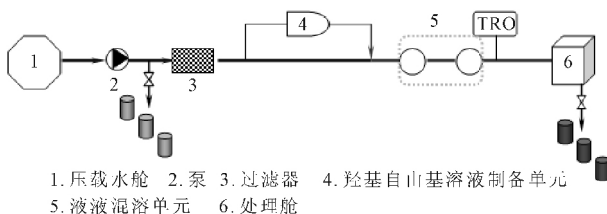
法来解决压载水生物入侵的问题<sup>[1-3]</sup>。其中高级氧化技术生产的羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )对压载水有害生物进行处理是一种有效方法<sup>[4]</sup>。但目前,世界上还没有一种方法可以大规模生产高浓度的 $\cdot\text{OH}$ 溶液。本实验室自制等离子体发生装置,通过采用特殊的加工工艺和特殊的电介质层,在常温常压下利用强电场电离放电方法制取高浓度的、氧化能力极强的单原子氧和 $\cdot\text{OH}$ 等活性粒子。这些活性粒子可以快速有效地氧化和分解各种有机污染物。与传统高级氧化技术制取 $\cdot\text{OH}$ 相比,该设备制取 $\cdot\text{OH}$ 溶液浓度高,且设备体积小、操作简便、无毒害、安全性高,弥补了传统方法的不足。

在 $\cdot\text{OH}$ 杀灭藻类的过程中,对于单细胞藻类来说,外源性 $\cdot\text{OH}$ 引起的 DNA 氧化损伤可导致 DNA 中遗传信息的稳定性受到破坏,进而导致细胞死亡。随机扩增多态性 DNA (random amplification polymorphic DNA, RAPD)方法是通过检测大量 DNA 的随机片段最终确定 DNA 的损伤程度<sup>[5-6]</sup>。再经过实时定量 PCR(RT-PCR)的验证,可以准确判断某个基因片段的损伤。本文研究大气压强电场放电技术制取 $\cdot\text{OH}$ 溶液致死塔玛亚历山大藻。同时利用 RAPD 和 RT-PCR 相结合的技术检测 $\cdot\text{OH}$ 对 DNA 链的破坏作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 $\cdot\text{OH}$ 处理系统及实验过程

图 1 是压载水处理装置图,其核心部分是 $\cdot\text{OH}$ 发生器<sup>[7-8]</sup>。等离子体在 $\cdot\text{OH}$ 发生器的整个微间隙中的强电场下放电产生大量微流柱。这一过程中有一个均匀分布的、稳定的放电现象,它类似于辉光放电。在微流通道中,大量的活性粒子的产生导致一系列等离子体的化学反应。该系统的处理压载水的能力为 0.6 t/h。压载水通过水泵进入主管路。机械过滤器分离体长大于 50  $\mu\text{m}$  浮游生物。然后一部分压载水的通过 $\cdot\text{OH}$ 发生器产生高浓度的 $\cdot\text{OH}$ 溶液。该溶液被注入到液液混容器中。在完全混溶后,稀释的 $\cdot\text{OH}$ 溶液在主管路中完成杀藻过程。本实验中的测试海水体积为 70 L。为保证实验系统的可靠性,待系统稳定运行 30 s 后,每隔 30 s 取样品,每次样品取 5 L,共取 5 次。



1. 压载水舱 2. 泵 3. 过滤器 4. 羟基自由基溶液制备单元  
5. 液液混溶单元 6. 处理舱

图1 压载水处理系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of  $\cdot\text{OH}$  ballast water treatment system

### 1.2 实验藻种

塔玛亚历山大藻由辽宁水产研究所提供。藻种用 5 L 的锥形瓶进行扩大培养,温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 4 500 lx, pH 值 8.0,光暗比为 12 h:12 h。在研究 $\cdot\text{OH}$ 对塔玛亚历山大藻杀灭实验时所用的藻浓度分别为 5 000 和 10 000 cells/mL。在研究 $\cdot\text{OH}$ 对塔玛亚历山大藻 DNA 破坏的研究中,采取的藻浓度是 10 000 cells/mL。在藻类计数和 DNA 损伤研究中,每次实验重复 5 次以保证实验的重复性和准确性。

### 1.3 藻类收集

用离心的方法收集藻类,具体方法如下:

(1)取 100 mL 待测藻类样品放入 250 mL 离心管中,用冷冻离心机以 4 000 r/min 离心 15 min,去除上清。

(2)在离心管中加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(pbs),并把藻液转移到 15 mL 的离心管中,以 6 000 r/min 离心 10 min,去除上清。

(3)在离心管中加入 1 mL pbs,并把藻液转移到 1.5 mL 离心管中,以 12 000 r/min 离心 10 min,去除上清。重复此过程 2 次。

### 1.4 藻类检测方法

处理前后的塔玛亚历山大藻采用荧光直接计数法计数。将离心分离出来的塔玛亚历山大藻用的荧光素双醋酸酯(FDA)和碘化丙啶(PI)双染色法对藻类进行染色。在蓝色激发光下,活藻细胞呈绿色,死藻细胞呈红色。计数时,将待测藻类放入生物计数框,在荧光显微镜(奥林巴斯 CX41)的蓝色激发光下观察细胞,并计数、拍照。每个样品做 3 个平行的计数。

扫描电镜用于观察处理前后观察塔玛亚历山大藻的形态变化。取 10 mL 待测藻类样品放入 15 mL 的离心管中,用冷冻离心机以 6 000 r/min 离心 10 min,去除上清。重复 1.3 节藻类收集过程(3)。将离心分离出来的塔玛亚历山大藻用 2.5%戊二醛(pbs 配制)固定 2 h。将样品用乙醇脱水。然后样品用冷冻干燥机进行干燥。在电镜下观察,并拍照。

### 1.5 TRO 含量的测定

在 $\cdot\text{OH}$ 生成过程中,所有气体基团均转化成活性氧粒子,除了 $\cdot\text{OH}$ ,还包括 $\text{HO}_2^{\cdot}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HO}_3^{\cdot}$ 、 $\text{O}_2^+ + \text{H}_2\text{O}$ 等,这些物质也能够快速杀死有害水生物和病原体。但由于不能快速直接检测这些成分的含量,因此我们用总残余氧化剂(total residual oxidant, TRO)的消耗量间接表示这些物质的浓度。实验时,首先检测未加入藻类时的 TRO 浓度,然后在相同条件下检测加入藻类后的 TRO 浓度。加藻前 TRO 浓度与加藻后 TRO 浓度之差即为杀灭藻类需要的 TRO 浓度。TRO 的浓

度采用  $N,N$ -二乙基对苯二胺 (DPD, 美国 EPA-8016) 法, 用紫外分光光度计 (BioQuest CE2501, 英国) 测试吸光度。

### 1.6 DNA 检测

(1) 基因组 DNA 检测: 采用离心的方法收集用于 DNA 检测的藻细胞 (1.3 节藻类收集过程 (1)~(3))。将收集到的藻细胞按 DNA 提取试剂盒 (Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0, 宝生物工程大连有限公司) 说明书进行操作。最后将提取好的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。利用凝胶成像仪 (Universal Hood II, BIO-RAD) 拍照。

(2) 总 RNA 提取: 采用 Trizol 一步法提取塔玛亚历山大藻的总 RNA。用 1% 的琼脂糖凝胶检测总 RNA 的质量。然后采用紫外分光光度计测量 RNA 样品在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 比较  $A_{260}/A_{230}$  和  $A_{260}/A_{280}$  的比值, 以确定提取的总 RNA 样品的质量和浓度。选用  $A_{260}/A_{280}$  的比值在 1.95~2.05 之间的 RNA 用于后续实验。

(3) cDNA 合成: 把提取的总 RNA 中的 mRNA 利用逆转录酶人工合成双链 DNA。这一步反应使用反转录试剂盒来完成的。按照 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Canada) 说明书进行操作。

(4) RAPD-PCR 扩增: 随机选取 10 bp 的 RAPD 引物 20 对, 委托宝生物工程大连有限公司合成。对处理前后的藻类 DNA 进行扩增。PCR 扩增总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA 约 50 ng,  $10\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 引物 1  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), dNTP 混合物 2  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 36  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 40 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。得到的 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶下电泳检测并拍照。

(5) 回收测序: 在 20 条随机引物中共筛选出有稳定显著差异的条带, 将这些有差异的条带按照 DNA 凝胶回收按纯化试剂盒 (DNA Extraction Kit) 中的操作手册进行纯化回收。将回收的基因片段送到宝生物公司进行测序。

(6) 比对分析: 将测序结果在 NCBI 在线 BLAST 工具进行序列比对分析, 比对的序列是甲藻门的 mRNA。找到与亚历山大藻序列相似度高的序列, 并按照此序列设计引物用于实时定量 PCR 分析。

(7) RT-PCR: 将合成的 RT-PCR 引物以处理前塔玛亚历山大藻的反转录产物 cDNA 为模板进行普通 PCR 扩增。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并

在凝胶成像仪的紫外灯下观察。如果条带单一, 片段大小与设计引物时的大小一致, 就可以在实时荧光定量 PCR 仪上进行引物检测。反应体系如下: 12.5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ), 1  $\mu\text{L}$  引物, 2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 8.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 总计 25  $\mu\text{L}$ 。使用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 系统进行扩增, PCR 反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 此过程进行 45 个循环。溶解曲线程序如下: 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 最后 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\cdot\text{OH}$ 对塔玛亚历山大藻的杀灭效果

塔玛亚历山大藻的主要危害有 2 个, 一是产生赤潮, 二是产生毒素。因此, 对亚历山大藻的治理研究受到世界的广泛关注。在本研究中, 压载水处理系统直接产生自由基, 因此对亚历山大藻的杀灭是瞬间完成的。由图 2 可以看出, 随着 TRO 浓度的升高, 塔玛亚历山大藻的浓度降低。在初始浓度为  $5\times 10^3$  cells/mL 时, 将藻完全致死的  $\cdot\text{OH}$  浓度为 0.58 mg/L。藻初始浓度为  $1\times 10^4$  cells/mL 时,  $\cdot\text{OH}$  完全致死浓度为 0.83 mg/L。可见,  $\cdot\text{OH}$  对塔玛亚历山大藻的完全致死浓度随藻液的初始浓度升高而升高。但 TRO 浓度与藻类死亡数量不呈线性关系。这表明, 藻类有一定的耐受性, 当  $\cdot\text{OH}$  的浓度比较低时不足以杀死藻类。只有当  $\cdot\text{OH}$  浓度超过某一特定值, 大量的藻类才能被杀死。经过  $\cdot\text{OH}$  氧化处理后, 每毫升的藻浓度减少到 10 个以下, 达到了 IMO 的 D-2 排放标准。

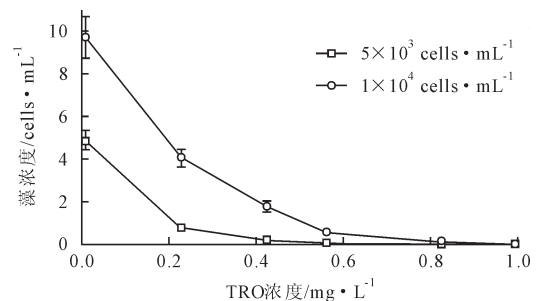


图2 塔玛亚历山大藻浓度与TRO的关系  
Fig.2 Relationship between concentrations of *Alexandrium tamarense* and TRO

### 2.2 藻类形态在 $\cdot\text{OH}$ 处理前后的变化

图 3(a) 是塔玛亚历山大藻处理前后的荧光照片。处理前的塔玛亚历山大藻有很强的活性, 染色后发出绿色荧光。而处理后的塔玛亚历山大藻丧失活性。细胞受到破坏, 染色剂 PI 进入细胞内, 使藻细胞发出红色荧光。

为了观察  $\cdot\text{OH}$  对藻细胞的破坏程度, 本实验对处理前后的藻细胞进行了电子显微镜拍照。图 3(c) 是利

用扫描电镜对塔玛亚历山大藻拍摄的照片。在处理前,在扫描电镜下细胞整体呈现圆形,横沟位于细胞中央。塔玛亚历山大藻的表面光滑,纹理清晰。能清晰的观察到塔玛亚历山大藻的横沟。上壳与下壳半球形,大小相近。 $\cdot\text{OH}$  氧化处理促使藻体细胞向周围的介质中释放了大量的胞内物质,使细胞褶皱萎缩。这种现象可能是由于 $\cdot\text{OH}$  氧化破坏了细胞的鞘套使其外壳开裂,从而造成藻类细胞胞内物质的外流。 $\cdot\text{OH}$  氧化对藻类细胞的另一个破坏作用就是造成了外部鞘套的强烈卷绕。 $\cdot\text{OH}$  氧化使细胞表面结构受到严重破坏。原来塔玛亚历山大藻平滑的表面消失,外部鞘套受到破坏,细胞体塌陷,外部的长刺脱落。上述 $\cdot\text{OH}$  氧化对藻细胞的 2 种影响可能同时存在,即 $\cdot\text{OH}$  氧化首先造成藻细胞体外壳的卷绕,并刺激其过度分泌胞内物质,进一步的氧化作用会使细胞鞘套开裂致使胞内物质大量外流。由 $\cdot\text{OH}$  氧化前后藻体细胞的电子扫描显微镜对比结果可以看出, $\cdot\text{OH}$  氧化对藻体细胞结构造成了明显的影响。Olivier 等研究发现, $\cdot\text{OH}$  破坏线粒体呼吸链从而导致细胞的死亡。但是由于 $\cdot\text{OH}$  浓度低,他们没有发现细胞被破坏的现象<sup>[9]</sup>。

由于扫描电镜观察到的只是塔玛亚历山大藻的表面特征,而囊壳的颜色、厚度、原生质体的构造等都无法看到。因此在本研究中,在光学显微镜对塔玛亚历山大藻特征进行了观察。由图 3(b)可以看出,在 $\cdot\text{OH}$  的处理之前,藻细胞的边缘是平滑的,藻细胞的形状是正常的。同样,细胞壁也十分平滑而且没有受到任何损伤。细胞内的物质均匀分布,细胞色素浓而明亮,细胞器清晰可见。 $\cdot\text{OH}$  处理后,细胞受到明显损伤,藻细胞颜色显著改变,大量的细胞内物质溢出,说明细胞膜被破坏。塔玛亚历山大藻细胞膜被破坏后使得一些细胞器消失。而细胞内物质泄漏、丢失、破碎对塔玛亚历山大藻是致命的。

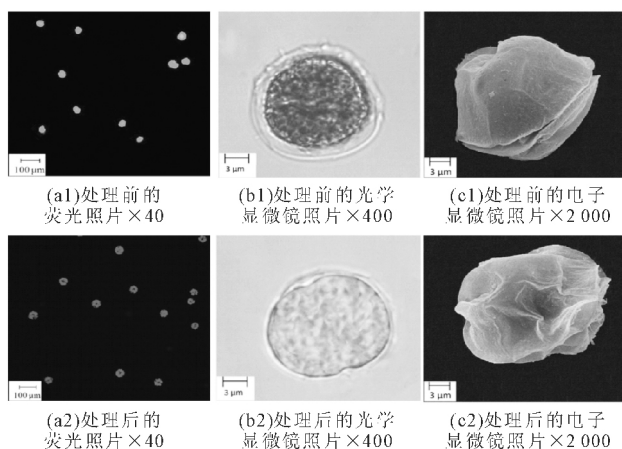


图3 塔玛亚历山大藻形态照片  
Fig.3 Micrographs of microalgae treated by  $\cdot\text{OH}$

### 2.3 TRO 处理后 DNA 的变化

图 4 为 TRO 浓度为 0.83 mg/L 时对塔玛亚历山大藻 DNA 破坏作用的电泳图。此时藻类已经全部被杀死。从图 4 可以看到,处理前 DNA 条带清晰明亮,在经过羟基处理后, DNA 条带出现了部分弥散的现象,说明 DNA 链的完整性已受破坏。

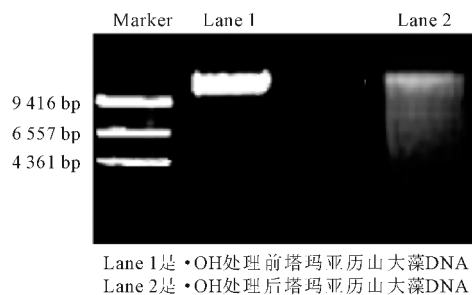


图4  $\cdot\text{OH}$  处理前后塔玛亚历山大藻 DNA 的变化  
Fig.4 DNA bands of untreated and treated *Alexandrium tamarense* by  $\cdot\text{OH}$

以 RAPD 为基础的 DNA 指纹图谱技术能对研究生物基因组不了解的情况下检测 DNA 遗传变异<sup>[10-11]</sup>。理论上 RAPD 能产生无数个小于 3 kb 的扩增片段,这些扩增片段可以作为反映 DNA 受损程度的标志物。RAPD 图谱的片段多样性主要是因为 DNA 损伤造成引物结合位点的缺失或新结合位点的出现、引物互补性与引物结合位点距离的改变等。因此,基因组上发生的任何变化,如突变、倒置、缺失或染色体的重排等损伤均能影响引物的扩增结果,在扩增图谱上直观的表现特征为特征带的缺失和亮度的强弱变化<sup>[12]</sup>。本研究以塔玛亚历山大藻基因组 DNA 为模板,进行随机引物扩增。如图 5 所示,经过处理后塔玛亚历山大藻基因组 DNA 与对照组相比,扩增条带有明显的变化。处理后的 DNA 条带变淡或消失。这些差异片段的的存在表明 $\cdot\text{OH}$  处理已经在一定程度上造成塔玛亚历山大藻基因组 DNA 发生了畸变。RAPD 方法快速、无辐射,而且适用于各种生物,并且可以检测广泛的 DNA 损伤。这种方法已经成功研究了各种污染物对生物基因的损伤,因此, RAPD 是一个非常具有潜力的研究 DNA 损伤的手段。

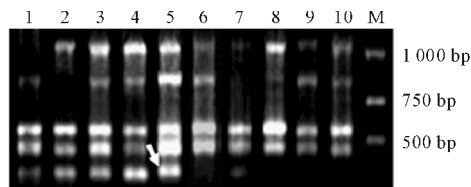
### 2.4 实时定量 PCR 结果

尽管 RAPD 方法可以定性的表现出塔玛亚历山大藻 DNA 的破坏作用,但因为 RAPD 方法重复性差,不能得到完全令人信服的证据。因此本研究对出现差异的 RAPD 条带进行回收测序。得到的序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 blast 比对分析。本研究中共测得 3 条序列,其中一条序列(图 5(c))比对上塔玛亚历山大藻热应激基因序列(GenBank 号为 GU295210)。根据此条序列设计引物,利用 RT-PCR

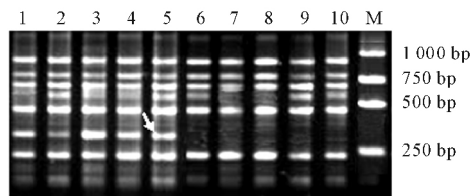
对这个基因序列进行检测。进一步验证·OH对塔玛亚历山大藻 DNA 的破坏作用。这条引物序列为：

F :CGCTAACCACGACTTTCT

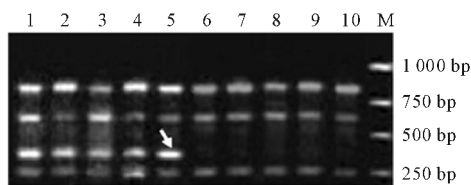
R :ATGAGGACTCCACCAACC



(a)引物GTCCACACGG扩增产物



(b)引物CTCGAGCGCG扩增产物



(c)引物CAGAGGACCT扩增产物

泳道1、2、3、4、5是处理前塔玛亚历山大藻DNA的RAPD扩增产物；泳道6、7、8、9、10是处理后塔玛亚历山大藻DNA的RAPD扩增产物；泳道M是DNA marker。

图5 ·OH处理前后塔玛亚历山大藻DNA进行RAPD扩增图谱  
Fig.5 RAPD profiles of genomic DNA from *Alexandrium tamarense*

如图6所示,处理前的3组平行样品表现出非常好的重复性,在第19个循环后DNA开始指数增长。但处理后的3组平行样品没有扩增出DNA。RT-PCR可以精确检测某个基因在不同个体中的表达量的变化<sup>[13]</sup>。本实验结果说明处理后的塔玛亚历山大藻热应激的基因序列受到了破坏。热应激蛋白(HSPs)是生物细胞受应激作用而合成的一组高度保守的蛋白质。热应激蛋白主要作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运及组装等过程<sup>[14]</sup>。如果细胞不能合成热应激蛋白,细胞则不能恢复或加速清除细胞内已变性的蛋白质而稳定细胞结构,从而导致细胞死亡。

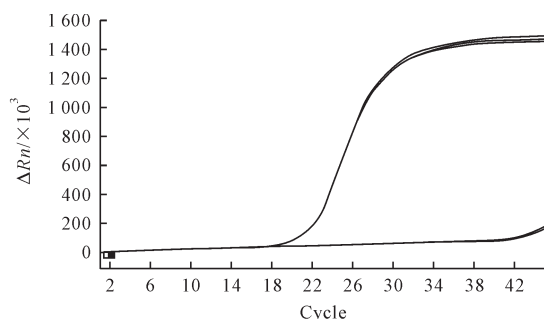


图6 ·OH处理前后塔玛亚历山大藻基因RT-PCR扩增曲线  
Fig.6 Amplification curve of cDNA from *Alexandrium tamarense*

### 3 结论

本文研究了·OH对塔玛亚历山大藻的致死作用。在TRO浓度分别为0.54 mg/L和0.83 mg/L时,可以将浓度为5 000 cells/mL和10 000 cells/mL的塔玛亚历山大藻杀灭。对·OH处理前后塔玛亚历山大藻细胞显微观察证明藻细胞结构在处理受到破坏。DNA电泳表明了·OH对塔玛亚历山大藻的DNA有破坏作用。RAPD和RT-PCR相结合的技术进一步证明了这种破坏作用。

#### [参考文献]

- [1] Wang TN, Bailey SA, Reid DF, et al. Efficacy of NaCl brine for treatment of ballast water against freshwater invasions[J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2012, 38(1): 72-77.
- [2] Shah AD, Liu ZQ, Salhi E, et al. Formation of disinfection by-products during ballast water treatment with ozone, chlorine, and peracetic acid: influence of water quality parameters[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2015(1): 465-480.
- [3] Maranda L, Cox AM, Campbell RG, et al. Chlorine dioxide as a treatment for ballast water to control invasive species: shipboard testing[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 75(1): 76-89.
- [4] Hou Y, Li X, Zhao Q, et al. Role of hydroxyl radicals and mechanism of *Escherichia coli* inactivation on Ag/AgBr/TiO<sub>2</sub> nanotube array electrode under visible light irradiation[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(7): 4042-4050.
- [5] Ercan FS. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect DNA damage induced by *Prangos ferulacea* (*Umbelliferae*) essential oil against the *Mediterranean flour moth Ephestia kuehniella* Zeller (*Lepidoptera: Pyralidae*) [J]. *Archives of Biological Sciences*, 2014, 67(1): 235-239.
- [6] Kumar P, Kumar R, Nagpure NS, et al. *In vivo* assessment of DNA damage in *Cyprinus carpio* after exposure to potassium dichromate using RAPD[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2015(39): 121-127.
- [7] Bai M, Zhang Z, Xue X, et al. Killing effects of hydroxyl radical on algae and bacteria in ship's ballast water and on their cell morphology[J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2010, 30(6): 831-840.
- [8] Bai M, Bai X, Zhang Z, et al. Treatment of red tide in ocean using non-thermal plasma based advanced oxidation technology[J]. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2005, 25(5): 539-550.

(下转第 34 页)

- 水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京:中国环境科学出版社, 2002.
- Water and Wastewater Monitoring Analysis Editorial Committee, State Environmental Protection Administration. Water and Wastewater Monitoring Analysis Method [M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (in Chinese)
- [21] 胡建, 郭太龙, 卓慕宁, 等. 华南红壤坡面产流产沙过程模拟降雨试验研究[J]. 生态环境学报, 2013(5): 787-791.
- Hu Jian, Guo Tailong, Zhuo Muning, et al. Erosion process on red soil slope in south China under simulated rainfall system[J]. Ecology and Environmental Science, 2013, 22(5): 787-791. (in Chinese)
- [22] 范章怀. 红壤坡面水土流失与元素迁移规律研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2008.
- Fan Zhanghuai. Study on Sloping Soil Erosion and Elements Migration in Red Soil[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2008. (in Chinese)
- [23] 孙长忠, 黄宝龙, 陈海滨, 等. 黄土高原人工植被与其水分环境相互作用关系研究[J]. 北京林业大学学报, 1998(3): 10-17.
- Sun Changzhong, Huang Baolong, Chen Haibin, et al. Interaction between soil water conditions and different kinds of artificial plant cover in the loess plateau[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1998(3): 10-17. (in Chinese)
- [24] 郑海金, 胡建民, 黄鹏飞, 等. 红壤坡耕地地表径流与壤中流氮磷流失比较[J]. 水土保持学报, 2014(6): 41-45.
- Zheng Haijin, Hu Jianmin, Huang Pengfei, et al. Comparative study of nitrogen and phosphorus through surface flow and interflow on red soil farmland[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2014(6): 41-45. (in Chinese)
- [25] 李恒鹏, 金洋, 李燕. 模拟降雨条件下农田地表径流与壤中流氮素流失比较[J]. 水土保持学报, 2008(2): 6-9.
- Li Hengpeng, Jin Yang, Li Yan. Comparative study of nitrogen losses between surface flow and interflow of farmland under artificial rainfall conditions[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2008(2): 6-9. (in Chinese)
- [26] 吴希媛, 张丽萍, 张妙仙, 等. 不同雨强下坡地氮流失特征[J]. 生态学报, 2007, 27(11): 4576-4582.
- Wu Xiyuan, Zhang Liping, Zhang Miaoxian, et al. Research on characteristics of nitrogen loss in sloping land under different rainfall intensities[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(11): 4576-4582. (in Chinese)
- [27] 耿洁. 双坡度条件下不同母质土壤壤中流发育及氮素淋失特征[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- Geng Jie. Subsurface Flow Development and Nitrogen Leaching Characteristics of Dual Slope under Different Parent Material of the Soils[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [28] 张庆忠, 陈欣, 沈善敏. 农田土壤硝酸盐积累与淋失研究进展[J]. 应用生态学报, 2002(2): 233-238.
- Zhang Qingzhong, Chen Xin, Shen Shanmin. Advances in studies on accumulation and leaching of nitrate in farming soil[J]. Journal of Applied Ecology, 2002(2): 233-238. (in Chinese)
- [29] 仓恒瑾, 许炼峰, 李志安, 等. 雷州半岛旱地红壤非点源氮、磷淋溶损失模拟研究[J]. 生态环境, 2005(5): 715-718.
- Cang Hengjin, Xu Lianfeng, Li Zhi'an, et al. The leaching of non-point source N and P from latosol in dry land of Leizhou Peninsula[J]. Ecology and Environment, 2005(5): 715-718. (in Chinese)

(上接第 26 页)

- [9] Olivier H, Laurent D, Frédéric B, et al. Postresuscitation syndrome: potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage[J]. Critical Care Medicine, 2011, 39(7): 1712-1720.
- [10] Olorunfemi DI, Taiwo MO, Olorunfemi OP. Assessment of DNA damage in onion root cells exposed to contaminated rural water sources using RAPD markers[J]. Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii, 2015, 25(1): 27-34.
- [11] Zhou L, Li J, Lin X, et al. Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora) [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3): 225-232.
- [12] Manikandan R, Venkatachalam P. Risk assessment of mercury ion heavy metal exposure on physiological and biochemical changes and DNA damage using RAPD analysis in *Mentha arvensis* seedlings[J]. Plant Cell Biotechnol Mol Biol, 2011(12): 41-50.
- [13] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalisation, strategies and considerations[J]. Genes & Immunity, 2005, 6(4): 279-284.
- [14] Villar J, Edelson JD, Post M, et al. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury[J]. American Review of Respiratory Disease, 1993, 147(1): 177-181.