

磷酸盐和低分子量有机酸盐对红壤胶体和矿物吸附 DNA 的影响*

朱俊 蔡鹏[†] 黄巧云 荣兴民 梁巍

(华中农业大学农业部亚热带农业资源与环境重点开放实验室, 武汉 430070)

EFFECTS OF PHOSPHATE AND LOW-MOLECULAR-WEIGHT ORGANIC LIGANDS ON DNA ADSORPTION BY RED SOIL COLLOIDS AND MINERALS

Zhu Jun Cai Peng[†] Huang Qiaoyun Rong Xingmin Liang Wei

(Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 DNA; 土壤胶体; 矿物; 配体; 吸附
中图分类号 S153 文献标识码 A

DNA 是所有生物的遗传物质基础。在土壤生态系统中,动植物和微生物主动分泌或细胞死亡裂解释放的 DNA 分子可迅速被土壤黏粒吸附固定,从而对核酸酶降解产生抗性而在土壤中持久存在,并能被某些合适的宿主细胞所接受^[1]。土壤胶体固定的 DNA 被称作是“环境中的隐性基因”,对微生物的生态、生物多样性及遗传进化有着重要的影响^[2~4]。

低分子量有机酸 (Low-Molecular-Weight Organic Acid, LMWOA) 是土壤中普遍存在的一类有机化合物,主要来源于植物根系的分泌以及有机物质残体的分解,特别是在土壤根际, LMWOA 浓度可达到 10~20 mmol L⁻¹^[5]。土壤中养分(磷酸盐、硫酸盐)和 LMWOA 被土壤胶体和矿物吸附后可导致土壤组分的表面性质发生改变,从而影响营养元素的有效性、污染物的迁移和毒性以及土壤中酶的存在状态和生物活性^[6~8]。然而,土壤中富含的各种有机无机阴离子对 DNA 在土壤活性颗粒表面吸附的影响还鲜有报道。本研究以我国亚热带地区典型土壤—红壤为材料,研究了磷酸根、酒石酸根和柠檬酸根等无机、有机配体对 DNA 在土壤胶体和代表性矿物表面吸附的影响,为阐明 DNA 在土壤环境中的存在状态、最终归宿及其生态环境效应提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 DNA

鲑鱼精双链 DNA,购自美国 Sigma 公司。

1.2 土壤胶体和矿物

供试红壤采自湖北咸宁,采样深度为 11~40 cm。高岭石为化学纯试剂,购自上海五四化学试剂公司。小于 2 μm 的土壤胶体和矿物参照 Cai 等^[9]的方法分离提取。针铁矿按 Atkinson 等^[10]的方法合成。含有机质、去有机质红壤胶体的有机质含量分别为 28.4、7.1 g kg⁻¹,比表面积分别为 48.5、52.7 m² g⁻¹,阳离子交换量分别为 21.2、17.5 cmol kg⁻¹,电荷零点分别为 3.4、3.5,主要矿物组分为高岭石、1.4 nm 矿物和水云母;高岭石、针铁矿的比表面积分别为 22.9、101.6 m² g⁻¹,电荷零点分别为 3.6、8.3。供试土壤胶体和矿物的理化性质均参照 Cai 等^[9]的方法测定。

称取 0.500 g 土壤胶体或矿物于放有磁子的 50 ml 干燥锥形瓶中,用移液管加入去离子水 25 ml,置于磁力搅拌器上摇匀,制成土壤胶体或矿物悬液,浓度为 20 mg ml⁻¹。

* 国家自然科学基金项目(40271064)资助

[†] 通讯作者, E-mail: cp@mail.hzau.edu.cn

作者简介:朱俊(1982~),男,硕士研究生,研究方向为土壤环境生物化学。E-mail: junzh1002@sina.com

收稿日期:2007-01-16;收到修改稿日期:2007-04-28

1.3 供试配体体系中土壤胶体和矿物对 DNA 的吸附

依据本研究的吸附平衡预备试验结果,于一系列 10 ml 的贝克曼离心管中,分别加入 1 ml 浓度为 0.2 mg ml^{-1} 、pH 5.5 的 DNA 溶液,再加入 1 ml pH 5.5 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($0 \sim 500 \text{ mmol L}^{-1}$) 或酒石酸钾钠-酒石酸、柠檬酸三钠-柠檬酸 ($0 \sim 200 \text{ mmol L}^{-1}$) 缓冲液,然后在磁力搅拌下加入土壤胶体或矿物悬液 $500 \mu\text{l}$,设置三个平行,于 25 、 250 r min^{-1} 下振荡 2 h, $18\,000 \text{ r min}^{-1}$ 离心 20 min。上清液用紫外分光光度计在 260 nm 波长下比色测定, DNA 的加入量减去上清液中的残留量,即为 DNA 在土壤胶体或矿物表面的吸附量。

为探讨 DNA 和配体加入顺序对 DNA 吸附的影响,根据上述试验结果,还设计并进行了以下实验:(1) DNA 先于配体加入实验:于一系列离心管中,分别加入 1 ml 浓度为 0.2 mg ml^{-1} 、pH 5.5 的 DNA 溶液,在磁力搅拌下再加入土壤胶体或矿物悬液 $500 \mu\text{l}$, 25 、 250 r min^{-1} 下振荡 1 h,然后分别加入系列浓度配体溶液 1 ml,继续振荡 1 h, $18\,000 \text{ r min}^{-1}$ 离心 20 min。DNA 吸附量的计算同上;(2) 配体先于 DNA 加入实验:配体和 DNA 的加入顺序交换,其余步骤与 (1) 相同。

2 结果与讨论

2.1 配体浓度变化对 DNA 在红壤胶体和矿物表面吸附的影响

由图 1 可见,供试的有机、无机配体对 DNA 在红壤胶体和矿物表面的吸附均能产生显著的影响,磷酸盐和柠檬酸配体在较低浓度 ($0 \sim 10$ 和 $0 \sim 20 \text{ mmol L}^{-1}$) 时可抑制 DNA 在红壤胶体表面的吸附,但抑制效应经历了一个由弱转强,再由强转弱的过程,随着配体浓度的进一步升高 ($10 \sim 200$ 和 $20 \sim 80 \text{ mmol L}^{-1}$),对 DNA 吸附的抑制逐渐转变为促进效应;在高岭石表面,磷酸盐和柠檬酸配体在整个供试浓度范围内均促进 DNA 的吸附并且在低浓度 ($0 \sim 50$ 和 $0 \sim 20 \text{ mmol L}^{-1}$) 时促进效率变化较快,与之相反,在针铁矿表面,低浓度的磷酸盐 ($0 \sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$) 和柠檬酸配体 ($0 \sim 20 \text{ mmol L}^{-1}$) 均急剧抑制 DNA 的吸附;酒石酸配体在供试土壤胶体和矿物表面对 DNA 的吸附均起持续的促进作用,但在针铁矿表面的促进效率最低。这些结果表明,阴离子配体在低浓度时对 DNA 在红壤胶体表面吸附的抑制作用可能与其所含的铁氧化物有关,而高浓度时的促进作用可能主要是由于富含高岭石矿物。

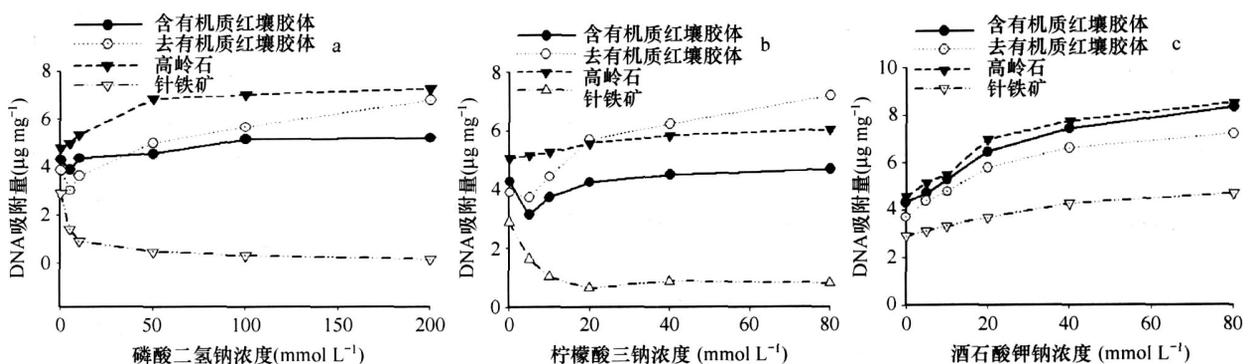


图 1 不同浓度的阴离子配体体系中 DNA 在土壤胶体和矿物表面的吸附

磷酸根和柠檬酸配体在较低浓度时对 DNA 在红壤胶体表面的吸附均起抑制作用,这可能主要是配体和 DNA 对吸附点位的直接竞争结果。DNA 分子两端的磷酸基和其核糖上的羟基以及供试的阴离子配体均可与土壤活性颗粒表面的羟基发生配位交换形成内圈络合物^[9,11],有研究表明,低浓度的磷酸根在矿物表面形成难于解吸的双核络合物,高浓度时则形成易于解吸的单核络合物^[12],说明较低浓度

时的阴离子对 DNA 分子显示出更强的吸附竞争力。此外, DNA 分子和阴离子配体均还可以通过疏水作用、静电引力以及氢键等吸附在土壤胶体表面^[9,13],所以,阴离子配体可以竞争土壤胶体表面某些与 DNA 分子通用的吸附点位,抑制 DNA 的吸附。

在高岭石体系中,磷酸根、酒石酸根和柠檬酸根均可以促进 DNA 在矿物表面的吸附,可能是由于阴离子与 DNA 分子以及矿物表面的金属离子之间形

成了三元络合物, DNA 除了占据其正常的吸附点位外, 还可通过阴离子的桥接作用被高岭石表面吸附。在红壤胶体体系中, 酒石酸根和较高浓度的磷酸根、柠檬酸根均可促进 DNA 的吸附, 可能也与阴离子的桥接作用有关。在磷酸根和柠檬酸根体系中, 去有机质红壤胶体对 DNA 的吸附量高于含有机质胶体, 可能是因为红壤胶体经过 H_2O_2 处理后, 其富含的矿物如高岭石被暴露出来, 去有机质红壤胶体表面形成了较多的三元络合位点, 在酒石酸根体系中, 去有机质胶体表面的三元络合位点也可能高于含有机质胶体表面, 但 DNA 与酒石酸根在去有机质胶体表面形成的三元络合物的稳定性可能低于含有机质表面, 两方面的综合效应使含有机质红壤胶体对 DNA 的吸附量高于去有机质红壤胶体。

在针铁矿表面, 磷酸根和柠檬酸配体对 DNA 的吸附起抑制作用, 而酒石酸配体起促进作用, 这可能是阴离子桥接作用和竞争作用共同作用的结果, 酒石酸配体形成的三元络合物较磷酸和柠檬酸配体形成的可能更稳定, 而磷酸和柠檬酸配体可能主要通过专性吸附与 DNA 竞争活性点位。

2.2 配体种类对土壤胶体和矿物吸附 DNA 的影响

为探讨不同种类配体的影响差异, 按下式计算了配体对 DNA 在土壤胶体和矿物表面吸附的影响效率: $D = (A_x - A_0) \times 100 / A_0$, A_0 为不加配体时 DNA 的吸附量, A_x 为某一配体浓度时 DNA 的吸附量, D 为配体对 DNA 吸附的促进 (+) 或抑制 (-) 效率。

酒石酸配体对 DNA 在高岭石和红壤胶体表面的促进效率较磷酸盐和柠檬酸配体均要强, 并且磷酸根 ($5 \sim 200 \text{ mmol L}^{-1}$)、酒石酸 ($5 \sim 80 \text{ mmol L}^{-1}$) 配体和柠檬酸 ($5 \sim 80 \text{ mmol L}^{-1}$) 配体在高岭石表面促进效率的大小顺序为: 酒石酸配体 (13% ~ 87%) > 磷酸盐 (4% ~ 51%) > 柠檬酸配体 (2% ~ 19%)。酒石酸配体和磷酸根对 DNA 吸附的促进效率的大小差别与两种配体对矿物络合能力的强弱相一致; 柠檬酸配体的促进效率低于酒石酸配体, 可能与配体的水解性和分子结构等因素有关, 供试的柠檬酸和酒石酸配体分别为柠檬酸三级解离和酒石酸二级解离状态的阴离子, 对应级别的酸的解离常数 pK_a 为柠檬酸 ($pK_3 = 6.36$) > 酒石酸 ($pK_2 = 4.34$)^[14], pK_a 越大, 对应酸的解离越弱, 配体的水解常数越大, 水解作用越强, 配体的有效性相对越低; 同时, 相对于

酒石酸配体来说, 柠檬酸配体具有更大的分子量和更多的官能团, 使其表面覆盖度、立体位阻和静电干扰作用均大于酒石酸配体^[5], 通过竞争作用对 DNA 吸附的抑制效应较强, 促进效应也就相对较弱。

磷酸根 ($5 \sim 200 \text{ mmol L}^{-1}$) 与柠檬酸 ($5 \sim 80 \text{ mmol L}^{-1}$) 配体对 DNA 在针铁矿表面吸附的抑制效率分别为 51% ~ 94% 与 43% ~ 72%, 配体磷酸根的抑制效率强于柠檬酸的。这一方面可能是因为磷酸根对针铁矿的亲合力高于柠檬酸配体^[15], 另一方面可能与磷酸根和 DNA 分子的通用吸附点位多于柠檬酸配体有关^[9]。

2.3 配体和 DNA 的加入顺序对 DNA 在土壤胶体和矿物表面吸附的影响

配体和 DNA 的加入顺序对 DNA 吸附的影响随着土壤胶体和矿物种类的不同而不同 (图 2)。在含有机质红壤胶体和针铁矿表面, DNA 先于磷酸盐和柠檬酸配体加入时具有最高的吸附量, 意味着配体主要通过竞争作用影响 DNA 的吸附, 当配体先于 DNA 加入时, DNA 很难把配体交换下来, 吸附量相对较低, 当 DNA 先于配体进入时, 可以优先占据有利的吸附点位, 吸附量相对较大; 而在去有机质红壤胶体和高岭石表面, 供试三种配体先于 DNA 加入时的吸附量最高, 表明配体进入体系后对 DNA 吸附的阴离子桥接作用可能强于竞争作用, 当 DNA 先进入体系时, 势必减少配体的吸附, 影响其桥接, 进而减少 DNA 的吸附总量。

3 结 论

磷酸盐和柠檬酸配体在较低浓度时抑制 DNA 在红壤胶体表面的吸附, 在较高浓度时促进 DNA 的吸附; 磷酸盐和柠檬酸配体还抑制针铁矿对 DNA 的吸附和促进 DNA 在高岭石表面的吸附, 并且磷酸盐在针铁矿表面的抑制效率和在高岭石表面的促进效率均大于柠檬酸配体; 酒石酸配体对 DNA 在供试土壤胶体和矿物表面的吸附均起持续的促进作用, 而且促进效率较磷酸盐和柠檬酸配体高。DNA 先于配体特别是磷酸盐和柠檬酸配体加入含有机质红壤胶体和针铁矿体系时, 吸附量大于 DNA 后于配体或与配体同时加入体系的处理; 在去有机质红壤胶体和高岭石体系中, 配体先于 DNA 加入时具有最大的吸附量。

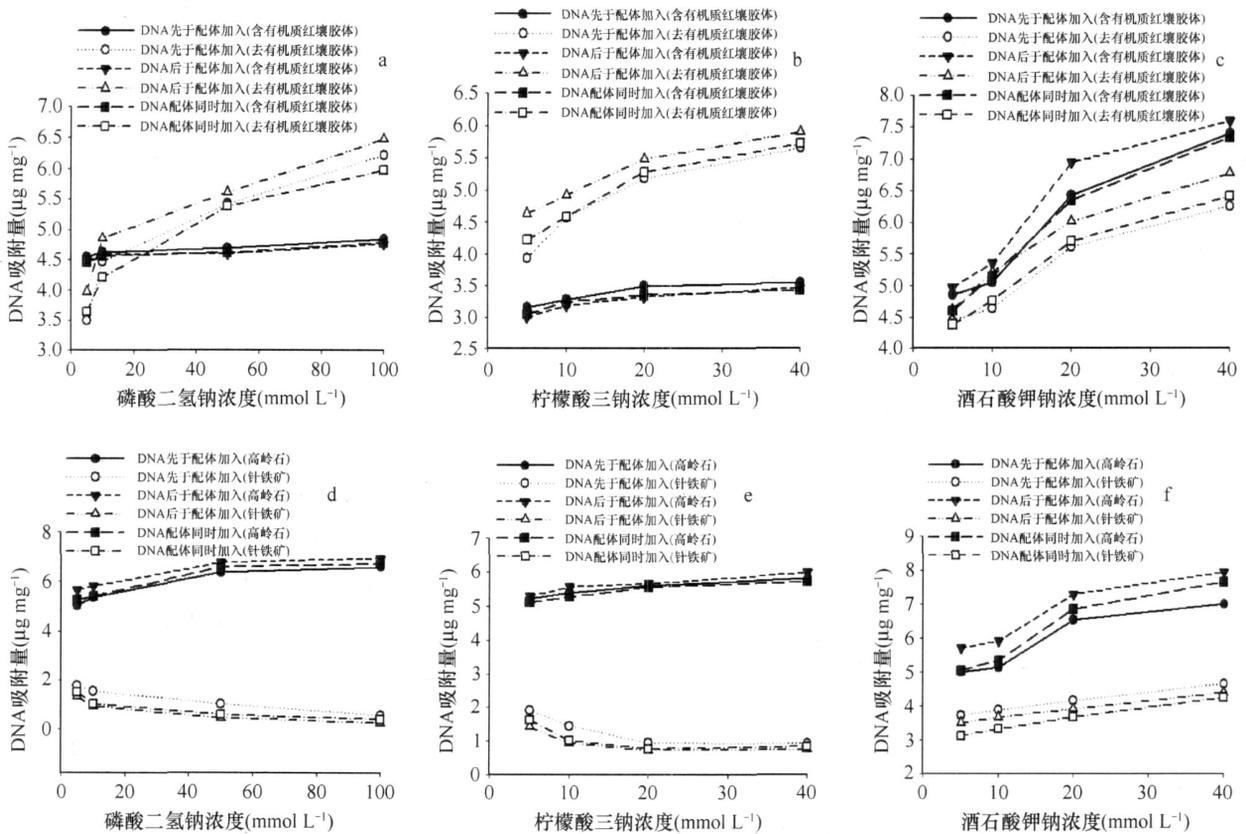


图2 配体和 DNA 的不同加入顺序下 DNA 在土壤胶体和矿物表面的吸附

参考文献

- [1] Ogram A, Saylor G S, Gustin D, *et al.* DNA adsorption to soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 1988, 22: 982 ~ 984
- [2] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.*, 2000, 29: 691 ~ 705
- [3] Cai P, Huang Q Y, Zhang X W. Interactions of DNA with clay minerals and soil colloidal particles and protection against degradation by DNase. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40: 2 971 ~ 2 976
- [4] Cai P, Huang Q Y, Zhang X W, *et al.* Binding and transformation of extracellular DNA in soil. *Pedosphere*, 2005, 15: 16 ~ 23
- [5] Huang Q Y, Zhao Z H, Chen W L. Effects of several low-molecular weight organic acids and phosphate on the adsorption of acid phosphatase by soil colloids and minerals. *Chemosphere*, 2003, 52: 571 ~ 579
- [6] 张敬锁, 李花粉, 衣纯真, 等. 有机酸对活化土壤中镉和小麦吸收镉的影响. *土壤学报*, 1999, 36(1): 61 ~ 66
- [7] 赵振华, 黄巧云, 李学垣, 等. 低分子量有机酸对胶体矿物吸附酸性磷酸酶和牛血清白蛋白的影响 I. 乙酸的影响. *土壤学报*, 2003, 40(2): 224 ~ 231
- [8] Hocking P J. Organic acids exuded from roots in phosphorus uptake and aluminum tolerance of plants in acid soils. *Adv. Agron.*, 2001, 74: 63 ~ 97
- [9] Cai P, Huang Q Y, Zhang X W, *et al.* Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biol. Biochem.*, 2006, 38: 471 ~ 476
- [10] Atkinson R J, Posner A M, Quirk J P. Adsorption of potential determining ions at the ferric oxide aqueous electrolyte interface. *J. Phys. Chem.*, 1967, 71: 550 ~ 558
- [11] Nilsson N, Persson P, Lovgren L, *et al.* Competitive surface complexation of phthalate and phosphate on goethite (-FeOOH) particles. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 1996, 60: 4 385 ~ 4 395
- [12] 刘凡, 贺纪正, 李学垣, 等. 磷溶液浓度与针铁矿表面吸附磷的化学状态. *科学通报*, 1994, 39: 1 996 ~ 1 999
- [13] Ali M A, Dzombak D A. Competitive sorption of simple organic acids and sulfate on Goethite. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30: 1 061 ~ 1 070
- [14] Weast R C. *Handbook of Chemistry and Physics*. 7th Ed. London: MacMillan, 1989, 1 989 ~ 1 990
- [15] Parfitt R L, Farmer V C. Adsorption on hydrous oxides I. Oxalate, benzoate on goethite. *J. Soil Sci.*, 1977, 28: 40 ~ 47