

利用微生物检测环境有机化合物的致突变性

竺迺恺 杜秀英 夏晔娟

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

徐凤丹 范美云 宋瑞霞 张秀岭

(中国预防医学科学院环境卫生监测所, 北京, 100021)

周世伟 齐 顺

(中国预防医学科学院环境卫生与卫生工程研究所, 北京, 100050)

刘征涛 马文漪 于红霞 王连生

(南京大学环境科学与工程系, 南京, 210008)

摘 要

运用微生物检测致突变性的方法有很多种, 一般都是简便, 快速, 灵敏, 并且样品用量较少, 非常适合检测环境有机化合物的致突变性或潜在致癌性, 如果同时用几种方法, 则更有说服力. 本文介绍了 Ames 试验、微量向前突变法和 SOS 显色试验, 以及它们的应用实例.

关键词: 致突变性实验, 有机化合物, 微生物.

随着经济的发展, 大量的化学物质进入环境, 新的化学物质也不断产生, 它们的致癌性倍受公众的关注, 但确认一个人类致癌物需花费大量资金和很长时间, 因而促使人们寻求经济、快速、简便又相对有效的潜在致癌物筛选体系. 研究证实, 化学物质的致癌性与其致突变性密切相关, 无论高级或是低级生物, 其作为遗传物质基础的 DNA 都是极相似的, 因此可以将致突变性检测的实验系统用于化学物质潜在致癌性的筛选.

1. 原理

某些特别培育的微生物在接触遗传毒物后, 其遗传信息内容发生改变, 并传给后代, 通过测定酶型的改变等可证明该化学物质能造成回复突变、向前突变或引发损伤修复反应等遗传物质受损的现象, 即为潜在致癌物. 例如: Ames 试验即是利用组氨酸缺陷型的菌株 his^- , 在致突变剂作用下会回复到野生型 his^+ , 在不含组氨酸的培养基上长出菌落, 且回变率与致突变作用的强度相关^[1]; 微量向前突变方法 (MFM) 是利用 TM677 等菌株, 在致突变剂的作用下能产生突变, 长出抗 8-氮杂鸟嘌呤的菌落, 其诱变率与致突变强度

* 国家自然科学基金资助项目.

成正相关^[2]。以上都是检查某个特定基因位点的突变,而 SOS 显色试验,则是检查对基因链的损伤,大肠菌染色体受到损伤,会引发 SOS 体系,它与控制酶活性及损伤修复等的基因有关,通过酶活性的改变,即可推测该化学物质引发 SOS 体系或造成基因损伤的程度^[3]。目前检测遗传毒性的方法有很多,各有优缺点,应该取长补短,综合利用;同时从遗传毒性检测实验中获得的资料要外推到人还有很多工作要做,必须慎重对待。

2. 仪器和试剂

2.1 仪器

无菌室,超净工作台,恒温培养箱,恒温水浴,恒温振荡器,高压灭菌锅,干燥箱, -80℃低温冰箱,显微镜,超速冷冻离心机,培养皿(9cm),试管,96孔微孔培养板,10ml 和 0.5ml 小瓶,酶联仪,分光光度计,匀浆器,解剖器材及其他玻璃仪器等。

2.2 试验菌株

Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA97, TA102; TM677; E. Coli PQ 35, PQ 37.

2.3 Ames 试验用试剂

(1) 营养肉汤:牛肉膏 0.5g,蛋白胨 1.0g, NaCl 0.5g,加蒸馏水至 100ml, pH 7.2 - 7.5,营养琼脂则再加 1.6g 琼脂;(2) 底层培养基:葡萄糖 20g,琼脂 16g 加蒸馏水 950ml,灭菌后加 50ml 盐液;(3) 盐液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g,柠檬酸 10g, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 17.5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50g 加蒸馏水 250ml;(4) 组氨酸、生物素: L-Histidine · HCl 9.6mg, Biotin 12.2mg 加蒸馏水 100ml;(5) Co. II, G-6-P: 辅酶 II (Co. II) 229.8mg, 6-磷酸葡萄糖 (G-6-P) 105.75mg,加无菌水 3ml;(6) 0.2mol/l 磷酸缓冲液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.56g 配成 50ml A 液, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16g 配成 100ml B 液,于 100ml B 液中加入 13.6ml A 液;(7) 钾、镁溶液: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.035g, KCl 3.075g 溶于 25ml 蒸馏水;(8) 0.15 mol/l KCl: KCl 1.118g 溶于 100ml 蒸馏水;(9) S-9 Mix: 0.2mol/l 缓冲液 5ml,无菌水 3.4ml,钾、镁溶液 0.4ml, Co II, G-6-P 0.4ml, S-9 1.0ml 混匀。

2.4 微量向前突变法用试剂

(1) M. E. 培养液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g,葡萄糖 20g,柠檬酸 2.0g, K_2HPO_4 10g, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.5g, Biotin 12.2mg 溶于 1000ml 蒸馏水, pH 7.0; M. E. 培养基是在 1000ml M. E. 培养液中加入 15g 琼脂;(2) 0.2mol/l PBS: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g 溶于 1000ml 蒸馏水, pH 7.0; (3) 8-AG: 8-氮杂鸟嘌呤 (8-Azaguanine) 25mg 溶于 10ml DMSO 中;(4) 顶层: NaCl 0.5g,琼脂 0.4g 溶于 100ml 蒸馏水。

2.5 SOS 显色试验用试剂

(1) LB 培养液:蛋白胨 10g,酵母浸膏 5g, NaCl 10g 溶于 1000ml 蒸馏水中,每 50ml 分装;(2) Tris 缓冲液: Tris (HOCH_2)₃CNH₂ 12.1g,十二烷基硫酸钠(SDS)溶液: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ 0.1g 溶于 100ml 水, pH 8.0,每毫升再加 2mg (PNPP);(3) 磷酸缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.91g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.25g, KCl 0.075g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025g, SDS 0.1g 溶于 100ml 蒸馏水中后加 β -巯基乙醇 0.27ml,每毫升再加 2mg (ONPG)。

2.6 标准致突变剂

2-硝基苄 (2-NF), 2-氨基苄 (2-AF), 4-硝基喹啉氮氧化物 (4-NQO) 等;助溶剂为

水、二甲基亚砷 (DMSO)、丙酮、乙醇、二氯甲烷等。

2.7 大鼠肝微粒体酶的诱导及制备

选 200g 左右健康雄性大鼠,按 200mg/kg 体重腹腔注射 PCB (Aroclor 1254),五日后断头处死,取肝脏,经门静脉注入冷 KCl 溶液,剪碎后匀浆,经 9000 G 离心 10min,吸取上清液分装,速冻, -80℃ 保存,均为无菌低温操作。

3. 操作步骤及计算方法

3.1 Ames 试验的平板掺入法^[4]

在含受试物 (<0.1ml) 的试管中加入 2ml 融化的顶层,置于恒温水浴 (<45℃) 中,每管加入 0.1ml 过夜培养的菌液和 0.3ml S-9Mix (需代谢活化时),混匀后均匀地铺在底层平板上,37℃ 培养 48h,计回变菌落数,受试物平板的菌落数超过空白的二倍,并且回变数随剂量增加而增加时,则为致突变阳性。

3.2 MFM 法

取贮存菌液 0.8ml 加入 8ml 新鲜 M. E. 培养液中,37℃ 振荡培养 3h,取 1ml 加 9ml M. E. 培养液稀释,取 10ml 稀释菌液加 2ml 样品,37℃ 振荡培养 2h,加入 90μl 0.2 mol/l PBS;混匀后各取混合液 20μl 和 50μl 8-AG 加入融化的 2.5ml 顶层中,均匀铺在 M. E. 平板上,每个剂量三个重复,37℃ 培养 44h,记录突变菌落数;另取 20μl 混合液,用 PBS 两次 10 倍稀释,稀释后各取 20μl 加到 2.5ml 顶层中,均匀铺在 M. E. 平板上,每个剂量同样三个重复,37℃ 培养 44h,记录存活菌数。计算诱变率 = 抵抗 8-AG 菌落数 / 10⁴ 存活菌数,超过空白对照的两倍为阳性。

3.3 SOS 显色试验^[5]

A, B 两块 96 孔微孔板的第一行加入 20μl 不同样品,第二行往后各加 20μl 溶剂,第二行加相应的 20μl 样品混合后,取 20μl 移入同列的下一行,至倒数第二行,使每列为不同浓度的样品,最后一行为空白。每个样品重复 2—3 列,50ml LB 培养液中加 1ml 安培西林 (1mg/ml),再加 200μl 冰冻贮存的 PQ37 菌液,37℃ 旋转振动培养 16h,取 1ml 菌液加入新鲜的 50ml LB 培养液中,再培养 2h,在 A, B 两板的各孔中加 100μl 调整好的菌液,再培养 2h, A 板加上 100μl Trip 缓冲液, B 板加 100μl 磷酸缓冲液,立即用酶联仪测 OD₄₀₅ 值,为 T₀ 然后再培养, A 板 20min 后测 OD 值为 T₂₀ 与 T₀ 相比,相差不大则无细胞毒性,若相差大,则计算修正因子 C. F. = 空白 OD / 样品 OD; B 板 60min 后测 OD 为 T₆₀ 值, B 板各孔 OD_b = (OD₆₀ - OD₀) × C. F., 最后计算诱导率 SOSIP = 10 × (OD_{b2} - OD_{b1}) / (C₂ - C₁)。

4. 实例介绍

(1) 用 Ames 试验研究 2-硝基芘的直接致突变性:发现其他硝基多环芳烃共存时显示协同作用,其他多环芳烃共存时显示拮抗作用,且与多环芳烃的环数有关。

(2) 用 Ames 试验检测大气飘尘的致突变性:将大流量采样器上的玻璃纤维滤膜的一半剪成小块,放入具塞三角瓶中,加乙醇/苯 = 1/3 (V/V) 浸泡,超声抽提 20min,过滤,然后减压浓缩至干为提取物样品,然后用 DMSO 溶解去作 Ames 试验,从致突变性结果可反映大气污染的程度和可能的主要污染源,城区飘尘的诱变性高于郊区,北京主要是燃煤污染,而东京以汽车污染为主^[6]。

(3) 饮水中有机物致突变性的测定: 因饮用水中的有机组分含量甚微, 必须进行富集和浓缩, 并扣除干扰。水样先经硫代硫酸钠溶液去氯, 调整 pH 至 2, 过 XAD-2 和 XAD-8 两段树脂柱, 然后用醋酸乙酯洗脱, 无水硫酸钠去水分, 减压蒸馏浓缩, 氮气吹干, 恒重后溶于 DMSO 中, 配成不同浓度进行 Ames 试验, 最后计算浓集物比活性 (Rev/mg), 即每毫克水样浓集物引起的回变菌落数; 水样比活性 (Rev/L), 即每升水样所造成的回变菌落数^[7]。用以比较不同水样的致突变性强弱, 并研究了温度、加氯量及氯化时间等对水中腐植质氧化产物的致突变性的影响。

(4) 用 Ames 试验测定了多种氯代芳烃类化合物的致突变性, 先用梯度平皿划线法进行大范围浓度的初筛^[8], 然后再有目的地做平板掺入法定量测定, 可以节省时间和费用。

(5) 某河流沉积物水浸液的致突变性测定, 经 SOS 显色试验测定, 未发现细胞毒性及基因毒性^[9]。

5. 注意事项

(1) 特别要保证菌种的纯度, 如 *Salmonella typhimurium* TA 系列, 就要检查其对组氨酸的需求、自然回变数、脂多糖屏障的缺陷、对氨基青霉素的抗性、对紫外线的敏感性等等, 是否符合要求; 菌种 -80℃ 保存。

(2) 除做空白对照外, 必须做溶剂对照, 溶剂不能达抑菌浓度, 更不能有诱变性; 还必须做阳性对照, 最好是选择与待测物类似的已知诱变剂。

(3) 样品前处理一方面去除干扰因素, 另一方面又不能丢失或破坏样品中的诱变剂成分, 并使样品尽量浓缩。

(4) 各种方法都要严格操作, 保证重现性, 不同方法对不同类化合物的敏感性有差异, 最好是用几种方法检测, 则更能说明问题。

参 考 文 献

- [1] Ames B N, McCann J, Yamasaki E, 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-Micosome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 31: 347—364
- [2] Lewtas J, Goto S, Williams K et al., 1987. The Mutagenicity of Indoor Air Particles in a Residential Pilot Field Study Application and Evaluation of New Methodologies. *Atmospheric Environment*, 21: 443—449
- [3] Little J W, Mount D W, 1982. The SOS Regulatory System of *Escherichia Coli*. *Cell*, 29: 11—22
- [4] Maron D M et al., 1983. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 113: 173—213
- [5] Philippe Quillardet, Maurice Hofnung, 1985. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins. *Procedures*, 147: 65—78
- [6] 竺迺恺, 松下秀鹤, 西村哲治等, 1990. 北京和东京大气飘尘诱变性的比较. 有毒有机物环境行为和生态毒理论文集. 中国科学技术出版社, 北京, p. 291—197
- [7] 徐凤丹等, 1985. 饮水中有机致突变组分的化学分离及其致突变性鉴定. 环境科学, 6 (2): 14—17
- [8] 徐冠群等, 1986. Ames 试验的方法学研究. 环境诱变剂检测丛刊, 5 (1): 44
- [9] Zhu Naikai, Wang Huaijin, Xia Xijuan et al., 1992. Study on Toxicity of Wastewater from Mining Activities on Some Biota. *J. of Environmental Sciences (China)*, 4 (3) D: 116—123

THE MUTAGENICITY DETECTION OF ORGANIC COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT USING MICROORGANISMS

Zhu Naikui Du Xuying Xia Xijuan

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Xu Fenglan Fan Meijun Song Ruixia Zhang Xueling

(Institute of Environmental Health Monitoring, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100021)

Zhou Shiwen Qi shun

(Institute of Environmental Health and Engineering, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050)

Liu Zhengtao Ma Wenyi Yu Hongxia Wang Liansheng

(Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing, 210008)

ABSTRACT

Many procedures are available to test mutagenicity using microorganisms. Generally these methods are simple, rapid, sensitive and using small samples. They are suitable to test mutagenicity and potential carcinogenicity of environmental mutagens. If will be more than one method used for the same sample the result will be more convincing. This paper introduced Ames test, Micro-Forward-Mutation (MFM) and SOS chrome test, and listed some examples.

Keywords: mutation test, organic compounds, microorganisms.