

应用蝌蚪快速检测环境变异的两种方法 ——微核试验和单细胞凝胶电泳

苑宇哲, 徐仕霞, 姚春生, 刘志君, 李旭东, 王跃招*

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要: 本文介绍了应用无尾两栖类动物的蝌蚪进行环境监测的两种方法——微核试验和单细胞凝胶电泳。此两种环境检测的方法与其他环境检测方法相比具有快速, 简便, 易操作, 适于检测现场应用, 可大面积推广等优点。

关键词: 蝌蚪; 生物检测; 微核试验; 单细胞凝胶电泳实验

中图分类号: X830 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2004) 01-0074-03

Review on Monitoring Environmental Contamination Using Micronucleus Test and Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay in Tadpole

YUAN Yu-zhe, XU Shi-xia, YAO Chun-sheng, LIU Zhi-jun, LI Xu-dong, WANG Yue-zhao
(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan Province, 610041)

Abstract: Two methods about monitoring environment pollution through genetic abnormality of tadpoles, micronucleus test and single cell gel electrophoresis (comet) assay, were reviewed, and the advantages and shortcomings of these two methods were discussed.

Key words: tadpole; biomonitoring; micronucleus test; single cell gel electrophoresis assay

随着工农业的发展, 人类对自然环境的破坏越来越严重, 自然环境的破坏反过来又引发了一系列生态、社会和经济问题。人们逐渐对环境质量的变化重视起来, 出现了基于各种生物标志物的环境检测技术。主要有以蛋白质和 DNA 为标志物的各种检测方法, 又可以根据指示生物分为应用微生物、低等动物、底栖动物等的检测方法。两栖动物蝌蚪皮肤渗透性强, 分布广, 数量多, 易于饲养和观察, 在水体环境检测中作为指示生物有很大的优势。因此近年来有关利用蝌蚪来监测水体环境的研究在国内外越来越引起重视。本文着重介绍两种可应用于蝌蚪的快速实用的检测方法——微核技术和单细胞凝胶电泳。

1 微核技术 (micronucleus test, MN 或 MCNT)

1975 年, Kligerman 等^[1]成功地以理化因素诱发荫鱼细胞染色体畸变以来, 以鱼类遗传学研究检测水环境中的污染物受到关注。在此基础上发展起来了应用动物分裂相细胞进行的微核试验技术。如鱼外周血微核试验监测水体

中的污染物, 小鼠骨髓细胞经口灌流给药检测待测化学物质的遗传毒性^[2], 以及蝶螈和两栖类的微核实验评价环境污染物的遗传毒性^[3,4]。

MN 是根据环境污染物能引起 DNA 损伤、诱发染色体畸变而在细胞核外形成微核的原理, 从而检测诱变物质对染色体损伤的一种简便易行的方法。其原理是由于外源物质的干扰, 染色体断裂, 在细胞分裂过程无着丝点的染色体断片, 无法正常进入到子细胞中, 在细胞核外可产生微小的核, 涂片染色后, 计算微核率, 检测染色体受伤害程度, 进而反映化学物的遗传毒性。根据微核技术的原理检测到微核的发生需要一个基础条件, 即必须要有分裂相细胞并且分裂较同步, 只有存在分裂相细胞才能根据细胞在分裂的过程中行为产生异常进行检测。除此基本条件外, 待测物质的浓度须设计在合理的范围之内, 不影响到细胞的分裂能力。耿德贵等^[5]用除草剂乙草胺长时间或高浓度处理时均会导致蝌蚪红细胞微核细胞率及核异常细胞率的下降, 提出可能是由于长时间处理会引起细胞因适应而增

收稿日期: 2003-11-04

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要项目: “KSCX2-S, W-102-02” 和中国科学院知识创新课题: “KSCX2-SW-101B” 资助 Supported by the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences

* 通讯作者 Corresponding author (E-mail: arcib@cib.ac.cn)

强修复损伤能力或大量的受损伤死亡,高浓度处理会抑制或终止细胞的分裂。检测结果中,诱发红细胞的微核率高,低取决于水体中的致突变物或细胞纺锤体抑制剂活性的强弱,还取决于细胞有丝分裂的旺盛程度和细胞分裂速度。

MN 根据染毒试验可分为体内试验 (*in vivo*) 和体外试验 (*in vitro*)。在体实验是活个体整体染毒之后,取血涂片检测;离体试验是取高分裂活性细胞体外培养,在染色涂片前,加污染物使细胞受毒,再进行检测。在体实验与自然环境中动物受毒方式较一致,且考虑到实际应用,多采用体内染毒试验。离体试验可作为实验室中对外源物的遗传毒性检测的一种方法。

有些学者认为把蝌蚪红细胞微核试验作为检测水中污染物是一种比其他动物理想的方法,一方面是由于蝌蚪的红细胞体积较大,经过染色后,在显微镜下细胞质和细胞核的结构极为清晰,易于对微核的观察,另一方面蝌蚪红细胞本身正处于旺盛增殖阶段,对水体中的污染物反应灵敏度高于鱼类^[6,7,8]。贺维顺^[6]等曾开展过鱼类细胞微核试验,但其灵敏度较低,无法检测水体中的低浓度的致癌物和致突变物。两栖动物的蝌蚪是变态前的幼体,处于高度分化发育阶段,对水体中的低浓度毒物反应灵敏度高。两栖类动物的蝌蚪红细胞微核检测法是业已证实的检测水环境中的致突变物或致癌物灵敏度高的方法之一^[9,10]。

陈建军等^[8]将青蛙黑斑蛙蝌蚪红细胞微核试验发展成监测水体污染物诱变活性的一种规范化、标准化的生物活体快速检测系统。提出青蛙蝌蚪红细胞分裂旺盛具有低而稳定的微核本底,对污水的诱变活性很敏感,是一种有效的指示生物。

2 DNA 断裂检测——单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE)

环境中多种因素包括物理的、化学的以及混合因素如老化、吸烟等,均可引起 DNA 单链断裂 (single strand break, SSB),虽然偶尔的 SSB 不会影响双链 DNA 分子的连续性,但却会影响 DNA 分子的遗传行为,近年来多采用单细胞凝胶电泳法检测 SSB。该法是 20 世纪 70 年代末提出的,由 Ryberg 和 Johanson 等^[11]最先提出单细胞损伤定量, Ostling 等^[12]应用中性微胶电泳技术使检出灵敏度得到了提高,之后 Singh^[13]又发现在碱性条件下结果更突出,将此方法进一步完善。由于该技术灵敏度可达 $1/10^7$ 个核苷酸,与其他方法相比具有一定的优势,其应用很快受到了重视^[14]。

单细胞凝胶电泳法 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE) 也叫彗星试验 (comet assay),是一种快速、敏感、简便、廉价的检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术。SCGE 在单个细胞水平上检测 DNA 损伤和修复。其基本原理是:在中性或碱性条件下,包埋在琼脂凝胶中的细胞裂解, DNA 解螺旋后进行电泳,如细胞未受损伤,则核

DNA 断片较少,片段较大,电泳时 DNA 因其分子质量大而停留在核基质中,经荧光染色后呈圆形的荧光团无拖尾现象;若细胞受损, DNA 断片较多,在碱性条件下 DNA 解螺旋变为单链,电泳时因 DNA 分子量小可以进入凝胶中,向阳极伸展,荧光显微镜下呈一个亮的头部和尾部,形似彗星,故又称彗星试验。细胞和 DNA 受损越严重,产生的断片越多并且片段越小,电泳时迁移的 DNA 量也就越大,迁移距离越长,荧光显微镜下可观察尾长增加、尾部荧光强度增强,通过测定迁移部份的光密度和迁移长度就可定量测定单个细胞的 DNA 损伤程度。

SCGE 本身是一种单纯的实验技术,国内对于 SCGE 实际操作上一些小的地方上有许多种改进,使该方法更容易应用。SCGE 操作步骤大体为:先制作一层固着凝胶,将打散的新鲜待测细胞与低熔点琼脂糖凝胶相混、滴加到载玻片上,形成第二层凝胶,盖上盖玻片,置于冰箱内待其凝固后将盖玻片取走,再滴加第三层凝胶。待其凝固后,在碱性条件下电泳,调节液面使电压维持在 25V, 265~270mA, 3℃, 20min。根据经验,取走盖玻片具有一定的难度,故试着使用 bind silane 使盖玻片硅化易于取走。还采用其他方法^[17],将凝胶滴在限制的范围之内,如在载玻片上设计凹槽,以回避使用盖玻片。经实验证实结果均较为可信,只是各种改进的操作之间结果可比性较低,需要规范化。但也可以采用其他方法解决,只要在各种试验操作中平衡时间和电泳时间上设计梯度以摸索出最适合于这种操作的条件,设计了合理的阴性对照,结果分析仍然具有可参考性。

SCGE 能对单个细胞 DNA 损伤进行研究,应用范围广泛,目前已用于检测过氧化、紫外线和电离辐射引起的损伤,以及三氯乙烷、丙烯腈胺等化学物及吸烟、老化所致损害的研究^[15]。Steven Ralph 等^[16]以笼养的蝌蚪为材料,应用碱性单细胞凝胶电泳技术建立了环境监测的平台,提供了水环境基因毒性检测的一个较敏感的系统。

3 讨论

目前,有多种环境检测方法,其主要分类方法有两种,根据指示生物和生物标志物进行分类。根据指示生物可以分为利用微生物诱发突变率,原生生物、水虱、藻类、贝类等的生长量进行环境监测,鱼类和两栖动物对水环境进行检测,利用哺乳动物的体内和体外实验进行外源化学物质的遗传毒理学的检测。另外,根据生物标志物可以分为依据行为、生理生化标志物等进行的检测,生化标志物检测方法又可具体细化为以染色体异常、DNA 断裂、DNA 加合物、蛋白质加合物、DNA 和蛋白质交连等为检测对象的检测方法。

其中以两栖动物蝌蚪为指示生物,以染色体异常和 DNA 断裂为生物标志物的微核试验和单细胞凝胶电泳实验,相对于其他生物监测方法具有简便易操作、无需复杂

的实验设备等优势,在水体污染检测中拥有很大的优势。以蝌蚪为指示生物在检测杀虫剂、化学物污染和环境辐射等方面已经得出了令人满意的试验效果^[19]。

以蝌蚪为实验动物做微核测定有其特有的优点:1. 蝌蚪数量多,便于观察和实验,费用低。2. 蝌蚪红细胞较大,细胞分裂旺盛,对污染物反应灵敏。3. 蝌蚪体表薄、完全与水体接触,没有保护性的隔离(如鱼的鳞片、昆虫的壳等)结构,皮肤的通透性好,对环境质量变异敏感。4. 蝌蚪体内具有转化前诱变剂或前致癌剂为具有活性成分的微粒体活性系统,这使蝌蚪不仅能用于检测水体中的直接致突变物,而且还能检测水体中的前致突变物^[24]。5. 蝌蚪微核试验不仅能检测水中单因子致突变效应,而且更适合检测污水中混合污染物的联合致突变效应,具有较高实用价值^[9]。

国外以蝌蚪为实验材料进行 SCGE 试验检测水体污染进行较早,也较规范,已经建立起了比较科学、实用、规范的检测体系。Steven 等(1998)运用这种体系检测了美国南部 10 个水体的污染程度,检测到的不同水体的污染程度具有可比性^[16]。目前,国内应用蝌蚪活体检测水体污染的工作开展得还不多^[20-23]。由于以蝌蚪为活体指示生物的 SCGE 技术体系在检测水体污染方面有很好的应用价值,可以预期其将会受到国内研究者的相应重视。

4 参考文献

- [1] Kligerman AD, Bloom SE and Howell WM. Umbralimi: A model for the study of chromosome aberrations in fishes [J]. Mutation Research, 1975, 31 (4): 225~234.
- [2] Przygoda RT, McKee RH, Amoruso MA, et al. Assessment of the utility of the micronucleus test for petroleum-derived materials [J]. Mutation Research, 1999, 438: 145~153.
- [3] Békaert C, Rast C, Ferrier V, et al. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil [J]. Organic Geochemistry, 1999, 30: 953~962.
- [4] Zoll-Moreux C and Ferrier V. The jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: two *in vivo* tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents [J]. Wat Res, 1999, 33 (10): 2301~2314.
- [5] 耿德贵,刘贤德,温洪宇,等. 除草剂乙草胺对蝌蚪红细胞微核及核异常的影响[J]. 环境与健康杂志, 2000, 17 (1): 36~38.
- [6] 贺维顺,王蕊芳. 污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响 [J]. 动物学研究, 1992, 13 (3): 275~279.
- [7] 王蕊芳,贺维顺,吴世芳,等. 昆明水源水和自来水水质致突变性及化学背景值 II. 蝌蚪红细胞微核和 CHO 细胞染色体畸变及 SCE 试验 [J]. 动物学研究, 1996, 17 (4): 469~475.
- [8] 陈军建,夏宜. 青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立 [J]. 水生生物学报, 1993, 17 (4): 298~308.
- [9] 贺维顺,王蕊芳. 蝌蚪 (*Bufo bufo andrewsi*) 血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究 [J]. 动物学研究, 1990, 11 (1): 1~6.
- [10] André Jaylet, Pierre Deparis, Vincent Ferrier, et al. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in freshwater pollution [J]. Mutat Res, 1986, 164: 245~257.
- [11] Hanawalt PC, Friedman EC, Fox CF, et al. DNA Repair Mechanisms [M]. New York, Academic Press, 1978: 465~468.
- [12] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123 (1): 291~298.
- [13] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 237 (3~4): 123~130.
- [14] 秦椿华,沈建英,黄仕和,等. DNA 断裂检测方法-单细胞凝胶电泳法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (6): 517~520.
- [15] 程淑群. 单细胞凝胶电泳技术在职业和环境医学生物监测中的应用 [J]. 工业卫生与职业病, 2001, 27 (2): 125~128.
- [16] Steven Ralph, Michael Petras. Caged amphibian tadpoles and *in situ* genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay [J]. Mutation Research, 1998, 413: 235~250.
- [17] 张建平,田源,陈道达. 单细胞凝胶电泳制胶方法的改进 [J]. 癌变·畸变·突变, 1998, 10 (3): 189~190.
- [18] Maria Fernandez, Jacques L' Haridon, Laury Gauthier, et al. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating *in vivo* genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations [J]. Initial Assessment. Mutation Research / Environment Mutagenesis and Related Subjects, 1993, 292 (1): 83~99.
- [19] Zofia Rudek, Maria Rożek. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC [J]. Mutation Research / Genetic Toxicology, 1992, 298 (1): 25~29. (下转第 80 页)

100 米, 在坡度为 6~20° 的西南向坡上的原始灌丛, 高 3~4 米, 盖度 25%~49%; 灌丛中生长着 3~5 米高、盖度为 0%~24% 的青川箭竹。因为大熊猫有季节性迁徙和撵笋的生活习性, 目前正是箭竹发笋的季节, 所以在这里发现大熊猫的实体应属正常。只可惜我们不能久候, 在给郑大爷

做了一些保护工作的宣传之后, 便离开了。

朋友, 您一定想见一见野外的大熊猫吧, 一定想来咱国宝的家园看一看吧。那么好吧, 我们欢迎您, 我们邀请您, 来吧, 到雪宝顶自然保护区来吧, 来科学考察, 来生态旅游, 来看看咱们的大熊猫!

(鄢蜀歧 四川省平武县自然保护区管理处)

(上接第 76 页)

- [20] 张朝晖, 陈锋, 吴端生, 等. 除草剂乐草隆对红鲫的遗传毒性研究[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10 (3): 185~187.
- [21] 封少龙, 罗屿, 钟远, 等. 应用单细胞凝胶电泳技术测定农药对蚯蚓的 DNA 损伤[J]. 南京大学学报(自然科学版), 2000, 36 (5): 649~652.
- [22] 余日安, 陈学敏. 应用单细胞凝胶电泳研究镉对大鼠

肝细胞 DNA 损伤的影响[J]. 环境与健康杂志, 2000, 17 (5): 271~273.

- [23] 钱宁, 李达圣, 甘世祥. 5-氮胞苷对贵州小型猪淋巴细胞 DNA 损伤及修复的影响[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10 (4): 223~226.

- [24] 贺维顺. 一种水质污染生物监测的新方法——蝌蚪肠细胞染色体畸变分析[J]. 环境科学学报, 1987, 7 (4): 467~471.

四川省动物学会第八次会员代表大会暨第九次学术年会 将于今年 7 月在南充召开

经理事会讨论, 决定四川省动物学会第八次会员代表大会暨第九次学术年会于 2004 年 7 月 15~18 日在四川省南充市西华师范大学召开。为了把会议办好, 理事会专门召开了会议, 成立会议筹备组、学术组。会议将特邀专家作学术报告, 开展学术交流。会议将进行理事会换届工作。理事会希望广大会员和动物学工作者踊跃撰稿参会。理事会还欢迎国内外专家与会交流。

这次会议是进入二十一世纪后学会召开的第一次会员代表大会和学术年会, 学会秘书处和西华师范大学已经开始进行筹备工作。会议收取注册费每人 300 元 (在读学生减半), 食宿会议统一安排, 费用自理。

学术交流征文内容: 区系分类与自然保护、实验动物、动物与驯化、教学、养殖、寄生虫学与媒介控制、科普等。请将征文全文 (或摘要) 及其软盘交学会秘书处陈跃英处。征文截止日期: 2004 年 4 月 30 日。

学会秘书处地址: 成都市人民南路四段 9 号中国科学院成都生物研究所 (610041) 联系人: 曾晓茂, 陈跃英, 李成 电话: 028-85223703, 85241980, 85233060 传真: 028-85222753 E-mail: licheng@cib.ac.cn

会议报到地点: 南充市西华师范大学珍稀动植物研究所 联系人: 周材权 电话: 0817-2314577, 2314364, 2155985