

凌发忠,徐忠东. 利用改良彗星实验检测废水对嗜热四膜虫 DNA 的损伤[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):298-300.

利用改良彗星实验检测废水对嗜热四膜虫 DNA 的损伤

凌发忠^{1,2}, 徐忠东²

(1. 安徽大学生命科学学院,安徽合肥 230601; 2. 合肥师范学院生命科学系,安徽合肥 230601)

摘要:采用自制模板铺胶进行嗜热四膜虫彗星实验,评估污水中遗传毒性物质的危害程度。结果表明,改良彗星实验可以提高效率和稳定性,不同稀释倍数的医药工业废水所引起的四膜虫细胞 DNA 损伤呈良好的剂量效应关系。

关键词:嗜热四膜虫;彗星实验;工业废水;DNA 损伤

中图分类号: X830 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0298-030

随着现代工业的迅速发展,人类接触的各种化学物质越来越多,其中很多是对人体细胞组织具有诱变和致癌作用的有毒物质,严重危害人类身体健康。四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)是一种单细胞原生动物,分布广泛,培养简单。由于四膜虫处于食物链底层,对环境中有毒物质敏感,因此它可以用来鉴别有毒物质,监测环境污染。彗星实验别称单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE),是由 Ostling 等^[1]首创的,经过不断改进,该技术已经比较成熟。由于彗星实验具有简便快速,需样品量少,可检测多种毒性物质和适用于任何细胞类型等优点,因此被广泛应用于水质监测^[2]。工业废水中含有大量复杂、未知、潜在的有毒物质。一般来说,一些成份已知的外源毒性物质常在高剂量时能被检测到。然而由于目前对遗传毒性物质的评估并没有最低剂量限制,使有些具有潜在遗传危害的物质以低水平影响人类健康^[3]。彗星实验敏感性很高,为检测工业废水的遗传物质提供了有效工具。国内学者在直接以污水灌溉土壤样品的研究中发现,污染土壤会引起蚯蚓体内 DNA 损伤^[4]。也有研究者运用彗星实验检测区域水源有机污染对人血淋巴细胞的致突变性,探讨水源风险的评价方法^[5]。虽然彗星实验已被进行多次改良^[6-7],但仍有许多问题尚待解决,如没有统一模型细胞,取材不方便;该方法较为繁琐,胶板制备不稳定,仪器要求较高;缺少统一参数,未建立 DNA 损伤等级与环境污染程度的定量关系,不能直接进行评价。本研究对彗星实验进行了改进,采用自制模板铺胶进行嗜热四膜虫彗星实验检测医药工业废水,旨在为快速、准确地评价工业废水对环境和人体健康的潜在危害提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

嗜热四膜虫由中国科学院水生生物研究所提供。将四膜虫接种到培养液(蛋白胨 15 g,酵母粉 5 g,葡萄糖 1 g,双蒸水

1 L,pH 值 7,分装,高压灭菌)中,30 ℃下培养 72 h。

工业废水取自某药厂。吸附废水,透明无味,主要成分为吡啶、有机胺、磷酸盐等;氯代废水,淡黄且有刺鼻气味,主要成分为二甲基甲酰胺、氯仿、乙醇、其他无机盐等。根据预试,将吸附废水分别稀释 400、600、800、1 000、1 200 倍,氯代废水分别稀释 100、200、400、600、800 倍,每个处理重复 3 次。

1.2 仪器与试剂

BX-41 型荧光显微镜(Olympus);Hema16 型离心沉淀机(珠海黑马医学仪器有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);DYCP-31D 型电泳槽(北京六一仪器厂)。低熔点琼脂糖(LMA, Promega 公司),十二烷基肌氨酸钠(sigma 公司),Triton X-100(sigma 公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 常规彗星实验 取四膜虫培养液 1 mL,分装于 4 支 1.5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,将沉淀重悬浮为原培养液体积的 1/10。 H_2O_2 染毒浓度分别为 50、200、500 $\mu\text{mol/L}$,在常温下染毒 0.5 h,同时加双蒸水为阴性对照,每个浓度设 3 个重复。染毒 30 min 后铺胶,每个处理样品制备 2 片凝胶。在完全磨砂的载玻片上铺第 1 层质量分数为 1%的正常熔点琼脂糖(NMA)150 μL ,4 ℃,10 min;铺第 2 层质量分数为 0.8%的低熔点琼脂糖(LMA)和四膜虫细胞悬液的混合液(体积比为 1:1)80 μL ,4 ℃,10 min;铺第 3 层质量分数为 0.5%的低熔点琼脂糖 70 μL ,4 ℃,10 min。将制备凝胶放入冷的裂解液(2.5 mol/L NaCl、100 mmol/L Na_2EDTA 、10 mmol/L Tris、10 mg/mL 十二烷基肌氨酸钠、1% Triton X-100、10% DMSO、pH 值 10)中,4 ℃下裂解 1.5 h。然后放入蒸馏水中漂洗 3 次,每次 10 min,以洗去凝胶表面多余的碱和洗涤剂,再放入电泳槽中。将刚配置的电泳缓冲液(1 mmol/L Na_2EDTA 、300 mmol/L NaOH,pH 值 13)倒入电泳槽,约高过载玻片 0.25 cm,4 ℃静置 20 min,使双链 DNA 解螺旋。调节电泳液液面高度,于 15 V、180 mA 下电泳 20 min。电泳完毕后取出载玻片浸入 0.4 mol/L Tris 缓冲液(pH 值 7.5),中和 30 min。20 mg/L EB 染色 5 min,用双蒸水洗掉表面染料,24 h 内在荧光显微镜下观察、拍照、记录,每片计数 50 个细胞。

1.3.2 改良彗星实验 自制电泳槽制作方法:取普通载玻片,用玻璃刀切成 1 mm 宽的长条,在另一个载玻片上围成 1.5 cm×1.5 cm 的槽,再用玻璃胶黏合(图 1)。

收稿日期:2013-01-05

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090415208)。

作者简介:凌发忠(1983—),男,安徽合肥人,硕士研究生,研究方向为原生动物细胞分子生物学。E-mail:lingfazhong@126.com。

通信作者:徐忠东,硕士,教授,研究方向为原生动物细胞分子生物学。E-mail:xuzhongdong@hftc.edu.cn。

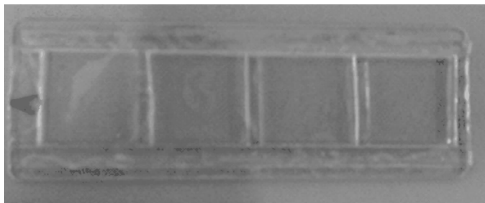


图1 自制电泳槽

在自制电泳槽上进行彗星实验,试验条件和过程同常规彗星实验。由于第 3 层胶的主要作用是减少第 2 层胶中细胞流失,因此也可省略,不影响试验结果。本研究将彗星实验简化为铺 2 层胶:铺第 1 层质量分数 1% 的正常熔点琼脂糖(NMA)100 μ L,4 $^{\circ}$ C,2 min;铺第 2 层质量分数 0.8% 的低熔点琼脂糖(LMA)和细胞悬液的混合液(体积比 1:1)50 μ L,4 $^{\circ}$ C,2 min。试验过程省去了反复揭取盖玻片,减少脱胶的发生率。低温凝胶时间仅需 2~3 min。1 个模板往往可以浇灌 3~4 块胶板,而毛玻璃只能铺 1~2 块胶板,效率提高数倍。较传统方法制得的胶板,改进方法每个胶板的大小和厚度一致,操作流程更加标准化。同时,由于自制电泳槽底部光滑,胶板在中和时可完全去除残留的电泳缓冲液,使染色后拍摄的彗星图更清晰,其他操作同上。

1.3.3 彗星观察及数据分析 用荧光显微镜观察(与溴化乙锭结合 DNA 发出荧光),以 CCD 拍照获取彗星图像,并用 CASP 软件分析获取的单个细胞彗星尾长(tail length,TL)、尾矩(tail moment,TM)、olive 尾矩(olive tail moment,OTM)等数据。采用 SPSS 18.0 软件分析试验数据。

1.3.4 改良彗星实验检测废水损伤 将等体积双蒸水设为阴性对照,于 26 $^{\circ}$ C 分别染毒 0.5 h,彗星实验操作同“1.3.2”。

2 结果与分析

2.1 改良彗星实验与常规彗星实验比较

由表 1、表 2 可知,在相同暴露时间和 H₂O₂ 浓度下,彗星实验引起的嗜热四膜虫 DNA 损伤在尾长、尾矩、olive 尾矩方面基本保持一致。由此可见,自制电泳槽可以取代磨砂载玻片的铺胶法。

表 1 常规彗星实验 H ₂ O ₂ 引起的嗜热四膜虫细胞 DNA 损伤				
样品	浓度 (μ mol/L)	尾长 (μ m)	尾矩 (μ m)	olive 尾矩 (μ m)
H ₂ O ₂	500	12.13 \pm 3.92 **	2.37 \pm 1.39 **	2.39 \pm 1.11 **
	200	11.00 \pm 3.18 *	1.78 \pm 1.10 *	2.09 \pm 0.87 *
	50	10.60 \pm 2.73	1.57 \pm 1.04	1.94 \pm 0.81
双蒸馏水	0	9.47 \pm 1.50	1.14 \pm 0.50	1.60 \pm 0.62

注: *、** 分别表示在 0.05、0.01 水平上显著。下同。

表 2 改良彗星实验 H ₂ O ₂ 引起的嗜热四膜虫细胞 DNA 损伤				
样品	浓度 (μ mol/L)	尾长 (μ m)	尾矩 (μ m)	olive 尾矩 (μ m)
H ₂ O ₂	500	12.04 \pm 2.90 **	2.34 \pm 1.06 **	2.29 \pm 1.11 **
	200	11.43 \pm 1.70 *	1.89 \pm 0.80 *	1.99 \pm 0.65 *
	50	10.04 \pm 1.68	1.39 \pm 0.61	1.72 \pm 0.64
双蒸馏水	0	9.78 \pm 1.20	1.31 \pm 0.57	1.57 \pm 0.52

2.2 改良彗星实验在工业废水检测中的应用

应用彗星实验可获得各处理四膜虫细胞的清晰彗星图像(图 2)。试验发现,经 5 个不同浓度废水染毒后,吸附污水稀释 400、600、800 倍时四膜虫尾长、尾矩、olive 尾矩都显著高于阴性对照,其中污水稀释 400、600 倍时与对照差异极显著($P < 0.01$);将污水稀释 800 倍后,尾长等数据与对照差异显著($P < 0.05$);而将污水稀释 1 000 倍后,各项数据与对照无显著差异,未观察到四膜虫细胞有显著 DNA 损伤(表 3)。在氯代废水中,分别稀释到 100、200、400 倍后各项数据与对照均出现极显著差异($P < 0.01$),表明这些污水仍含有较高浓度的遗传毒性物质。该污水被稀释 600 倍后污水危害程度有所下降,与对照差异显著($P < 0.05$),直到稀释约 800 倍后才未出现显著差异(表 4)。荧光显微镜下可见,四膜虫彗星尾长度随废水浓度的增加而增长,存在明显的剂量效应关系,嗜热四膜虫对废水表现出较高的敏感性。olive 尾矩是尾部 DNA 百分比与头尾中心间矩的乘积,属于矩类指标,它比矩类指标(如 TL)更灵敏、准确^[8]。本研究以 olive 尾矩作箱线图,分析各处理数据的分布情况。2 种废水的 olive 尾矩分布高度(包括第一、第四分位数、中位数和第三、第四分位数)表现出随污水浓度的增大而升高(图 3、图 4)。

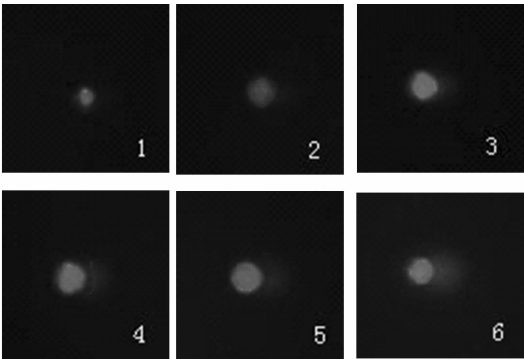


图2 不同样品中的典型单细胞凝胶电泳(400 \times)

表 3 吸附废水引起的嗜热四膜虫细胞 DNA 损伤				
样品	稀释倍数 (倍)	尾长 (μ m)	尾矩 (μ m)	olive 尾矩 (μ m)
吸附废水	400	13.49 \pm 2.82 **	3.22 \pm 1.97 **	2.80 \pm 1.26 **
	600	12.73 \pm 2.81 **	2.65 \pm 1.55 **	2.33 \pm 1.18 **
	800	10.56 \pm 2.55 *	1.94 \pm 1.06 *	1.82 \pm 1.00 *
	1 000	10.03 \pm 2.36	1.72 \pm 0.98	1.61 \pm 0.82
	1 200	9.85 \pm 2.16	1.32 \pm 0.85	1.44 \pm 0.66
双蒸馏水	0	9.47 \pm 2.11	1.17 \pm 0.81	1.34 \pm 0.61

表 4 氯代废水引起的嗜热四膜虫细胞 DNA 损伤				
样品	稀释倍数 (倍)	尾长 (μ m)	尾矩 (μ m)	olive 尾矩 (μ m)
氯代废水	100	14.67 \pm 2.41 **	4.05 \pm 1.55 **	3.51 \pm 1.18 **
	200	14.33 \pm 2.93 **	3.37 \pm 1.06 **	3.05 \pm 1.00 **
	400	13.24 \pm 2.39 **	2.57 \pm 0.98 **	2.59 \pm 0.85 **
	600	12.50 \pm 2.32 *	1.68 \pm 0.95 *	1.85 \pm 0.67 *
	800	10.96 \pm 2.27	1.44 \pm 0.69	1.59 \pm 0.60
双蒸馏水	0	9.91 \pm 2.02	1.37 \pm 0.66	1.50 \pm 0.59

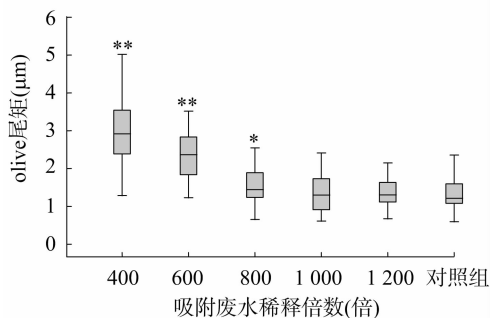


图3 不同稀释倍数吸附废水与olive尾矩值的关系

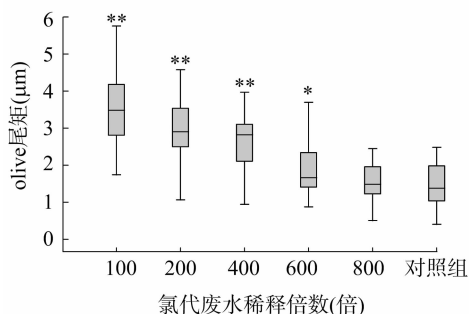


图4 不同稀释倍数氯代废水与olive尾矩值的关系

3 结论与讨论

本研究表明,彗星实验中利用自制电泳槽较传统制胶具有许多优势。在不影响试验准确性的前提下,省去盖玻片揭取或推移,可减少脱胶的发生率,提高试验效率。同时,铺制胶板大小一致,裂解、电泳、中和等操作条件相同,从而提高了各处理数据的可比性。在染色和观察过程中减少了杂质干扰,DNA 电泳图像清晰。

制药厂在生产过程中会产生不同废水。本研究使用吸附废水和氯代废水进行彗星实验,分析二者遗传毒性的大小。从废水颜色、气味等角度来看,由于氯代废水淡黄且有刺鼻气味,会产生毒性更大的判断,然而彗星实验发现吸附废水的遗传毒性大于氯代废水。氯代废水化学成分中二甲基甲酰胺是引起细胞 DNA 损伤的主要因素之一。姚艳霞等研究发现,1% 二甲基甲酰胺对涡虫 DNA 有一定损伤作用,说明污水中该化学物质是一种潜在有害毒性物质^[9]。吸附废水中有毒物质主要是吡啶、有机胺等,其中含氮杂环化合物吡啶具有较强的遗传毒性^[10]。同时,水体污染物一般浓度较低,成分复杂,如果以化学分析法评估遗传毒物的危害程度,往往费时费力,难以得到准确结果。目前,除了微生物测试系统(Ames 试验)和植物测试系统(紫母草花粉母细胞和蚕豆根尖细胞

微核试验)是研究工业废水遗传毒性的最常用方法外^[11],还可以用四膜虫彗星实验检测水体致突变/致癌物的污染。与传统检测法相比,彗星实验法既可用于活细胞或死细胞的 DNA 损伤分析,也可用于不同剂量外源物质的生物效应检测。国外研究者认为,彗星实验在检测水环境中低浓度遗传毒性物质的敏感度比微核试验更高^[12-13]。以四膜虫为生物材料,结合本研究的改良彗星实验方法,使彗星实验过程中样品预处理和流程更加简单。

参考文献:

- [1] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation - induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123(1): 291 - 298.
- [2] Sasaki Y F, Sekihashi K, Izumiyama F, et al. The Comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U. S. NTP carcinogenicity database [J]. Crit Rev Toxicol, 2000, 30(6): 629 - 799.
- [3] Fukushima S, Kakehashi A, Min W, et al. Existence of a threshold for genotoxic carcinogens: evidence from mechanism - based carcinogenicity studies [J]. Genes and Environment, 2009, 31(2): 33 - 36.
- [4] 陈颖, 王子健. 用彗星试验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤 [J]. 土壤学报, 2005, 42(4): 577 - 583.
- [5] 厉以强, 胡冠九, 李兆利, 等. 彗星试验检测区域水源有机污染致突变量 [J]. 生态毒理学报, 2010, 5(4): 563 - 568.
- [6] 张遵真, 衡正昌. 彗星试验的改良及其在工业废水监测中的应用 [J]. 中国环境科学, 2000, 20(4): 328 - 331.
- [7] 陈寅儿, 徐镇. 单细胞凝胶电泳实验流程和条件优化 [J]. 实验科学与技术, 2010, 8(3): 34 - 36.
- [8] Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay [J]. Mutat Res, 1995, 336(2): 123 - 131.
- [9] 姚艳霞, 李治, 孙燕, 等. N, N - 二甲基甲酰胺对东亚三角涡虫的毒性效应 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2011, 41(5): 833 - 837.
- [10] 徐忠东, 施荣华, 耿明, 等. 含氮杂环化合物对四膜虫的毒性作用研究 [J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(3): 57 - 62.
- [11] 张俊然, 朱惠刚, 蒋颂辉. 细胞转化试验研究源水及饮用水的潜在致癌性 [J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(2): 107 - 109.
- [12] Saleha Banu B, Danadevi K, Rahman M F, et al. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay [J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(4): 361 - 366.
- [13] Ennever F K, Andreano G, Rosenkranz H S. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity [J]. Mutat Res, 1988, 205(1/2/3/4): 99 - 105.