

SOS显色试验中细菌毒性效应的生物发光测定校正

张荣泉 叶于薇 董妙珠 阮于平¹

上海市防疫站 上海 200335 ¹上海卫生检疫所

摘要 本文探讨用生物发光法测试校正SOS显色试验中因细菌毒性效应而引起的遗传毒性的低估,并与标准试验的碱性磷酸酶活性指标校正进行了比较分析。结果表明,二者之间符合程度很好,提示在一定条件下,生物发光五以替代碱性磷酸酶指标校正。

关键词 SOS显色试验; 碱性磷酸酶; ATP-BL; 遗传毒性; 细胞毒性

CORRECTION FOR BACTERIOTOXIC EFFECTS IN SOS CHROMOTEST BY BIOLUMINESCENT DETERMINATION

Zhang Rongquan, et al.

Shanghai Hygiene and Anti-epidemic Centre Shanghai 200335

Abstract ATP-bioluminescence analysis was applied as bacteriotoxic effects correcting indicator in the estimation of genotoxicity in SOS chromotest. It appeared to be a simple and sensitive method to detect quantitatively the associated bacteriotoxicity of some genotoxins such as the chlorinated drinking water concentrates. The result was well agreeable to the conventional indicator obtained from alkaline phosphatase activity test

Key Words: SOS chromotest; alkaline phosphatase; ATP-bioluminescence; genotoxicity; bacteriotoxicity

不少遗传毒物只有在相当高的细胞毒性水平上才能检测到,所以在测试遗传毒性的SOS显色试验中,为了确定受试物对测试菌细胞毒性效应,需要对一系列递增剂量浓度培养混合液同时进行碱性磷酸酶活性(α P)测定,以此作为蛋白质合成指标校正 β -一半乳糖苷酶(β -g)诱导的低估。本实验试图用ATP生物发光(ATP-BL)法,以测定分析ATP相对含量变化作为细菌毒性效应指标校正 β -g,并与相应 α P指标校正相比较,探讨SOS显色试验中应用ATP-BL替代指标的

可

材料和方法

1. 材料

标准测试菌株PQ37(Institut Pasteur的Hofnung教授赠送);细菌ATP释放剂(自配);虫荧光素/荧光素酶试剂(ATP monitoring reagent, LKB); PNPP(BDH); 标准ATP(LKB); 发光仪(SHG-1型生物化学发光仪); 酶联仪(DG3022型)

2. 方法

活化测试菌株 PQ37 经氯化消毒饮用水浓缩液、按 0, 43.75, 87.5, 175, 350, 700ml 递增剂量诱导后, 以稍加修改后的 Marzin⁽²⁾ 酶活性动力学方法, 同时测定 β -g 和 α P 二酶活性, 并以相应的 ATP-BL^(3,4) 细菌培养混合液和 ATP 释放剂以 1:1 体积比混和振荡破碎后作为 ATP 抽提液。发光体系为 0.1mol/l Tris-ac 缓冲液 400 μ l, ATP 监测试剂 100 μ l, ATP 抽提液 10 μ l, 于发光仪中进行发光强度测量(以每秒脉冲数 CPS 表示), 并扣除相应非细菌内的 ATP-BL 发光强度。为消除体系内各种干扰因素的影响, 还以标准 ATP(S-ATP) 为内标监测校正每次样品测量的发光强度。因仅作各剂组间的相对比较, 故无需将发光强度折算成 ATP 绝对含量, 而可直接作用 CPS 进行数据分析。发光强度数据与对应的 α P 活性数据关系用相关回归分析处理, 并用发光强度代替相应 α P 活性值, 对 β -g 值作出相应于系列剂量的校正比值 $R^* = \beta\text{-g}/\text{BL}$, 进而对剂量为零的校正比值 R_0^* 归一化, 即为 ATP-BL 修正的诱导因子 $I.F.^* = R^*/R_0^*$, 表示 SfiA 基因表达速率。

结果和讨论

1. ATP 生物发光

在 ATP-BL 反应中, 形成的酶结合虫荧光素-腺苷酸复合物, 经过氧化、脱羧、转化成激发态羰基化合物, 发射光子 $h\nu$ 后, 回到基态。其发光强度与 ATP 浓度之间线性关系范围复盖数个数量级 ($10^{-11} \sim 10^{-6}$ mol/l)。本实验 ATP-BL 系统产生的发光峰按每分约 2% 幅度衰减, 故可允许手动操作和使用 S-ATP(图1)。

2. 细菌浓度和 ATP-BL 发光强度关系

活化测试菌株 PQ37 按 1:1, 1:10, 1:100 稀释后, 其 ATP-BL 强度与稀释度间呈现很好的线性依赖关系(图1)。这种依赖关系是基于活菌 ATP 水平保持恒定的性质,

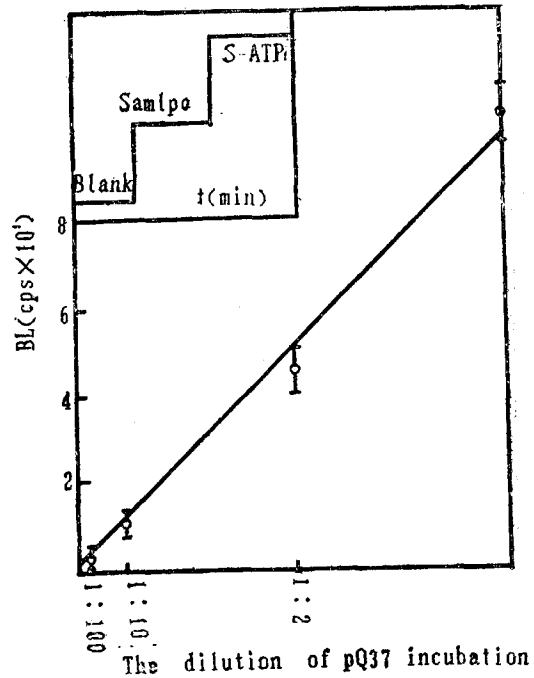


图1 活化测试菌PQ37的不同稀释度与 ATP-BL 强度关系(二次实验结果平均 $\bar{x} \pm s$)。

左上: ATP-BL 测定曲线。

因此正比于 CFU 数。

3. 细菌毒性效应的 ATP-BL 测定与 α P 活性测定比较

测试菌株 PQ37 在递增浓度的水浓缩液作用下, 随着剂量增加, α P 活性迅速降低(图2, α P 曲线); 同时, 相应的 ATP-BL 强度也平行下降(图2, BL 曲线), 显示出颇为一致的毒性效应。ATP-BL(Y) 与 α P(X) 二者之间存在正相关(图3), $r = 0.957$, ($P < 0.0005$)。其回归方程 $\hat{Y} = 11.4 + 43.0X$ 描述了二法测定结果的回归关系, 在一定条件下二者可以互为换算。以 ATP-BL 测定校正因受试物的细菌毒性效应引起的 SfiA 基因表达产物 β -g 活性的偏差, 其相应的诱导因子 $I.F.^*$ 曲线与通常 α P 测定法所得的 $I.F.$ 曲线很相近(图4)。因此可以认为 ATP-BL 不失为能有效校正 SOS 基因表达测定的替代细菌毒性指标。采用这种方法一大特点是不受试样颜色干扰, 如本例黄色试样用 α P 酶活性

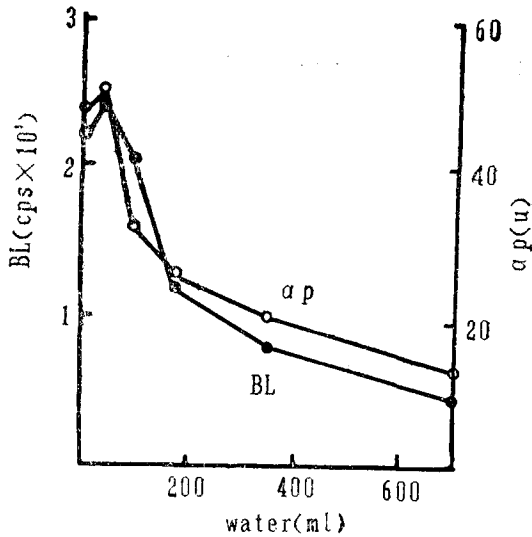


图 2 氯化饮用水浓缩液对PQ37菌株的细菌毒性效应(显示一次实验结果)。·—·: 生物发光测定(BL); ○—○: 碱性磷酸酶活性测定(αP)。

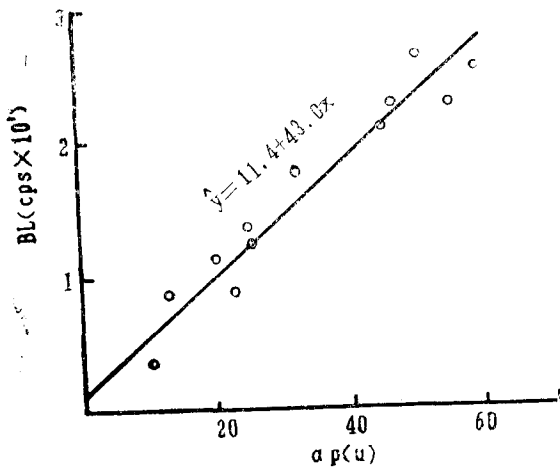


图 3. 氯化饮用水浓缩液细菌毒性效应的 ATP-BL测定对 αP 活性测定的回归直线。

的终点法就很难测定。另外，当测试菌 PhoC标记丢失、不能进行 αP 活性测定时，ATP—BL法就可取而代之。

ATP是细胞内重要代谢物，与其它代谢物相比，其存在浓度较高。由于它的高度转换率，细胞死亡即迅速消失，所以它是细胞

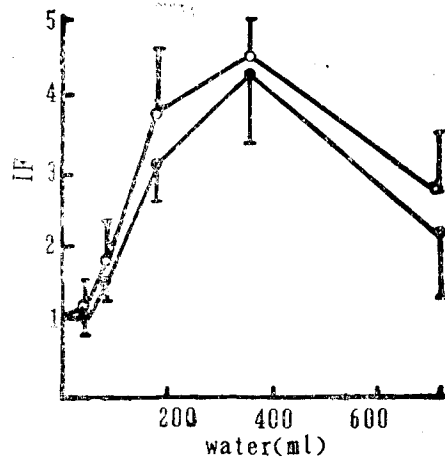


图 4. 二种细胞毒性终点校正方法所得的剂量—I.F.曲线。· · · : αP 活性测定校正; · · · : ATP-BL 测定校正

代谢活性、细胞活力的敏感指标⁽⁵⁾。生物发光是测定细胞内ATP含量(变化)最灵敏、快速的方法，检测下限仅相当于1000CFU/ml或更低。但是，各种遗传毒物引起的细胞毒性效应之间的定量关系是相当复杂的。本例反映的ATP与 αP 活性关系的一致性，还不能推论到其它遗传毒物。对于大多数干扰氧化磷酸化或其它产能代谢的毒物，ATP是反映蛋白质合成的一种很好的监测指标。而对于某些直接作用于蛋白质合成的毒物，ATP指标的适用性尚待探讨。不过，与用混合培养液的光密度作为细菌毒性校正相比，ATP—BL无疑是较为可靠的方法。ATP—BL在SOS显色试验中的应用仅是一种尝试，对于试样颜色干扰问题的另一部分 β -g测定还无能为力；此外，ATP—BL测定还需要专门的发光仪和较贵重的试剂。

参考文献

1. Quillardet P & Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures Mut Res 1985; 147 : 65-78
2. Marzin DR, et al. Kinetic determination of

(下转第31页)

剂量氙水照射条件下, 动物个体间辐射敏感性的差异不大。

由表 1 可见精原细胞染色体相互易位率随氙水中毒剂量的增加而升高。未见到饱和效应。其剂量——效应关系可以拟合为直线方程: $\hat{Y} = 0.581 + 0.0366X$ ($r = 0.958$, $P < 0.05$) (图 1)。以往的研究表明⁽⁵⁾ 辐射诱发

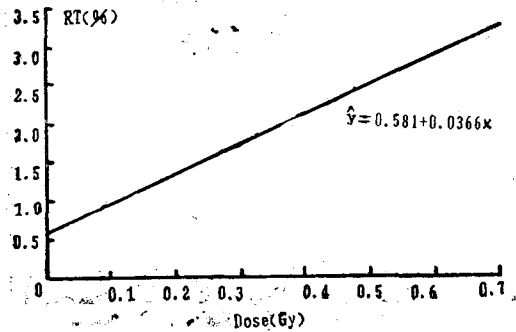


图 1 小剂量氙水诱发小鼠精原细胞染色体易位的剂量效应关系

精原细胞染色体易位的剂量效应关系在 0-400R 或 100-600R 的剂量范围内表现为线性

(上接第41页)

- Mut Res 1984; 138: 157-167.
2. 国家环境保护局, 环境监测技术规范(第四册), 生物监测(水环境)部分. 国家环境保护局, 1986: 72.
 3. 陈洪涛, 等. 应用紫露草微核技术对车间环境致突变物的监测. 中华劳动卫生职业病杂志 1986; 4(4): 237.
 4. 朱爱国, 等. 紫露草微核技术监测多异氰酸酯车间空气及废水的质量. 环境与健康杂志 1990; 7(2): 81.
 5. 李来玉, 等. 四种气态毒物对紫露草四分体微核及其他核异常效应的研究. 癌变·畸变·突变 1991; 3(2): 36.

(上接第17页)

- enzymatic activity and modification of the metabolic activation system in the SOS chromotest. Mut Res 1986; 164: 353
3. Lazaroni JA & Henry DL. In: Deluca MA & McElory WD eds Bioluminescence and chemiluminescence. New York: Academic Press, 1981: 443.

相关关系。在小剂量范围内, 剂量——效应关系表现为线性无阈的模式。并且照射剂量和射线种类对曲线的影响是不明显的。这与本实验所得的结果非常符合。

(本实验氙水剂量由郭芙蓉同志提供, 孙全富同志帮助进行部分数据处理工作, 在此一并致谢)

参考文献

1. 周舜元, 等. 氙水在小鼠体内的代谢. 中华放射医学防护杂志 1985; 5(1): 22.
2. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse. Nature(London) 1957; 180: 1137.
3. 黄辛野, 陈星若. 环境化学物致突变致畸变致癌试验方法. 第一版, 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985: 257.
4. Leonard A. Radiation-induced translocations in srpmatogonia of mice. Mut Res 1971; 11: 71.
5. Paul PW, Van Buul. Induction of chromosome aberrations by ionizing radiation in stem cell spermatogonia of mammals. In: Takaaki Ishihara and Masao Sasaki, eds. Radiation-induced chromosome damage in man. New York: Alan R. Liss, Inc. 1983: 369-400.
6. 中华人民共和国卫生部. 卫生防疫工作规范(劳动卫生分册). 北京, 中华人民共和国卫生部, 1991.
7. 郭祖超主编. 医用数理统计方法. 第三版, 人民卫生出版社, 1988: 636.
8. 中国预防医学科学院劳动卫生职业病研究所. 车间空气监测检验方法. 第三版, 北京, 人民卫生出版社, 1990.
9. 原国务院环境保护领导小组办公室组织翻译. 工业环境影响评价指南. 第一版, 石油工业出版社, 1984.
10. 江泉观主编. 基础毒理学. 第一版, 北京, 化学工业出版社, 1991.

4. Thore A. Technical aspects of the bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. Science Tools 26: 30
5. Harber MJ. In: Kricka LJ & Carter, TJN eds Clinical and biochemical application of luminescence, New York: Marcel Dekker Inc 1982: 189.