

转基因植物检测体系在环境污染物突变性评价中的应用

陈东¹, 韩凝¹, 马依群², 朱睦元¹

(1. 浙江大学生命科学院, 杭州 310012; 2. 杭州市余杭区环境检测站, 杭州 311100)

摘要:很多环境污染物都能对生物体产生诱变性,可利用多种测试材料与方法对其基因毒性进行检测。转基因植物检测体系不仅能对环境污染的诱变性大小进行评价,而且还可以进一步分析其突变的分子机理。介绍了转基因植株检测体系的应用前景。

关键词:环境检测; 转基因工程; *GUS* 基因; 基因毒性

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)05-0782-05

The Application of Transgenic Plant in Evaluating the Genotoxicity of Environmental Contaminants

CHEN Dong¹, HAN Ning¹, MA Yi-Qun², ZHU Mu-Yuan¹

(1. Life Science college of Zhejiang University, Hangzhou 310012, China;

2. Hangzhou Yuhang environmental monitoring station, Hangzhou 311100; China)

Abstract: Environmental contaminants are powerful mutagenic factors for organisms. Several testing materials and methods have been used to assess the genotoxicity of environmental factors. Transgenic plants testing system can not only evaluate the level of genotoxicity, but also provide information on the genetic effects at molecular level. We introduce the use of transgenic plants in biomonitoring environmental factors.

Key words: biomonitoring; transgenic engineering; *GUS* gene; genotoxicity

环境问题和人类生存有着密切的关系。近年来,随着工业污染物排放量的增加,以及农药、化肥的过量使用,水体、大气和土壤遭受着日益严重的破坏。很多的环境污染物,包括紫外线和电离辐射能影响生物体基因组稳定性,它们的诱变能力是造成污染物致畸致瘤的因素之一^[1,2]。因此检测这些污染物质的遗传毒性,有效地控制毒性物质的排放,就具有十分重要的现实意义。

在环境检测领域,已经建立了一系列的遗传毒性检测方法,包括最初的 Ames 试验^[3]、大肠杆菌 DNA 聚合酶缺陷型修复试验^[4]、SOS 显色试验^[5]、染色体

畸变与微核试验^[6~8]等。近几年随着分子生物学和基因工程技术的迅猛发展,遗传毒理学研究进入一个新的阶段。1987年, Lohman 等首次将转基因动物应用于遗传毒理学领域^[9],目前已建立鱼^[10]、小鼠^[11]等多个转基因动物模型用于致突变检测。1998年起,国外一些实验室开始探索转基因植物检测体系在环境检测中应用研究。该体系不仅能在分子水平提供污染物对生物体的遗传学效应信息,而且具有灵敏、高效、可重复等优点,因此受到越来越多的关注。目前转基因植物体系仍处于实验室研究阶段,该技术的深入研究和操作体系的日臻成熟,必将使之成为环境

收稿日期: 2003-06-20; 修回日期: 2003-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (No. 30370876, 39770420) [Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370876, 39770420)]

作者简介: 陈东 (1979-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学与基因工程。E-mail: cdong825@sohu.com

通讯作者: 朱睦元 (1956-), 男, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学 Tel: 86-571-88273325; E-mail: lcszhumy@mail.hz.zj.cn

污染遗传毒性检测一个重要手段。

1 转基因植物检测体系的原理

该技术的原理在于将已知序列的标记基因通过转基因技术导入植物体中,并使之得到稳定遗传。然后以此标记基因作为环境诱变剂致突变的靶位点,通过检测标记基因产生的蛋白质活性的改变作为环境污染物诱变性大小的指标^[12,13]。

该检测体系必须满足以下一些要求:1. 使用正确的标记基因,此标记基因对于植物体来说是非必需的,即在遗传上是中性的;2. 标记基因编码的蛋白质产物的活性易于检测,因此目前常用的基因是 *GUS*、*GFP* 等;3. 选择足够强的启动子,从而使用于取样的植物组织中有足够多能显示活性改变的标记基因蛋白质产物。

2 转基因植物检测体系的应用

Kovalchuk 实验室在 2001 年建立的体系,成功地将转 *GUS* 基因的拟南芥植株作为检测对象,以点突变和同源重组的发生频率作为环境污染物诱变性大小的指标^[14]。下面对他们采用的两种体系分别做一介绍。

2.1 点突变检测体系

目前较常用的点突变检测体系是将 *GUS* 基因经 PCR 定点突变后($G \rightarrow T$ 或是 $G \rightarrow A$),构建到表达载体上,然后转化植物,然后通过反复自交,得到含有单拷贝 *GUS* 基因的转基因植株。此转基因植物体系的基因组整合了发生了点突变($G \rightarrow T$ 或是 $G \rightarrow A$)的单拷贝的 *GUS* 基因,这些单核苷酸的替换导致了终止密码子的形成($GGA \rightarrow TGA$)或是氨基酸的替换($GGA \rightarrow AGA$),使 *GUS* 基因失去活性,经组织化学染色后呈白色。用这种转基因植物检测环境污染时,如果环境污染因子的作用使突变基因发生同一位点的回复突变,就能使 *GUS* 基因恢复活性,经组织化学染色呈蓝色。这样就可根据蓝色斑点数量多少来确定环境污染的严重程度(图 1)。

2.2 同源重组检测体系

该体系利用生物体基因之间会发生同源重组影响基因功能的原理,评价环境因子对同源重组的影响。目前应用较多的一个体系是,通过基因缺失技术,将靶基因 *GUS* 改造成 N 末端缺失的 *GUS* 基因片段和 C 末端缺失的 *GUS* 基因片段,然后分别构建到潮霉素抗性

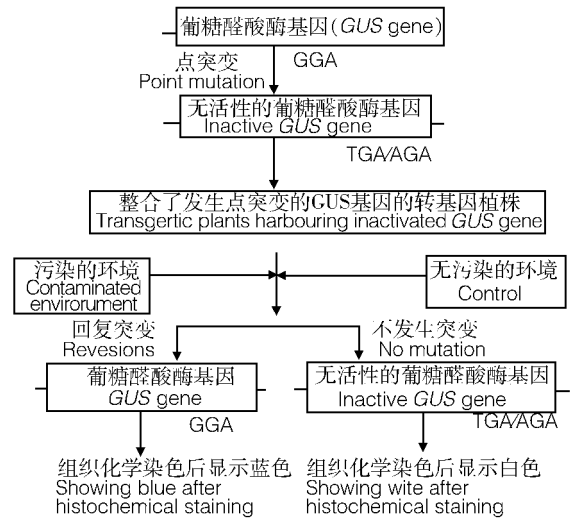


图 1 用于环境污染检测的点突变体系

Fig. 1 Point mutation assay system for environmental contaminants detection

基因的前面和后面,这两个 *GUS* 基因片段有 566 碱基的正向重复序列,然后用这个构建好的质粒转化植物(图 2),得到的转基因植株可用以监测环境。当转基因植物在环境污染因子的作用下,通过这两个 *GUS* 基因片段间 DNA 双链断裂引起同源重组,使原本因缺失而无功能的 *GUS* 基因重组成正常的有功能的 *GUS* 基因。恢复活性的 *GUS* 基因表达情况可以通过组织化学染色法检测,然后通过计算同源重组频率确定环境污染因子的诱变作用。

以上两种转基因体系已经被用来检测环境污染物的基因毒性,特别是用来检测紫外线辐射、电离辐射和重金属污染的诱变性。在检测重金属污染时,两种体系都有较好的检测效果。在实验室条件下,将两种转基因植物种植于含有重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 污染的培养基中,可以观察到同源重组发生频率和点突变频率明显提高,如镉离子浓度在 0.001 mg/L 时,就可以检测到点突变的频率增加了 3 倍左右。在检测土壤环境污染时,同源重组发生的频率和点突变频率同样明显高于对照组,检测污染区的土壤时,同源重组事件较对照提高了 4~7 倍,点突变频率提高了 5~10 倍(表 1)。在紫外线辐射和电离辐射检测方面,同源重组体系应用得更多,把转基因拟南芥种植于切尔诺贝利地区以检测环境的污染程度,可以观察到同源重组频率的明显增加^[15]。

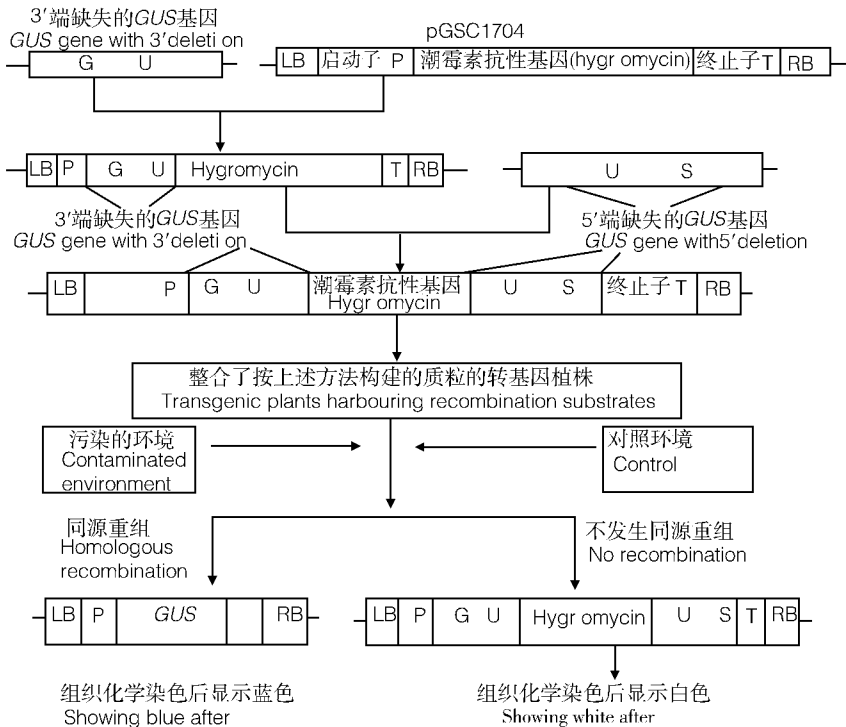


图 2 用于环境污染检测的同源重组体系

Fig. 2 Homologous recombination assay system for environmental contaminants detection

另外, Marmioli 等人建立的转基因烟草体系也取得了不错的检测效果^[16]。该体系利用胁迫诱导型启动子大麦 *Hvhsp17* 基因, 将其与 *GUS* 基因融合, 然后转化到烟草中, 获得稳定的转基因烟草用以检测环境污染物的基因毒性。用 1 mmol/L 的镉离子浓度处理该烟草 40 小时后, 经检测 *GUS* 基因活性提高了 4 倍左右; 0.1 mmol/L 的镉离子处理 4 个星期后, *GUS* 基因活性提高了 2 倍左右。

表 1 生长在重金属含量不同的两处污染土壤的植物点突变和同源重组发生的频率

Table 1 Point mutation and homologous recombination frequency in plants grown in two different contaminated soils

	对照 Control	污染土壤 1 Soil 1	污染土壤 2 Soil 2
同源重组 Homologous recombination	0.85 ± 0.15	5.60 ± 0.40	3.48 ± 0.32
T → G 突变 (T → G mutation)	0.05 ± 0.01	0.45 ± 0.10	0.23 ± 0.04
A → G 突变 (A → G mutation)	0.06 ± 0.01	0.68 ± 0.28	0.25 ± 0.07
Cu (mg/kg)	1.8	4.8	3.3
Pb (mg/kg)	7.0	19.7	13.3
Zn (mg/kg)	8.9	29.6	11.0
Cd (mg/kg)	0.1	0.6	0.3
Ni (mg/kg)	0.5	0.9	0.4

3 转基因植物检测体系的特点

由于植物本身的一些特点, 使转基因植物检测体系与动物体系相比, 具有一些明显的优势。从灵敏度看, 植物体系要优于动物体系。表 2 对几种方法做一粗略的比较, 说明植物体系在重金属污染检测中的优越性。其中在重金属 Cd 的检测中, 植物系统的灵敏度是动物系统的 112 ~ 1120 倍, Cu 的检测中, 前者是后者的 63 倍。另外有研究发现由于外源基因在体内的自发突变频率较高, 导致动物体系检测的灵敏度降低, 特别是检测弱致突变剂引起的微弱变化时如此。Monroe 用一定剂量的 MNU 处理转基因小鼠时, 检测结果显示内源的 *hprt* 基因活性提高了 78 倍, 而 *lacI* 仅提高 3.1 倍, *cl*、*cII* 没有检测到任何的提高^[17], 而转基因植物检测体系还未见这方面的报道。

另外, 从精确性看, 转基因植物也明显具有优势。在转基因动物模型检测的过程中, 需要从经污染物处理的动物体内分离出外源基因, 体外重新包装后转化 *E. coli*, 然后通过统计蓝色噬菌斑和清亮噬菌斑的比率来分析致突变率。由于在细菌的扩增

过程中这个外源基因有可能发生变异,从而导致检测结果的误差。相对于动物模型,转基因植物模型

由于利用 *GUS* 基因检测,方便、直接、快捷,不涉及体外的基因变异事件,减少了产生误差的环节。

表 2 几种检测方法的比较

Table 2 Comparison of mutagenicity tests

方法 Method	Cu(mg/L)	Cd(mg/L)	Pb(mg/L)	Ni(mg/L)	Zn(mg/L)	As(mg/L)
转基因小鼠 Transgenic mouse ^[11]	3.18	1.12				0.75
转基因烟草 Transgenic tobacco ^[16]		0.01~0.1				
转基因拟南芥 Transgenic arabidopsis ^[14]	0.05	0.001~0.01	0.50	0.50	6.00	0.05

由于动植物生活方式的差异,使两种检测方法分别适应于不同的检测目的。一般说,动物对环境因子的反应更接近于人体,因此应用动物检测体系得到的数据具有较高的参考价值。但是由于动物移动的生活特性,很难利用其作为检测环境污染,特别是慢性污染的有效手段。

而植物由于可种植于某一固定区域,特别适用于对土壤中污染物的监控。与实验室建立的体系不同,植物系统可直接种植于待测地点定期进行检测,充分模拟自然系统产生的遗传效应。处于食物链较低营养级,与更高营养级的动物相比,能更迅速地接触到有毒污染物,因此可以在生态环境发生显著破坏之前就向人们提供预警信号。

另外,植物系统特别是目前广泛采用的模式植物如拟南芥等,个体小,生长快,可产生大量种子用于检测,使植物系统的操作变得更简单、快速、成本低、可进行大量重复实验。相对而言,动物体系成本偏高,操作系统复杂,不可能进行大规模测试。另外还会引起伦理上的一些争议。

当然,植物检测系统也存在一些局限性。如有时候环境污染物对植物靶分子的诱变作用和产生的损伤表型与哺乳动物和人体的情况会有所差异,一些环境污染物对人体有诱变效应,而在植物中却观察不到。理论上,人们希望一种材料能用于多种污染物的检测,但事实上每种生物对污染物的反应有一定特异性。因此充分利用转基因植物和动物系统各自的优势,相辅相成,互为补充,互作参考,才是一种科学的态度。

4 展 望

长期以来,植物细胞广泛应用于各种污染物、药物、食品等的致突变性检测,已成为监测环境污染的一种有效的生物传感器。而近几年发展的转基因植

物检测体系则从分子角度,试图揭示污染物对植物细胞基因组的影响,并以此作为环境因子致突变率的评价指标。该技术将致突变检测和分子突变分析相结合,在对化合物的致突变性进行评价的同时,又可以进一步深入研究其分子突变机理。但是由于检测体系基本上还处于实验室阶段,如何使之更好地应用于实际,还需要做很多工作。关键在于如何发挥其优势,并且进一步改进存在的不足和缺陷,如简化和规范操作程序,降低成本等。

迄今,转基因植物检测体系已在重金属、紫外线辐射、电离辐射等方面进行一些尝试,并取得了一些可靠的数据,为进一步的研究和探索奠定了基础。但是环境中还存在着多种污染物,其中有很多是人为造成的,如除草剂、杀虫剂等,都对人体具有很大毒性,目前转基因检测体系在这些方面的检测还未见报道,另外污染物间的互作效应也鲜有研究。这些方面的都值得进一步的探索。

由于模式植物本身具有的一些优点,使目前的研究主要集中在拟南芥和烟草等植物,是否可以尝试根据具体环境的差异,选择其他的植物种类作为转基因材料。比如利用水生植物检测水体污染;利用农作物检测农田污染等。

另外,转基因植物检测体系往往是通过检测点突变和同源重组发生频率,而在目前建立的一些体系中,只有当二倍体基因组中单一碱基对的变化后才能引起表型的变化,因此能检测到的突变频率相对较低。Kovalchuk 等^[18]提出一种新的思路,他将编码四环素抑制因子的基因与标记基因相连导入植物,正常情况下,依赖四环素的标记基因的转录被抑制。当诱变因子造成抑制因子基因突变后,抑制了抑制因子与标记基因启动子的结合,使标记基因活化。在这种方法中,只要抑制因子任何位点发生使之失活的突变,标记基因的转录活性都会发生

改变,即通过增加突变位点,使灵敏度提高。当然对检测方法条件进行进一步的优化也有益于灵敏度和精确性的提高。

总之,只要我们进一步完善和规范操作,发挥植物体系的一些优势,转基因植物体系在环境污染物的致突变检测中一定具有光明的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Knasmuller S, Gottmann E, Steinkellner H. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat Res*, 1998, 420: 37~48.
- [2] Hartwig, A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, 1995, 8: 3~11.
- [3] Rossam T G, Molina M, Boone P. Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction endpoint of the Microscreen assay and a comparison with *S. typhimurium* mutagenicity and rodent carcinogenicity assays. *Mutat Res*, 1991, 260: 349~367.
- [4] Schaaper R M, Dunn R L. Spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *Genetics*, 1991, 129: 317~326.
- [5] Quillardet P, Touati E, Hofnung M. Contribution of the SOS chromotest to genetic toxicology. *Mutat Res*, 1997, 379: s203.
- [6] Steinkellner H. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ Mol Mutagen*, 1998, 31: 183~191.
- [7] Kong M S, Ma T H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat Res*, 1999, 426: 221~228.
- [8] CAO Jia. The Applications, Developments and Expectations of Micronucleus Test in China. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(1): 73~76.
- 曹佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望. *遗传*, 2003, 25(1): 73~76.
- [9] Lohman P H, Vijg J, Uitterlinden A G, Slagboom P, Gossen J A, Berends F. DNA methods for detecting and analyzing mutations in vivo. *Mutat Res*, 1987, 181: 227~34.
- [10] Amanuma K, Takeda H, Amanuma H. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 62~65.
- [11] Sacco M G, Zecca L, Bagnasco L. A transgenic mouse model for the detection of cellular stress induced by toxic inorganic compounds. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 1392~1397.
- [12] Kovalchuk I, Kovalchuk O, Hohn B. Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. *EMBO J*, 2000, 19: 4431~4438.
- [13] Swoboda P, Gal S, Hohn B. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J*, 1994, 13: 484~489.
- [14] Kovalchuk I, Kovalchuk O, Titov V. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 568~572.
- [15] Kovalchuk I, Kovalchuk O, Arkhipov A. Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobly accident. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 1054~1059.
- [16] Monciardini P, Podini D, Marmiroli N. Exotic gene expression in transgenic plants as a tool for monitoring environmental pollution. *Chemosphere*, 1998, 37: 2761~2772.
- [17] Monroe J J, Kort K L, Miller J E, Marino D R, Skopek T R. A comparative study of in vivo mutation assays: analysis of hprt, lacI, and cII/cl as mutational targets for N-nitroso-N-methylurea and benzo[a]pyrene in Big Blue mice. *Mutat Res*, 1998, 421: 121~136.
- [18] Kovalchuk I, Kovalchuk O, Hohn B. Biomonitoring the genotoxicity of environmental factors with transgenic plants. *Trends in Plant Science*, 2001, 6: 306~310.

欢迎订阅 2005 年《分子植物育种》

《分子植物育种》是由国家科技部和国家新闻出版署批准,由张启发院士主编,方宣钧博士、吴为人博士、朱玉贤博士任执行主编,黎志康博士、马正强博士、王道文博士、王明理博士任副主编,众多国内著名学者担任编委的学报级刊物。本刊“立足国内,面向国际”,是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的国际化科学杂志,主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等方面,刊登分子遗传育种理论、分子育种方法、分子育种研究动态以及优良种质培育的科学论文报道,包括研究报告、研究论文、文献综述、实验方法、学位论文摘要、基因登记及新品种登记等栏目,内容新颖,信息量大、报道及时、可读性强,已经被美国化学文摘(CA)、中国期刊全文数据库(CJFD)、中国核心期刊(遴选)数据库、中国科技期刊数据库等多家数据库所收录,是广大植物分子生物学家、分子遗传学家、植物育种家的必备刊物。

本刊为大 16 开本,150 页,全年出刊 6 期,铜版纸彩色印刷,国内外公开发行的生命科学学术期刊(双月刊)。国内刊号:CN46-1068/S,邮发代号:84-23,联合征订代号:6512。国际刊号:ISSN1672-416X,海外发行代号 1672BM,海外发行机构:中国图书进出口(集团)总公司出口部。每期定价 40 元,全年 240 元(含邮资费)。详情请浏览 <http://fzzw.chinajournal.net.cn> 或 <http://www.hitar.org>;Email: mpb@hitar.org。