

一种快速显示抗突变作用机理的试验设计

赵泽贞 温登瑰 魏丽珍 支惠英

河北省肿瘤研究所 石家庄 050011

摘要 为建立一种在检测物质的抗突变性的同时能显示出其作用机理的快速试验方法,我们做了一种试验设计,预期能揭示出抗突变物是直接灭活致突变剂的细胞外作用还是细胞内的抗突变作用,并区分是保护细胞免受损伤还是促使已突变的细胞 DNA 修复,或具有多种综合作用。该设计以检测已知抗突变剂 VitC 为例效果良好。

关键词 抗突变;机理;试验设计

EXPERIMENT DESIGNING FOR RAPID ASSESSMENT OF THE ROLE OF AN ANTIMUTAGEN

Zhao Zezhen, Wen Denggui, Wei Lizhen and Zhi Huiying

Hebei Cancer Institute, Shi jia zhuang 050011 P. R. China .

Abstract To distinct the mechanism of an antimutagen with SOS inductest ,the authors designed a series of lab procedures which could reveal whether the antimutagen deactivate a given mutagen extracellularly or protect the targer cell against mutagenesis extracellularly ,whether the antimutagen interrupt mutagenesis intracellularly or has an ability to repair damage caused by the mutagen. After using Vitamin C as a standard antimutagen ,we found that the lab procedures could be put into practice effectively.

Key words Antimutagenicity ; Mechanism ; Lab designing

当前抗突变的试验方法已有多种,但尚未见到在某种抗突变试验的同时能显示出一些抗突变作用机理的试验方法。区别抗突变物的作用为细胞外或细胞内是一关键,鉴别受测

- uids in Ames Salmonella/ microsome Assay. *Mutat Res* , 1981 ;90 :31
- 7 Hughes TJ , Simmons DM , Monteith LG , et al. Vaporization Technique to Measure mutagenic activity of volatile organic chemicals in the Ames/ Salmonella assay. *Environ Mutagenesis* , 1987 :9 :421
- 8 Bridges BA. On the detecton of volatile liquid mutagens with bacteria. experiments with dichlorvos and epichlorhydrin. *Mutat Res* , 1978 ; 54 :367
- 9 Zamora PO , Benson JM , Brooks. Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/ HGPRT mutation assay. *Environ Mutagenesis* , 1983 ;5 :795
- 10 Claxton LD. Assessment of bacterial mutagenicity methods for volatile and semivolatile compounds and mixtures. *Environ International* , 1985 ;11 :375
- 11 Maron DM , Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* , 1983 ;113 :173

物的抗突变功能是促使已突变细胞的 DNA 修复或保护未突变细胞免受损伤或是多重综合作用。更具有重要意义。为此,采取抗突变剂,致突变剂和指示菌多种不同接触方式的实验设计,以期达到区分上述抗突变作用机理的目的。报告如下。

材料与方 法

1 检品、试剂及标准菌种:以维生素 C(VitC)做被检物为例。

1.1 已知抗突变剂:100mg/ml 的 VitC。

1.2 已知致突变剂:0.05mg/ml 丝裂霉素 C(MMC)。

1.3 阴性对照剂:生理盐水(NS)。

1.4 标准菌种:GY5027 为遇到致突变剂即发生突变并释放噬菌体的指示菌。GY4015 为对该噬菌体敏感的菌,经对两菌株进行鉴定符合原生物学特性。

2 抗突变机理的试验设计:通过以下四种处理方式进行试验:

2.1 A.0.3ml 的 Vit. C 先与 0.3ml 的 MMC 接触,后与指示菌接触。

2.2 B.0.3ml 的 VitC 和 0.7ml 菌液接触,用 NS 洗菌,再与 MMC 接触。

2.3 C.0.15mlMMC 0.85ml 菌液接触,用 NS 洗菌,再与 Vit. C 接触。

2.4 D.0.25mlVit. C 0.5mlMMC 和 0.25ml 菌液同时混合接触。

以上四种处理方式均分别做了接触即刻、20min、40min、60min 的试验,除即刻外均在 37 温箱中进行接触。

3 该试验设计结果的分析:按照上述设计得到的试验结果将产生以下七种情况之一:

3.1 A 和 D 显示被检物抗突变阳性,但 B 和 C 阴性,则提示被检物只具有直接灭活致突变剂的细胞外抗突变作用。

3.2 B 和 D 显示被检物抗突变阳性而 A 和 C 阴性,提示被检物只具有保护细胞免受损伤的抗突变作用。

3.3 C 和 D 显示被检物抗突变阳性,而 A 和 B

阴性,提示被检物只具有促使已突变细胞 DNA 修复的抗突变作用。

3.4 B、C 及 D 显示被检物抗突变阳性,只有 A 阴性,则提示被检物既有保护未突变细胞免受损伤又有促使已突变的细胞 DNA 修复的细胞内抗突变作用,但对致突变剂无灭活作用。

3.5 A、B 及 D 显示被检物抗突变阳性,只有 C 阴性,提示被检物既有直接灭活致突变剂的作用又有保护细胞免受损伤的抗突变作用,但不促使已突变细胞的 DNA 修复的效应。

3.6 A、C 和 D 显示被检物抗突变阳性,只有 B 阴性,提示被检物既有直接灭活致突变剂的细胞外作用同时又有促使已突变细胞 DNA 修复的细胞内抗突变作用,但不能确定是否具有保护细胞免受损伤的作用。

3.7 A、B、C 和 D 全部呈现被检物抗突变阳性,即可证实被检物具有上述多种综合的抗突变作用。

4 试验方法及程序

4.1 菌种的活化及处理、各种培养基的成份及制备、加菌铺皿按照抗突变和致突变同步快速试验的常规进行。⁽¹⁾

4.2 加已处理的检品和各种对照剂:用长 7cm 宽 0.5cm 的无菌滤纸条沾 MMC 液贴在平皿半固体表面的直径线上,用长 2.5cm 宽 0.5cm 的无菌滤纸条分别沾 MMC、VitC、NS 与 MMC 长纸条垂直相交贴在半固体平皿上,每皿等距贴三条,呈“#”状,为标准对照。各种处理后的检品按同样的贴条方式处理,每个检品各做三个平行对照。

4.3 培养:处理后将试验并且全部放 37 温箱培养 6-12 小时内观察结果。

4.4 判断结果的标准:试验平皿半固体表面菌苔背景生长良好并有散在分布均匀的自然回变噬菌斑;标准对照中的 MMC 长、短纸条周围有密集的噬菌斑并超过背景一倍以上;Vit. C 纸条周围噬菌减少一倍以上或消失,尤其与 MMC 纸条相交处更明显;NS 纸条周围无变化,同时具备上述条件判断试验成功。其它各种不同检品纸条与标准对照进行比较,如与

单细胞凝胶电泳制胶方法的改进

张建平 田 源 陈道达

同济医科大学附属协和医院普外 武汉 430022

单细胞凝胶电泳技术(SCGE又名Comet Assay)是由Ostling⁽¹⁾于1984年首创,其后又由Singh⁽²⁾和Olive⁽³⁾分别加以改进,形成目前的碱性和中性裂解二类方法。该技术用于检测细胞DNA单链和双链缺口,因其简单、灵敏、迅速,且不需放射性核素标记,故一经创建即成为研究DNA损伤的重要手段,倍受重视。但是,该技术尽管原理、方法简单,其操作过程却十分困难。在胶板制作中,一般要在磨毛载玻片上滴加凝胶二~三层,每次用盖玻片盖压,在揭取盖玻片时,极用损坏胶板。在其

后的裂解、电泳和洗涤过程中,凝胶长时间浸泡、冲洗,即使极轻的振荡,也可能将胶板冲动漂起,胶板的损伤常至实验失败。针对上述缺点,我们改进了制胶方法,采用自制的带槽磨毛载玻片加盖盖玻片进行单层灌胶的方法,基本解决了传统方法胶板易受损的缺点。

方 法

1 载玻片制作:将普通载玻片单面用80或120目砂充分磨毛,在其长边两侧用瑞士产Araldite胶各粘贴一大一小为2~3×50mm,厚

Vit. C反应一致则判该检品有抗突变性,与MMC反应一致则判为有致突变性,与NS反应一致则为阴性。

结果与讨论

1. 在培养7小时后各平皿半固体表面均出现了典型的噬菌斑,全部达到了判断结果的标准。按照四种处理方式的设计以Vit. C为例进行试验的结果,Vit. C在A、B、C、D四种处理方式中均显示了抗突变效应,提示其既有细胞外直接灭活致突变剂的作用又有细胞内的抗突变作用;既能保护细胞免受损伤又能促使已突变的细胞DNA修复,即可能具有综合的抗突变作用。

2. 四种不同时间的结果反应一致,提示检品接触时间从即刻到1小时之内均可显示抗突变作用。Vit. C滤纸条周围噬菌斑的数量有随时间的延长而减少的趋势,即接触时间长抗突变效应有所增强。但也观察到接触40及

60分钟的试验平皿中B的背景自然回变噬菌斑过于密集C过于减少,故以接触20分钟为宜。

3. 该设计不必用复杂昂贵的仪器,通过被检物、致突变剂及指示菌三者之间的多种不同处理方式,在特定温度特定时间的条件控制下,用抗突变和致突变同步快速试验即能揭示出某些抗突变剂的部分作用机理,该法快速简便,节省经费。

4. 这四种处理方式的试验设计也应适用于其他的抗突变试验,待进一步验证。

5. 如被检物为间接抗突变剂应做加S₉的试验或同时做加和不加S₉的两种试验,S₉的制备同Ames试验⁽²⁾。

参考文献

1. 赵泽贞,黄民提,魏丽珍. 抗诱变和诱变同步快速试验方法的研究. 中国公共卫生学报,1992;11(1):41
2. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmovella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983;113:173