

水产罐头食品致突变性的研究

许为群 徐冠雄

(上海水产学院) (上海肿瘤研究所)

提 要

采用鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和 TA100 二个突变菌株,加哺乳动物肝微粒体酶对五种水产食品是否具有致突变性所进行的试验。实验结果表明:五种水产食品中烟熏鱼对 TA100 菌株有诱变作用,说明这种水产食品含有可引起 DNA 发生碱基对置换突变的化合物。提示在鱼肉烟熏加工过程中,有可能产生多环芳烃类(PAH)化学致癌物。

前 言

近年来,对于烹调过的食品、熏制的鱼品和肉类以及蛋白质或氨基酸的热介产物中具有致突变物质,国外已有报道^[6-7]。食品中的这些物质可能来自食品本身,或来自烹调时加入的佐料及其他添加剂^[8]。有的虽然其含量很低,但在以啮齿动物为材料的实验证明,会累积起来足以引起细胞 DNA 损伤和致基因突变,从而导致癌症和遗传性缺陷等病变。这些实验表明,极大多数致癌物就是致突变物^[9]。

Ames^[10,11]等人用鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 组氨酸缺陷型突变菌株,在培养皿中经致突变物作用可使之产生回复(reverse)突变(简称回变),间接判断致癌的可能性。测定时需加入鼠肝微粒体酶活化系统^[12-14]。许多经过代谢活化的致癌物能作为致突变物被检测出来^[9,10]。突变的基本方式有碱基对置换(base-pair substitution)型突变和移码(frameshift)型突变两种。分别用碱基对置换型突变菌株检测碱基对置换型致突变(致癌)物;用移码型突变菌株检测移码型致突变(致癌)物。经动物试验证实的化学致癌物 90%是致突变物,故检测致突变物对初筛致癌物有一定价值。

目前对于食品中致突变的检测和研究,已经逐渐引起人们的重视^[1-8],但国内对食品的检测和研究尚不多,特别尚未见到罐头食品的检测报道。我们最近对五种鱼品罐头食品的致突变性进行了初步检测和研究。

材 料 和 方 法

1. 样品的处理

将五种水产罐头食品(油炸鱼、辣味鱼、油浸鱼、茄汁鱼、烟熏鱼)以无菌操作分别切碎

碾细、加二甲基亚砷(DMSO)助溶(每克鱼/2毫升),剧烈震动后放冰箱内浸泡24小时,室温下1000转/分的速度离心10分钟,每种样品分别取上清液0.05、0.1、0.2、0.3、0.4毫升5个量级进行测试。

2. 代谢活化系统的制备

代谢活化系统制备,需经过大鼠肝酶诱导、肝匀浆上清液(S-9)制备、S-9活性测定几个步骤。

(1) 大鼠肝酶的诱导 取150—200克左右的雄性大鼠选用多氯联苯(Polychlorinated biphenyl, PCB) (Aroclor1254)为诱导剂^[10],多氯联苯用玉米油稀释,按500毫克/公斤体重的量折算,从大鼠腹股沟一次注入腹腔,对照组注入等量玉米油。诱导期为五天。

(2) 肝匀浆上清液(S-9)制备 将经过肝酶诱导的大鼠剖杀(剖杀前12小时禁食)。从肝门静脉注入0.15M KCl溶液充分洗涤肝脏中的血液。取下肝脏称重,每克肝加3毫升0.15M KCl溶液制成匀浆;离心(9000转/分)20分钟,取肝匀浆上清液分装试管,干冰速冻,放低温冰箱(-40°C)备用,以上全部操作均在0—4°C无菌条件下进行。

(3) S-9的活性测定 制备好的S-9需进行活性测定。用小牛血清标准蛋白质对照,用福林(Folin)定蛋法,并用721型分光光度计测定蛋白质含量。将肝匀浆上清液折算配成6毫克蛋白质/毫升的浓度。然后在肝匀浆中通入少量CO,再用751型分光光度计测定其活性(细胞色素P-448, P-450)。再经平板无菌培养以及用已知需要代谢活化的致癌物黄曲霉毒素B₁及鼠伤寒沙门氏菌TA 98和TA100菌株,呈阳性反应时,则为证明可用。

(4) 辅酶Ⅱ和葡萄糖-6-磷酸盐溶液的配制 第一步先取Na₂HPO₄·12H₂O 7.16克, KH₂PO₄ 2.72克,加水至100毫升,蒸汽灭菌,先配成0.2M pH7.4的磷酸缓冲液。第二步取MgCl₂ 8.1克, KCl 12.3克,加水至100毫升,蒸汽灭菌,配成盐溶液。然后取0.02M pH7.4的磷酸缓冲液5毫升,加入盐溶液0.2毫升,加入辅酶Ⅱ29.7毫克,葡萄糖-6-磷酸15.2毫克,加水至9毫升,即配成辅酶Ⅱ和葡萄糖-6-磷酸的盐溶液。

(5) 检测样品 先将制成并经活性测定的肝匀浆上清液(S-9)在室温条件下融化,按1:9的比例,加入辅酶Ⅱ和葡萄糖-6-磷酸盐溶液,即成为S-9代谢活化系统,冰浴待用。检测样品时,每皿需加入S-9代谢活化系统0.5毫升(约合50微升)。

3. 细菌的培养方法

取冰冻干燥保存的鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型突变菌株TA98(移码型突变)和TA100(碱基对置换型突变)二个突变菌株的菌种,分别用0.2毫升生理盐水融化,接种在斜面培养基上,37°C培养24小时;再从这斜面上挑取菌种接入装有15毫升营养液体培养基的小三角烧瓶中,37°C培养16小时。用细菌浊度计计数,选用721分光光度计560mu波长,光密度读数为0.8—1.00之间,同时测得的细菌活菌数为每毫升10⁸—10⁹之间。

4. 菌株的鉴定^[10]

在检测样品前对菌株进行组氨酸缺陷试验,鉴定该菌是否需要组氨酸;结晶紫抑菌试

验, 鉴定该菌是否有膜脂多糖通透屏障; 氨苄青霉素(Ampicillin)抗菌试验, 鉴定该菌有否抗性转移因子; 紫外光敏感试验, 鉴定该菌是否失去 DNA 修复能力; 用阳性致癌物亚硝基胍(NTG), 鉴定该菌是否有回变特性, 以及自发回变率, 鉴定菌种是否纯种和生长是否正常。符合以上要求才可使用。

5. 致突变检测试验

先制备检测试验用的底层和上层培养基。

(1) 底层培养基 琼脂粉 1.5%, 葡萄糖 2%, Vogel-Bonner 低营养液 E[MgSO₄·7H₂O 0.02%, 枸橼酸 0.2%, 无水 K₂HPO₄ 1.0%, Na(NH₄)HPO₄·H₂O 0.35%] 2%。高压灭菌(8 磅, 15 分钟)

(2) 上层培养基 琼脂粉 0.6%, 氯化钠 0.5%, 0.5mM L-组氨酸及 0.5mM 生物素液 10%。高压灭菌(15 磅, 10 分钟)

然后取 TA98 及 TA100 两种菌株, 分别加 S-9 代谢活化系统和不加 S-9 代谢活化系统, 进行分组试验, 以确定样品对两种菌株是否引起致突变作用, 以及确定是移码型还是碱基对置换型致突变作用。

具体的操作法是, 在培养皿中, 先加底层培养基 15 毫升, 然后取融化的上层培养基 2.5 毫升, 再在 45°C 条件下, 一个试验组加入 0.1 毫升菌液和待检样品溶液, 另一试验组除同上试验组外再加入 S-9 代谢活化系统, 充分摇匀, 倒在已凝固的底层培养基上, 37°C 培养 48 小时。而所有的对照组都不加待检样品溶液。按 Ames 法常规操作进行定量分析, 计算出回复突变的菌落数。凡引起回复突变菌落数多于对照 2.5 倍以上者, 为致突变阳性。

实 验 结 果

五种水产罐头食品的定性检测结果如表 1。

表 1 样品致突变性定性检测结果

样品名称	样品含量 (毫升/皿)	不 加 s-9		加 s-9	
		TA 98	TA100	TA 98	TA100
油炸鱼	0.05—0.4	-	-	-	-
辣味鱼	0.05—0.4	-	-	-	-
油浸鱼	0.05—0.4	-	-	-	-
茄汁鱼	0.05—0.4	-	-	-	-
烟熏鱼	0.05—0.4	-	-	-	+

据表 1 表明, 烟熏鱼在加入 S-9 代谢活化系统时菌株 TA100 是致突变阳性反应。其他四种水产罐头食品都呈阴性反应。

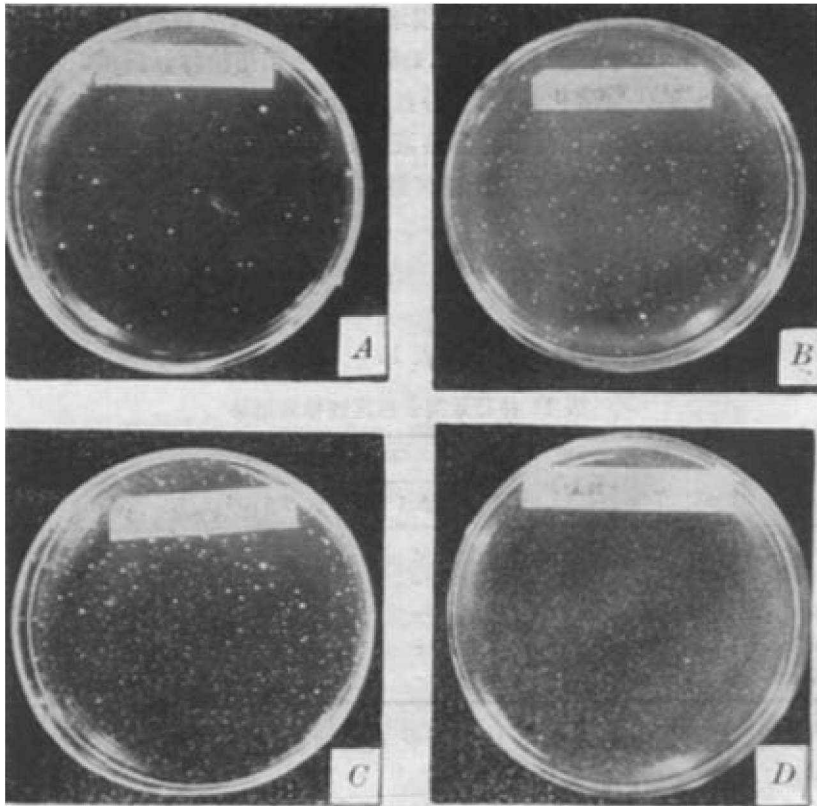
烟熏鱼定量检测结果见表 2 及附图

表 2 表明, 受试菌株 TA98 每皿回变菌落数接近于阴性回变对照组的菌落数(TA98 为 40 个菌落、TA100 为 160 个菌落), 故为阴性。受试菌株 TA100 每皿回变菌落数接近于已知有诱变作用的致癌物亚硝基胍(NTG 或 MNNG)及黄曲霉毒素 B₁ 的阳性对照

组,并且菌落有明显生长背景故确定其为阳性。

表2 烟熏鱼诱变效应定量检测结果

测试菌株	试 验 组		阳 性 回 变 对 照 组		阴性回变对照组 (自发回变率)
	样品含量 毫升/皿	回变菌落数加 S-9 50微升/皿	亚硝基胍 50 微克/ 皿不加 S-9	黄曲霉毒素B ₁ 0.25 微克/皿加 S-9	
TA 98	0.05	12 ± 2	—	2012	29
	0.1	23 ± 8			
	0.2	37 ± 2			
	0.3	42 ± 5			
	0.4	26 ± 13			
TA100	0.05	238 ± 93	1638	1236	121
	0.1	523 ± 58			
	0.2	2683 ± 152			
	0.3	864 ± 114			
	0.4	118 ± 96			



附 图:

- A. TA98 自发回变
- B. TA100 自发回变
- C. NTG TA100 阳性对照
- D. 烟熏鱼 TA100 诱变阳性

讨 论

我们用 Ames 法检测五种水产食品对 TA98 和 TA100 的诱变性试验的结果, 发现烟熏鱼有诱变活性。试验表明鱼品在熏制过程中, 有可能与一定量多环芳烃类化学致癌物的污染有关^[4]。对于这种方法检出的阳性反应物质应予以重视。当然, 由于致突变物并不一定都是致癌物质, 因此对本试验检测结果呈阳性反应的烟熏鱼, 有必要进一步用其他测试系统进行鉴定和核对, 以期达到对癌症及其他损伤 DNA 的生物后果, 有效地进行预防。

参 考 文 献

- [1] 金中初等, 1978. 艾姆斯(Ames)试验在检测化学致癌物上的应用. 浙江医科大学学报, 7(3):29-33.
- [2] 赵寿元等, 1979. 鼠伤寒沙门氏菌/微粒体系统检测三十六种化学物质的诱变性试验. 实验生物学报, 12(1): 41-49.
- [3] 张纪忠等, 1980. 微生物诱变试验快速检测真菌致病性的研究. 实验生物学报, 13(2):185-191.
- [4] Lijinsky, W. and Shubik, P., 1965. The detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke and some foods. *Toxicol. and Applied Pharmacology*, 7:337-343.
- [5] Commoner, B., et al., 1978. Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science*, 201:913-916.
- [6] Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S. and Ohamoto, H., 1977. Mutagenic activity of amino acid pyrolyzates in Salmonella-typhimurium TA 98. *Mutation Res.*, 48:278-286.
- [7] Sugimura, T., 1978. Let be scientific about the problem of mutagens in cooked food. *Mutation Res.*, 55:49-152.
- [8] Shubik, P., 1979. Food additives (natural and synthetic). *Cancer*, 43(5):1982-1986.
- [9] Ames, B. N. & McCann, J., 1976. Carcinogens are mutagens: A simple test system. Screening test in Chemical Carcinogenesis, by Montesano R. IARC Scientific Publ., No. 12, Lyon, 2: 493-504.
- [10] Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31: 347-364.
- [11] Ames, B. N., 1976. Carcinogenicity test. *Science*, 191:241-244
- [12] McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72:195-200.
- [13] Bridgen, B. A., 1976. Short term screening test for carcinogens. *Nature*, 261,195-200.
- [14] Venitt, S., 1980. Bacterial mutation as an indicator of carcinogenicity British medical Bulletin, 36(1):57-62.
- [15] Ames, B. N., 1979. Identifying enviromental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204: No.4393,587-593

A STUDY ON THE DETECTION OF CAUSING MUTATION FROM CANNED FISH

Xu Weiqun

(Shanghai Fisheries College)

Xu Guanxiang

(Department of chemical Carcinogen, Shanghai Cancer Institute)

Abstract

Five different kinds of canned fish were tested on petri plates with two specially constructed mutants of *Salmonella typhimurium*——TA98 and TA100(Ames Test).

Mutagenic activity was detected in the smoked fish of the five samples. It showed that this processed fish contained base-pair substitution mutagens which required metabolic activation.

The smoked fish which was clearly positive in the test should be considered as potential human health hazards, and should be thoroughly tested in animal systems. These studies have shown that the smoked fish might possibly present traces of polycyclic aromatic hydrocarbons.