

正烷酵母饵料致突变性的研究

徐冠雄 许为群

(上海肿瘤研究所) (上海水产学院)

提 要

本试验用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型——哺乳动物肝微粒体酶测试系统(Ames' Test),对正烷酵母饵料浸出液的非极性树脂 XAD-2 吸附物进行检测,以查明其是否具有致突变或致癌作用。结果表明,正烷酵母对菌株 TA98 及 TA100 有致突变作用,由此证明这种饵料中存在着引起 DNA 移码突变和碱基对置换突变的化合物,故这种酵母在被用作鱼类饵料或其他动物饲料之前,还应作进一步研究,防止其对环境的污染和其他潜在的危害性。

前 言

正烷酵母(N-Paraffin Yeast),曾有报道认为可用作鱼类饵料^[1],但我们认为其安全性及对环境污染的可能性尚未作出严格的检验,难以作出定论。为此,我们专门进行了正烷酵母的致突变性(致癌性)研究,并由此来评价正烷酵母用作饵料时,对鱼类、牲畜和人类可产发生的直接或间接危害作用。

材 料 和 方 法

1. 样品的处理

(1) 非极性树脂 XAD-2 层析柱的处理^[2,6] 称取非极性树脂 XAD-2 0.7g,分别用 10ml 的丙酮、甲醇和无离子水,作多次旋转和倾倒式洗涤。将洗净的非极性树脂 XAD-2 装入 0.7 × 1.0 cm (内径)的玻璃层析柱内,树脂高度为 4 cm,柱床体积为 1.5 cm³。加样品前再用 50 ml 无菌无离子水洗涤一次。

(2) 样品浓缩处理 取正烷酵母饵料干粉 5g,用 50 ml 无离子水浸泡一天。再用于冰速冻并置于 55°C 恒温水浴中速溶,如此反复三次。用滤纸过滤,滤液徐徐加入树脂层析柱中,流速控制在 1 ml/min,使浸出液中的非极性致突变物(致癌物)充分被吸附于层析柱上。然后用 10 ml 丙酮溶液,以用样流速洗脱解析所吸附的浓缩物,将洗脱液在 60°C 条件下充氮挥干,加 5 ml 二甲基亚砷(DMSO)溶解,备用。

(3) 非极性树脂 XAD-2 层析柱的特性试验 为检验层析柱的吸附性能, 将具有致突变性的 *N*-甲基-*N*-硝基胍(NTG 或 MNNG) 50 μg , 按上述样品通过层析柱的方法进行处理, 经充氮挥干后, 加 1 ml 二甲基亚砷, 作为致突变检测的阳性对照剂。

2. 正烷酵母致突变检测^[4,5]

(1) 菌株鉴定 用鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型突变菌株, 并带有 R 因子的 TA-98 和 TA-100 作为测试菌株。菌株先经过加少量组氨酸试验、自发回变试验、切除修复系统缺失(UVrB)、脂多糖屏障丢失(*rfa*)、抗氨基青霉素等试验作为鉴定菌种的标准。测试前菌种接种在肉汤培养基中, 37°C 培养 16 小时, 经培养后的细胞悬液, 作致突变检测用。

(2) S-9 混合液的制备 按 Ames 等人^[5]的方法制备 9000 g 肝匀浆悬液; 取雄性大白鼠(200g 左右), 用玉米油稀释多氯联苯(Aroclor 1254), 以 500 mg/kg 诱导 5 天后取肝, 制成匀浆, 再作 9000g 离心, 取上清液制成 S-9, 液氮速冻保藏。另加入代谢活化系统, 即在 S-9 中加入一些辅助因子(TPNH 生成系统) 组成 S-9 混合液。使 1 ml 的 S-9 混合液中, 含有 S-9 0.3 ml、MgCl₂ 8 μmol 、KCl 33 μmol 、G-6-P 5 μmol 、NADP 4 μmol 和 pH 为 7.4 的磷酸缓冲液 100 μmol 。测试时 S-9 混合液的用量为每皿 0.2 ml (约合 S-9 40 μml)。S-9 混合液需在临用前配制。

(3) 致突变检测 每皿加底层培养基 V-B 低培养液 15 ml, 待凝固后取 2 ml 上层培养基加 0.1 ml 菌液和正烷酵母样品 0.01—0.5 ml, 再加 S-9 混合液 0.2 ml (或不加 S-9 混合液) 一并倒入上层培养基上, 待凝后, 置于 37°C 培养 48 小时, 计算回复突变菌落数。

除突变菌株自发回变试验和菌液加 S-9 作阴性对照外, 其他所有对照组都不加待检样品溶液。另外, 采用 NTG 或 MNNG 不加 S-9 和黄曲霉毒素(AFT)B₁ 加 S-9 作阳性对照, 及检验非极性树脂 XAB-2 吸附已知致突变物 NTG 的特性对照。

待检样品中, 凡引起回复突变菌落数超过自发回变数 2.5 倍以上者, 为致突变阳性。

试验结果

正烷酵母在致突变检测时加入 S-9 代谢活化系统后, 受试菌株 TA98 和 TA100, 均呈致突变阳性反应(见表 1)

表 1 正烷酵母及对照组致突变定性检测结果

受试物名称	测试浓度 ml/皿	-S-9		+S-9	
		TA98	TA100	TA98	TA100
正烷酵母 XAD-2 浓缩	0.01-0.5	-	-	+	+
NTG XAD-2 浓缩	0.1(50 μg)	-	+		
NTG 阳性对照	0.1(50 μg)	-	+		
AFT B ₁ 阳性对照	0.25(0.25 μg)	-	-	+	+
自发回变阴性对照		-	-	-	-

在测试浓度范围内,TA98 和 TA 100 的每皿回复突变的菌落数的平均值都成倍超过阴性对照组(见表 2)。

表 2 正烷酵母致突变效应定量检测结果

测试菌株	实 验 组		阳 性 对 照 组			阴性对照组
	每皿含量 ml	回变菌落数 + S-9(40 μ l)	NTG 50 μ g/皿 - S-9	NTGXAD-2 50 μ g/皿 - S-9	AFTB ₁ 0.25 μ g/皿 + S-9	自发回变
TA98	0.01	90 \pm 6				51 \pm 7
	0.05	128 \pm 24				
	0.1	342 \pm 73				
	0.2	1048 \pm 106	-	-	1215 \pm 188	
	0.3	1688 \pm 215				
	0.4	595 \pm 116				
	0.5	518 \pm 94				
TA100	0.01	172 \pm 19				163 \pm 13
	0.05	504 \pm 56				
	0.1	1149 \pm 126				
	0.2	1816 \pm 92	1348 \pm 112	1068 \pm 242	2041 \pm 208	
	0.3	2273 \pm 118				
	0.4	365 \pm 25				
	0.5	472 \pm 76				

菌落在显微镜下观察,有明显的生长背景(图 1),故确定其为致突变阳性。
根据测试浓度变化范围的回变菌落数平均值画出致突变剂量效应曲线(图 2)。

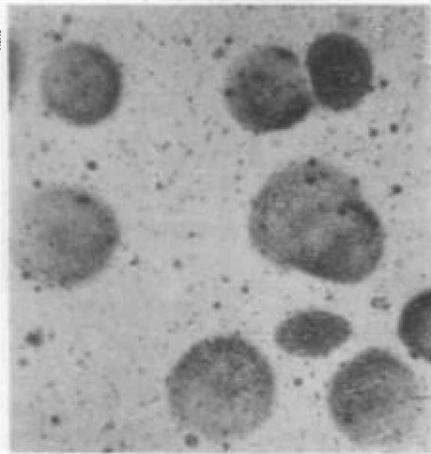


图 1 菌落与生长背景 $\times 40$

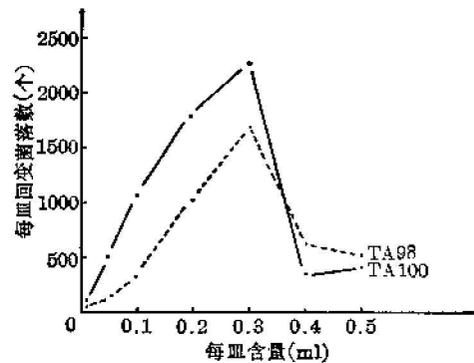


图 2 正烷酵母浓缩液致突变剂量效应曲线

讨 论

非极性树脂 XAD-2 (Amberlite XAD TYPE 2) 是一种大网状多孔中性非极性苯乙烯-二乙烯苯聚合物。它具有从极性溶剂中吸附非极性或部分弱极性共存物的特性,使亲水性强的电解质如无机盐类等可以无阻地经树脂流出。组氨酸在中性溶液中带正电荷,故吸附甚少,甚至不被吸附。而被吸附在树脂表面的致突变物,一旦与适宜的溶液接触,即从树脂孔隙中迅速扩散并得到解析分离。实验用非极性树脂 XAD-2 层析柱排除组氨酸对致突变物检测有干扰的物质,可达到满意的结果。

这种非极性树脂 XAD-2 适用于水状液体作致突变物(致癌物)的体外检测;可用于在提取大量淡水或海水中的微量化学致突变物(致癌物),其作用在于浓缩提纯样品,排除在致突变检测中的干扰因子。本方法简便、有效,可用于渔业环境化学致突变物(致癌物)的检测。

化学物质的致癌作用,具有生物物种的特异性^[9]。因此一般来说,由本检测系统鉴定为阳性反应的化学物质,就具有致突变(致癌)作用的可能。正烷酵母作为鱼类饵料或动物饲料蛋白源,为确保其安全性,应进一步用多种检测系统鉴定。

参 考 文 献

- [1] 汪锡钧等,1981。正烷酵母饲养鲤鱼的试验。水产学报,5(3):253—261。
- [2] 胡永宁等,1981。尿中致变物的分离及尿致变性测试方法。肿瘤,1(3):10—14。
- [3] 许为群等,1981。水产罐头食品致变性的研究。水产学报,5(3):229—334。
- [4] Ashby, J. & Styles, J. A., 1978. Does carcinogenic potency correlate with mutagenic potency in the Ames assay. *Nature*, 271: 452—455.
- [5] Ames, B. N. et al. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31:347—364.
- [6] Yamasaki, E. & Ames, B. N., 1977. Concentration of mutagens from urine by absorption with the nonpolar resin XAD-2: cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 3555—3559.

MUTAGENICITY OF A FISH FOOD N-PARAFFIN YEAST

Xu Guanxiong

(Department of Chemical Carcinogen, Shanghai Cancer Institute)

Xu Weiqun

(Shanghai Fisheries College)

Abstract

Materials in the experiments were prepared by absorbing the extracts of fish food N-Paraffin yeast. They were tested for mutagenic properties by using the Salmonella

Typhimurium/microsomal test system. Mutagenic activity was detected in the prepared N-Paraffin yeast materials. It reveals that this fish food may contain the compound of frameshift and base-pair substitution mutagens. It required metabolic activations.

Therefore great care should be taken in using this yeast as the food of fish or other animals in order to avoid the potential harmfulness.