

用 umuC 测试水中遗传毒性效应的样品前处理方法

顾炜¹, 胡建英^{1*}, 王伟¹, 刘燕花¹, 何文杰², 韩宏大²

(1. 北京大学环境学院, 北京 100871; 2. 天津市自来水集团有限公司, 天津 300040)

摘要: umuC 实验是用于检测物质致癌、致突变性的一种有效方法. 本文将化学物质暴露阶段的温度细化为 37 ℃, 获得最佳灵敏度. 以北方某自来水管网的自来水为对象, 研究前处理方法对遗传毒性诱导效应的影响, 发现以 Oasis HLB 固相萃取柱为浓缩柱, 丙酮为洗脱溶剂的样品前处理方法显示出最高的遗传毒性诱导效应. 对上述自来水管网不同工艺过程出水的遗传毒性进行检测, 结果表明氯消毒过程促进遗传毒性的诱导.

关键词: umuC 实验; 遗传毒性; 前处理方法; 饮用水

中图分类号: X832 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)03-0122-04

Improvement of Concentration Method for Detecting Genotoxic Activities of Drinking Water Using umuC-Test

GU Wei-min¹, HU Jian-ying¹, WANG Wei¹, LIU Yan-hua¹, HE Wen-jie², HAN Hong-da²

(1. College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Tianjin Water Supply Ltd. Company, Tianjin 300040, China)

Abstract: umuC-test is an effective method to determine the genotoxic activity. In this study, the highest genotoxic activity was found exactly at 37 ℃ by modifying original condition of umuC test. Effects of concentration methods on the genotoxic activity was studied, and it was found that the HLB solid phase extraction is most effective to extract the genotoxic chemicals from a drinking water when using acetone as eluant. The fate of genotoxic activity in drinking water treatment process was also studied, and chlorination promoted the induction of genotoxic activity.

Key words: umuC-test; genotoxicity; concentration method; drinking water

免疫学研究表明, 一些化学物质如饮用水消毒副产物与肿瘤的出现密切相关^[1]. 环境中此类物质的残留增加了肿瘤出现的概率, 减低生物的繁殖成功率^[2]. 许多文献证明基因突变在肿瘤形成过程中起了很重要的作用, 而绝大多数的致癌物质则会损伤 DNA^[3]. 基于上述原理, 目前已开发了 50 多种遗传毒性的短期监测方法^[4], Ames 检测法^[5]和 SOS 显色反应检测法是其中较为成熟, 应用广泛的 2 种测试方法.

SOS 显色反应是由 Quillardet 等于 1982 年首先提出的^[6], 使用 *sfIA'-lacZ* 融合基因的 SOS 显色检测法弥补了 Ames 实验需要使用多种菌株的缺点^[7]. 在此基础上, 1985 年由 Oda 等根据 DNA 损伤诱导 SOS 反应而表达 umuC 基因这一基本原理建立了 umuC 测试法. umuC 测试法由于实验周期短 (一般为 5~6h), 对试验的无菌操作要求低, 样品量少等优点而得到关注^[8~11]. 但是由于环境中遗传毒性物质的浓度低, 成分复杂, 因此在将 umuC 检测法应用到环境水样检测时, 水样的前处理是一个关键问题.

本论文对文献报道的 umuC 测试方法进行优

化的前提下, 建立了适合北方某水厂饮用水中微量遗传毒性的固相萃取样品前处理方法后, 对饮用水处理工艺过程中遗传毒性的行为进行了研究.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) 用作阳性对照; 二甲基亚砜 (ACS 级, 美国 AMRESCO) 为稀释溶剂和阴性对照; 显色剂 *o*-nitrophenol-D-galactopyranoside (ONPG, 东京化成); 十二烷基磺酸钠 (SDS); Luria-Bertani (L-B) broth (美国, DIFCO); Tryptone (OXIOD); 水浴震荡器; BIO-RAD 550 酶标仪; Nunc 96 孔 2 条可拆酶标板; 二氯甲烷、甲醇、丙酮 (均为 HPLC 级, 购自 Fisher, Co., USA), Sep-pack C18 (1g, 6mL)、OASIS HLB 固相萃取柱 (500mg, 6mL) 购自 Waters, 玻璃纤维滤纸 (GF/A,

收稿日期: 2004-06-09; 修订日期: 2004-09-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA601140-6); 国家自然科学基金资助项目 (40021101)

作者简介: 顾炜文 (1980~), 女, 硕士生, 主要研究方向为环境毒理学.

* 通讯联系人 email: hujy@urban.pku.edu.cn

Whatman 公司)。

1.2 *umuC* 实验方法

实验方法基本上根据文献^[12]报道。取 40 μ L 冷冻 *Salmonella typhimurium* TA1535/PSK1002 菌液于含有 50mg/L 氨比西林的 L-B 培养基中,在 30 的条件下振荡 (175r/min) 隔夜培养 16h。次日将前夜培养菌液用 TGA 培养液 (10g 胰蛋白胨,5g 氯化钠溶解于 980mL 超纯水中后高压灭菌后加入 20mL 10% 葡萄糖溶液后得到) 100 倍稀释后 37 条件下振荡 (175r/min) 培养 2h (前培养)。取前培养菌液 300 μ L 加入 3mL 试管中,再添加 3 μ L 样品的 DMSO 溶液振荡摇匀,37 振荡 (175r/min) 培养 2h。移取 150 μ L 上述培养液于酶标板 (96 孔) 中,于 595nm 波长下测定菌液的吸光度值。另取 100 μ L 反应菌液加入 1mL α -buffer 溶液 (0.06mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.04mol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01mol/L 的 KCl, 0.001mol/L 的 MgSO_4 , 0.05mol/L 的 β -巯基乙醇以及 1L 水溶解后得到), 50 μ L SDS 溶液 (0.01%), 10 μ L 三氯甲烷,振荡摇匀,加入含 6mg \cdot mL⁻¹ ONPG 的缓冲溶液 (0.1 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 KH_2PO_4) 200 μ L 于上述溶液中,于 30 条件下静置反应 20min,加入 500 μ L 的 1mol/L/L 的 Na_2CO_3 溶液停止反应,吸取上清液 150 μ L 于 96 孔酶标板中,分别于 415nm 和 570nm 波长下测定吸光度值。用下式计算 β -半乳糖苷酶诱导活性:

$$-\text{Galactosidase Activity (Units/OD}_{600}) =$$

$$1000 \times (A_{415} - 1.75 \times A_{570}) / (t \times v \times A_{595})$$

其中, t 为加入 ONPG 后的反应时间 (本例中为 20min); v 为反应菌液在显色过程中的稀释倍率 (本例中为 0.09); A_{595} 、 A_{415} 、 A_{570} 为吸光度值。

本文中的 β -Galactosidase Activity (unit/OD₆₀₀) 值为原始计算值减去阴性空白,各实验数据的重复测定次数均为 2 次。

1.3 前处理方法

采集北方某水厂管网水,用于样品浓缩效果的评价。取 2L 水样,用玻璃纤维滤纸过滤,过 HLB 柱固相萃取。HLB 柱首先用 6mL 甲醇、6mL 超纯水活化。水样以 10mL/min 的流速通过活化好的固相萃取柱。水样全部通过后,用氮气吹干固相萃取柱。吹干后的固相萃取柱用 8mL 溶剂洗脱。洗脱液在微弱的氮气流下吹干,用 DMSO 定容至 20 μ L。

使用 C₁₈ 柱处理样品时,活化和上样方法与 HLB 柱相似。

2 结果和讨论

2.1 *umuC* 测试方法的优化

为了获得高灵敏度,重复性好的 *umuC* 测试结果,本研究针对整个实验过程的关键步骤中的温度条件对遗传毒性诱导的影响进行了研究。

在菌株进行化学物质暴露前,需要对菌液进行隔夜培养。文献^[13]已经表明在 37 \pm 1 条件下,振荡培养 12h 的条件下,*umuC* 测试的灵敏度最高;振荡培养时间过长,常常会影响遗传活性的诱导。但是,由于这一操作都在夜间进行 (以下称隔夜培养),给第 2d 的实验带来了不便。因此,本实验将隔夜培养条件改为 30 条件,这样即使振荡培养时间延长到 16 ~ 18h,也没有发现遗传毒性诱导灵敏度的降低。

图 1 表示了化学物质暴露阶段,温度对 4-NQO 诱导遗传毒性的影响。从图 1 可知,在暴露温度 37 的条件下,显示出最高的遗传毒性;但在 38 温度下暴露时,发现 4-NQO 的诱导活性有了很大地降低。在 4-NQO 浓度为 5mg/L 时,其诱导活性仅为 37 时活性的 1/3。当温度降低到 36 时,在相同浓度下的诱导活性略低于 37 时的活性。许多文献通常采用的温度为 37 \pm 1。而笔者的结果表明,由于温度对遗传毒性的诱导有很大的影响,需要严格控制暴露温度。这样不仅灵敏度得到提高,而且还能保证实验结果有很好的重复性。

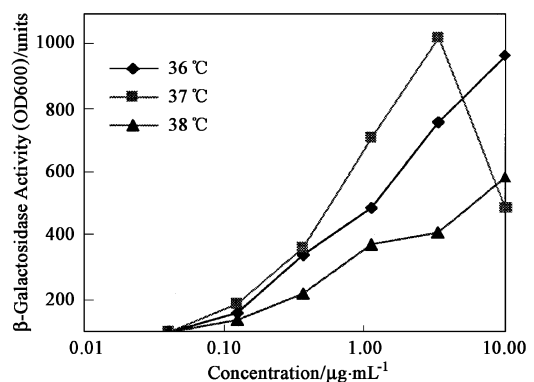


图 1 4-NQO 暴露温度对遗传毒性诱导活性的影响

Fig. 1 Effects of temperature for exposure on the genotoxic activities

2.2 样品前处理

在对 *umuC* 测试方法进行优化后,为了监测自来水中的遗传毒性,本实验对其前处理方法进行了研究。本文采用对有机物吸附性能不同的 C₁₈ 柱和 HLB 固相萃取柱,研究了浓缩萃取柱及洗脱溶剂对

遗传毒性测试灵敏度的影响. HLB 固相萃取柱由于采用了高分子聚合物作为吸附剂,和 C_{18} 固相萃取柱相比,对极性有机物质也有很好的吸附性能.

2.2.1 HLB 固相萃取柱

本研究首先采用了 Oasis HLB 固相萃取柱对水样进行浓缩. 分别选用 4 种极性不同的有机溶剂 [甲醇, 丙酮, 二氯甲烷, 甲醇/ 丙酮 (2:8)] 洗脱吸附于 HLB 固相萃取柱上的致突变物质, 将获得的 4 个馏分分别用氮气吹干, 用 DMSO 定容到 $20\mu\text{L}$ 后, 供遗传毒性测试.

图 2 表示了不同洗脱溶剂对遗传毒性诱导效果的影响. 从图中可以发现, 用甲醇洗脱时, 到水样添加到 10mL 时, 开始出现活性, 但是到水样体积增加到 100mL 时, 活性急剧降低. 这主要是由于急性毒性抑制了菌株的繁殖造成的. 改变洗脱溶剂为二氯甲烷时, 发现在较高的水样体积 (75mL) 下, 才开始出现活性; 然后随着水样添加量的增加而增加, 直到水样添加量增加到 300mL 也没有发现急性毒性. 这一结果表明, 二氯甲烷作为洗脱溶剂时, 虽然对遗传毒性物质的洗脱效果明显不如甲醇, 同时也减少了洗脱液中急性毒性物质.

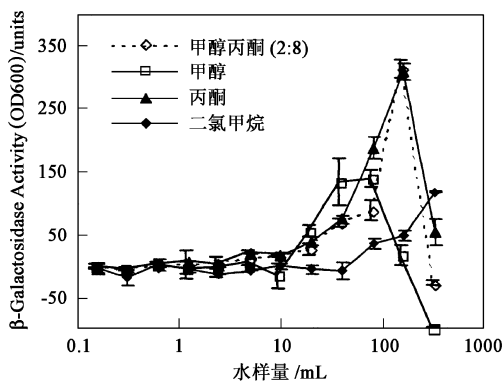


图 2 不同溶剂洗脱液的剂量-效应曲线
(HLB 固相萃取柱浓缩水样)

Fig. 2 Effects of eluants on the dose-response of extracts upon using HLB SPE

鉴于以上结果, 选择了极性介于甲醇和二氯甲烷的丙酮作为洗脱溶剂, 并测试了其遗传毒性. 如图 2 所示, 丙酮洗脱液也在较低的水样添加量的情况下, 显示出遗传毒性, 和甲醇相仿; 而且随着水样添加量增加到 120mL 时, 显示出较高的活性, 是甲醇洗脱液最高活性的 2 倍以上. 在水样添加量增加到 150mL 时, 同样显示出极强的急性毒性. 为了进一步研究洗脱溶剂的极性对遗传毒性诱导的影响, 本

研究还尝试了用丙酮/ 甲醇 (8:2) 混合溶液进行洗脱, 结果发现和丙酮洗脱的结果非常相似.

2.2.2 C_{18} 固相萃取柱

为了研究不同固相萃取柱对遗传毒性浓缩效果的影响, 本研究还进一步尝试了 C_{18} 固相萃取柱对同样的管网水样品进行浓缩. 洗脱溶剂选用 HLB 柱洗脱效果比较理想的丙酮和甲醇. 所得 2 个馏分用氮气吹干, DMSO 定容至 $20\mu\text{L}$.

图 3 表示了上述 2 种萃取液的剂量-效应曲线. 从图中可以发现, 甲醇洗脱液在水样体积为 75 mL 时出现活性, 活性随水样量增加而上升, 直到水样添加量到达 300mL 时, 其诱导活性达到了基值的 2.3 倍.

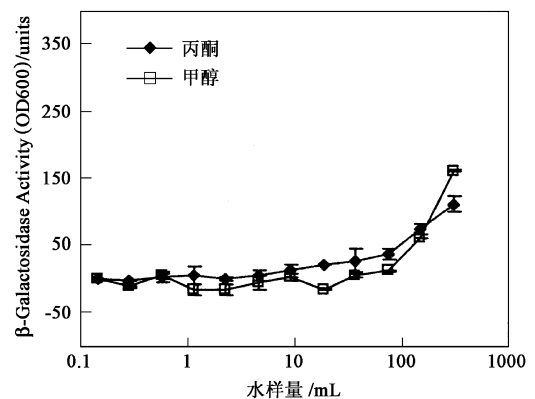


图 3 不同溶剂洗脱液的剂量-效应曲线
(C_{18} 固相萃取柱浓缩水样)

Fig. 3 Effects of eluants on the dose-response of extracts upon using C_{18} SPE

改变用丙酮溶剂洗脱时, 结果与甲醇作为溶剂洗脱的结果较为相似, 但丙酮的洗脱的灵敏度更高一些, 其洗脱液在较低的水样添加量 (为 10mL) 时, 即显示了遗传毒性效应. 活性随水样量的增加缓慢上升, 直到添加量为 300mL 时, 活性也达到基值的 2 倍左右.

综上所述, 选用 HLB 作为浓缩柱, 丙酮作为洗脱溶剂的样品前处理方法灵敏度最高.

2.3 遗传毒性在饮用水处理中的行为研究

通过优化 *umuC* 测试方法, 并用以上建立的样品前处理方法, 对北方某水厂各处理工艺流程出水的遗传毒性进行了测试.

5 个工艺流程采样点分别为未经过任何处理的水源水 (原水); 原水加前氯处理后的水 (前氯); 絮凝沉淀处理水 (沉淀); 过滤消毒后的出厂水 (后氯) 和用户末端水 (管网水).

结果如图 4 所示. 结果发现原水的遗传毒性较弱, 在水样添加量为 75mL 时才开始表现出微弱的遗传毒性, 活性最高值为空白的 1.6 倍. 而前氯最低响应水样量仅为 18mL 左右, 随着水样量的增加, 活性急剧上升, 在水样量为 300mL 时, 活性达到空白的 2.5 倍, 原水的 2 倍, 其遗传毒性效应是 5 个采样点中最强的. 沉淀的最低响应水样量为 40mL 左右, 在 75mL 时遗传毒性效应达到最高, 为空白对照的 1.5 倍, 强度与原水相似, 但在水样量为 150mL 时表现出了极强的急性毒性. 后氯和管网水的剂量-效应曲线与前氯较为相似, 均在 20mL 水样量时表现出活性.

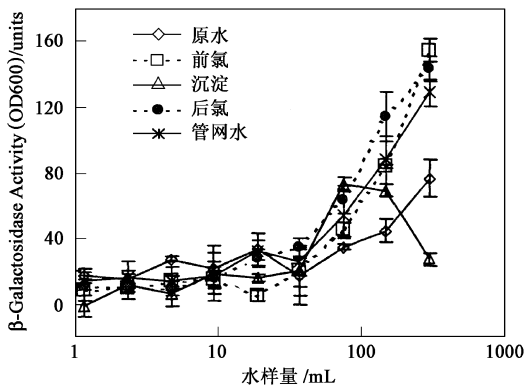


图 4 某北方水厂 9 月各工艺单元出水的遗传毒性剂量-效应曲线

Fig. 4 Dose-response curves of genotoxic activity of treated water during a drinking water treatment work

3 结论

研究表明除了 *umuC* 实验的条件以外, 样品前处理是保证 *umuC* 测试水样时获得高灵敏度的必要条件, 而对实际水厂不同工艺过程中遗传毒性的监测结果表明, 氯消毒增加遗传毒性. 鉴于 *umuC* 实验的快速和灵敏性, 有望在饮用水水质评价上得到广泛的应用.

参考文献:

- [1] Griffith J, Riggan W B. Cancer mortality in U. S. counties with hazardous waste sites and ground water pollution [J]. Arch. Environ. Health, 1989, **44**:89 ~ 74
- [2] Anderson S L, Harrison F L. Predicting the ecological signifi-

cance of exposure to genotoxic substances in aquatic organisms [A]. In: Sandhu S S, et al. In Situ Evaluation of the Biological Hazards of Environmental Pollutants [C]. New York: Plenum Press, 1990. 81 ~ 93.

- [3] Ames B M, W E Durston, E Yamasaki, F D Lee. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A), 1973, **70**:2281 ~ 2285.
- [4] Christoph Helma, Volker Mersch-Cundermann. Comparative evaluation of four bacterial assays for the detection of genotoxic effects in the dissolved water phases of aqueous matrices [J]. Environ. Sci. Technol., 1996, **30**:897 ~ 907.
- [5] Ames B N, J McCann, E Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian microsome mutagenicity test [J]. Mutation Res., 1975, **31**:347 ~ 364.
- [6] Quillardet P, Huisman O, D 'Ari R, Hofnung M. SOS chromotest a direct assay of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 1982, **79**:5971 ~ 5975.
- [7] Oda Y, S Nakamura, I Oki, T Kato, H Shinagawa. Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens [J]. Mutation Res., 1985, **147**:219 ~ 229.
- [8] A E McDaniels, A I Reyes, L J Wymer, C C Rankin, G N Stelma. Comparison of the *Salmonella* (Ames) tests, and the SOS chromotests for detecting genotoxins [J]. Environ. Mol. Mutagen., 1990, **16**, 204 ~ 215.
- [9] F Guliani, T Koller, F E W ügler, R M Widmer. Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the *umuC* test [J]. Mutation Res., 1996, **368**:49 ~ 57.
- [10] W Z Whong, Y F Wen, J Stewart, T O g. Validation of the SOS/ *umu*-test with mutagenic complex mixtures [J]. Mutation Res., 1986, **175**: 139 ~ 144.
- [11] Reifferscheid G, Heil J. Validation of the SOS/ *umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data [J]. Mutation Res., 1996, **369**: 129 ~ 145.
- [12] G Reifferscheid, J Heil, Y Oda, R K Zahn. Amicroplate version of the SOS/UMU-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples [J]. Mutation Res., 1991, **253**, 215 ~ 222.
- [13] International Organization for Standardization. Water quality-Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *umu*-test [S]. Genf Switzerland:ISO/ CD 13829, 2000.