

uvrA 基因对 SOS 显色法检测遗传毒物的影响

陈中孚 冯 霄* 盛祖嘉

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

用 SOS 显色法对 45 种化学物质(包括致癌物质、抗癌药物、碱基衍生物、代谢抑制物、食品添加剂和含铬废水)进行遗传毒性检测。分别用大肠杆菌的 *uvrA*⁻ 菌株 PQ37 和 *uvrA*⁺ 菌株 GC 4415 作为测试菌株以考察 *uvrA* 基因对 SOS 显色法检测遗传毒性灵敏度的影响。带有 *uvrA* 突变的菌株 PQ37 比较灵敏, 不带 *uvrA* 突变的菌株 GC 4415 测不出消癌芥、吡啶黄和 SIPI 系列化合物的遗传毒性。但在实验中也观察到某些化合物诸如丝裂霉素 C、噻啶酮酸、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶和 5-溴脱氧尿苷等诱导菌株 PQ37 的 SOS 应答的能力反而低。已知某些化学物质诱导 SOS 应答的能力部分取决于 *uvrA* 基因产物的存在, 因此应使用带有 *uvrA* 突变和不带 *uvrA* 突变的菌株来进行 SOS 的显色测定。

关键词 SOS 显色法; 遗传毒物的检测; *uvrA* 基因

能诱导细菌产生 SOS 应答的物质一般都有致癌作用^[1]。最近 Hofnung 等应用操纵子融合的方法使噬菌体 Mud1 (*Ap*, *lacZ*) 整合到大肠杆菌染色体上参与 SOS 应答的 *sulA* (又名 *sfiA*) 基因中, 使缺少启动区但编码 β -半乳糖苷酶的 *lacZ* 基因处于 *sulA* 基因的操纵基因的控制下, 构建成测试菌株 PQ 37, 通过用比色法测定 PQ37 细胞中 β -半乳糖苷酶的酶活力就可以直接检测出待测物质是否为遗传毒物。这种方法被命名为 SOS 显色法 (SOS chromotest)^[2]。

SOS 显色法是迄今为止最快速简便的检测遗传毒物的方法, 其灵敏度与 Ames 的诱变检测法 (Mutatest) 相当, 而专一性和精确性则超过诱变检测法^[3]。此外, 它还具有下列优点: 可以直接对成份复杂的液体如体液和具有杀菌作用的药物进行检测, 而且能排除 Ames 的诱变检测法在作为检测潜在致癌物质方法时出现的假阳性结果。这种方法也可能被用于筛查抗突变和抗致癌的物质。由于丝裂霉素 C 对带有 *uvrA* 突变的大肠杆菌和沙门氏菌没有诱

变作用^[4,5], 而且要在较高的剂量时才能诱导带有 *uvrA* 突变的大肠杆菌产生 SOS 应答^[2], 为此我们采用了另一株不带 *uvrA* 突变的菌株 GC 4415 和带有 *uvrA* 突变的菌株 PQ37 对 45 种化学物质(包括致癌物质、抗癌物质、碱基衍生物、代谢抑制物、食品添加剂和含铬废水等)同时进行检测, 以研究 *uvrA* 突变对 SOS 显色法灵敏度的影响。

材料和方法

(一) 菌株

实验室用的大肠杆菌菌株为 PQ 37 和 GC 4415。PQ 37 的基因型为: *F*⁻, *thr*, *leu*, *pyrD*, *his*, *trp::Muc*⁺, *sr1300::Tn10*, *sfiA::Mud1* (*Ap*, *lacZ*)_{cat}, *lacΔU* 169, *mal*⁺, *uvrA*, *galE*, *galY*, *PhoC*, *rfa*, *rpsL*; GC 4415 的基因型为: *F*⁻, *thr*, *leu*, *his*, *pyrD*, *gal*, *malB*, *lacΔU* 169, *sr1300::*

本文于 1986 年 11 月 24 日收到。

承国家医药管理局上海医药工业研究院张椿年教授提供 SIPI 系列药品; 上海劳动职业病防治研究所提供 S₂ 微粒体原液; 上海第十二制药厂提供消癌芥等药品, 谨致谢意!

• 复旦大学生物系遗传学专业八二级学生。

Tn10, *rpsL*, *salA*::Mud1 (*Ap*, *lacZ*)_{cit}, *trp*::Muc⁺。

这两株菌株的主要差别是 PQ 37 带有 *uvrA* 和 *rfa* 突变, 菌株 PQ37 系法国的 M. Hofnung 博士所赠; 菌株 GC 4415 系法国的 R. D'Ari 博士所赠。

(二) 培养基

(1) LB 培养液: 蛋白胨 (大五荣养化学株式会社): 10g, 酵母抽提物 (Oxoid) 5g, NaCl 5g, 加蒸馏水 1000ml, 自然 pH。配制固体培养基时每 1000ml 中加 20g 琼脂。

(2) LBA 培养液: 每 1000ml 已灭菌的 LB 培养液中加入氨基青霉素 20mg。

(3) 5 × LB 培养液: 蛋白胨 50g, 酵母抽提物 25g, NaCl 25g, 加蒸馏水至 1000 ml, 自然 pH。

(三) SOS 显色测试用的缓冲液和试剂

(1) B 缓冲液: Na₂HPO₄ · 12H₂O 40.6g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 6.2g, KCl 0.75g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25g, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 1g, β-巯基乙醇 2.7ml, 加蒸馏水至 1000ml, pH7.0。

(2) 邻硝基苯-β-D-半乳糖苷 (ONPG) 溶液 (3mg/ml): 300mg ONPG 溶于 100ml B 缓冲液中。

(3) 反应终止液: 10% Na₂CO₃ (10g Na₂CO₃ 溶于 100ml 的蒸馏水中)。

(4) 溶剂: 一般将待测物溶于 0.8% NaCl · 10% 二甲亚砜 (DMSO) 溶液中。个别待测物溶于二甲亚砜或 95% 乙醇中。

(四) 大鼠肝匀浆 S₁ 混合液

S₁ 微粒体系从经过 Aroclor 1254 处理的大鼠肝脏匀浆中提取的。S₁ 混合液由 1 份 S₁ 微粒体原液加 3 份使用液混合而成。使用液的组成为: 1.65mol/L KCl 和 0.4mol/L MgCl₂ 的混合液 0.2ml, 0.5 mol/L 葡萄糖-6-磷酸 0.10 ml, 0.1mol/L 辅酶 II(NADP) 0.15 ml, 0.4 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 2.5ml, 加蒸馏水定容至 2.9 ml。

(五) SOS 显色测定

按文献[5]的方法略作修改。PQ 37 和 GC 4415 分别接种于 20ml LBA 培养液中, 30℃ 静止培养过夜, 第二天按 1:10 的比例将菌液转接到新鲜的 LBA 培养液中, 37℃ 摇瓶培养约 2 h, 使

OD₄₉₂ 达 0.4 左右。

待测物以 0.8% NaCl · 10% DMSO 为溶剂按需要作 8 个 1:3 或 1:4 连续稀释, 连同原液和 0.8% NaCl · 10% DMSO 空白共 10 个不同浓度的液体分别吸取 20μl 加入到两组 10 × 12 小试管中, 然后分别加入菌液 120 μl, 充分混合后放入 37℃ 水浴中诱导 2 h。

在一组试管中分别加入 140 μl ONPG 溶液, 37℃ 水浴中显色 10 min (必要时可延长), 加 80 μl 10% Na₂CO₃ 中止反应。另一组试管中先分别加 80μl 10% Na₂CO₃ 溶液, 然后加入 140μl ONPG 溶液作为背景对照。最后分别吸取 200μl 液体于酶标免疫板中, 置 EL-307B cia-Reader (Bio-Rad 公司) 上测定 OD₄₁₁ 值, 并计算诱导系数。

为了防止阴性反应是由测试菌株或测试反应系统中成份偶而发生差错所致, 在每做一批实验中同时测定噻唑酮酸(一种 SOS 应答的强诱导物)的诱导系数作为辨别实验结果是否可靠的对照。

当待测物对菌株 PQ37 和 GC4415 的 SOS 应答的诱导系数为 1(阴性)或小于 2(阳性不明显)时, 则在测试菌株 PQ37 或 GC 4415 和待测物混合诱导反应液中加入 S₁ 混合液以观测大鼠肝脏微粒体酶系统 S₁ 对所测物质的活化作用。在已分别加入 20μl 不同浓度待测物的二组试管中分别加入 24μl 已浓缩 5 倍并悬浮于 5 × LB 培养液的菌株 PQ37 或 GC 4415 和 96μl S₁ 混合液, 充分混合后于 37℃ 震荡培养 2 h。在显色后, 3,500r/min 离心 10 min, 分别吸取 200μl 液体于酶标免疫板中置 EL-307B cia-Reader 上测定 OD₄₁₁ 值, 并计算诱导系数。

实验结果

用 SOS 显色法对 45 种不同化学物质诱导, SOS 应答的强度进行测定的结果见表 1。图 1 和图 2 是强致癌物质 NTG 和黄曲霉毒素 B1 的剂量-反应曲线, 图 3 是上海某香料厂含铬黑矾水的剂量-反应曲线。

表1 用 PQ 37 和 GC 4415 两菌株检测45种化学物质的遗传毒性的结果

Table 1. Evaluation of genotoxicity by SOS chromotest with strain PQ37 and GC4415

化学物质 Chemical	SOS 诱导系数 SOS induction factor				致癌能力 ⁽¹⁾ Carcino- genicity
	PQ37	GC4415	PQ 37 + S ₉	GC4415 + S ₉	
1. 4-NQO(4-Nitroquinoline oxide)	3.7	1.6			+
2. 消瘤芥 Nitrocaphane	4.8	2.4			
3. 吖啶黄 Acridine yellow	3.0	1.0			
4. 重氮偶兰 RR Fast blue RR salt	4.6	3.4			+
5. SIPI-40728	5.3	1.0			+
6. SIPI-40732	3.7	1.0			+
7. SIPI-40733	3.9	1.0			+
8. SIPI-40734	5.6	1.0			+
9. SIPI-40738	5.6	1.0			+
10. SIPI-40739	3.2	1.0			+
11. SIPI-40744	3.3	1.0			+
12. SIPI-40745	3.7	1.0			+
13. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguaridine	4.7	4.0			+
14. 丝裂霉素 C Mitomycin C	2.3	5.6			+
15. 萘啶酮酸 Nalidixic acid	6.7	10.8			
16. 甲氨喋呤 Methotrexat	3.6	8.2			
17. 5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil	2.0	4.2			
18. 5-溴脱氧尿苷 5-Bromodeoxyuridine	1.3	2.7			
19. 重氮尿嘧啶 Diazouracil	3.1	4.5			
20. 上海某香料厂含铬黑矾水 Chromecontaining waste water	2.4	6.4			+
21. 羟基脲 Hydroxyurea	2.3	2.6			
22. 黄曲霉毒素 B1 Aflatoxin B1	1.0	1.0	10.4	8.0	+
23. 盐酸环胞苷 Cyclocytidine-HCl	1.3	1.3	2.2	1.0	
24. 香兰素 Vanillin	1.3	1.4	2.3	1.0	
25. 阿拉伯胞苷 Arabinosyl cytosine	1.4	1.4	1.0	1.0	
26. 丙亚胺 Razoxanum	1.5	1.9	1.0	1.3	
27. 灭害净 DDT-DDVP mixture	1.9	1.1	1.6	1.0	
28. 甜醇 Ducitol	1.1	1.4	1.1	1.7	
29. 乐果 Rogor	1.0	1.3	1.0	1.0	
30. 联苯胺 Benzidine	1.0	1.0	1.0	1.0	+
31. 酸性萘酚黄 S Naphthol yellow S	1.0	1.0	1.0	1.0	
32. 除虫菊酯 Pyrethrin	1.0	1.0	1.0	1.0	
33. 香烟烟垢 Tobacco tar	1.0	1.0	1.0	1.0	
34. α-萘酚 alpha-Naphthol	1.0	1.0	1.0	1.0	
35. β-萘酚 beta-Naphthol	1.0	1.0	1.0	1.0	
36. 8-羟基喹啉 8-Hydroxyquinoline	1.0	1.0	1.0	1.0	
37. 5-氯尿嘧啶 5-Chlorouracil	1.0	1.0	1.0	1.0	
38. 2-氨基嘌呤 2-Aminopurine	1.0	1.0	1.0	1.0	
39. 8-氮鸟嘌呤 8-Azaguanine	1.0	1.0	1.0	1.0	
40. 6-氯胸腺嘧啶 6-Chlorothymine	1.0	1.0	1.0	1.0	

续表

化学物质 Chemical	SOS 诱导系数 SOS induction factor				致癌能力 ^[7] Carcino- genicity
	PQ37	GC4415	PQ 37+S ₁	GC4415 +S ₁	
41. 溴酞己烷雌酚 Hexoestrol dibromoacetate	1.0	1.0	1.0	1.0	
42. 鲨肝醇 Batyl alcohol	1.0	1.0	1.0	1.0	
43. 6-巯基嘌呤 6-Mercaptopurine	1.0	1.0	1.0	1.0	
44. 己酸孕酮 Progesterone caprouate	1.0	1.0	1.0	1.0	
45. 别嘌呤 Allopurinol	1.0	1.0	1.0	1.0	

1. SIPI 系列化合物的母核为道诺红酮,含铬黑矾水来自上海某香料厂。SIPI chemicals are analogues of daunomycinone; chromo-containing waste water was obtained from a perfumery in Shanghai.

2. SOS 诱导系数 = $\frac{OD_{415} \text{ (产生最大 } OD_{415} \text{ 值时的样品浓度)}}{OD_{415} \text{ (样品浓度为零时)}}$

(SOS induction factor = $\frac{OD_{415} \text{ (at concentration offering maximum } OD_{415} \text{ value)}}{OD_{415} \text{ (at concentration 0)}}$)

3. 剂量增加时,诱导系数可能更高。SOS induction factor maybe higher when the dose increased.

4. 道诺霉素,铬和一系列含铬化合物(如氧化铬、铬酸铬、氯化铬)都有致癌作用^[4]。Daunomycin, chrome and chromic compound such as chrome oxide, chrome chromate and chrome chloride are carcinogens^[4].

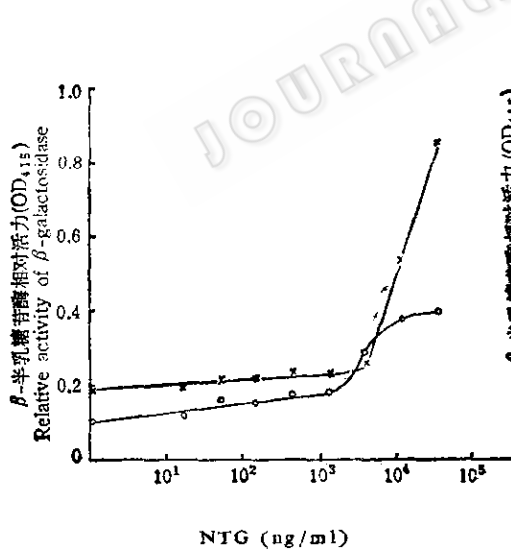


图1 NTG 诱导 SOS 应答的剂量-反应曲线

Fig. 1 Dose-SOS response curve for NTG
x-x PQ37 o-o GC4415

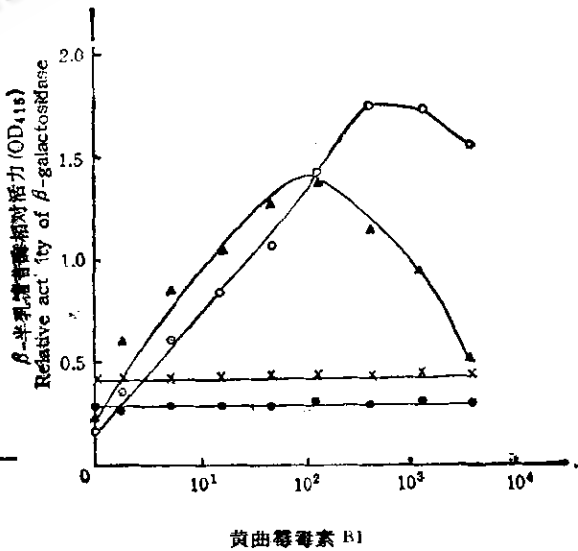


图2 黄曲霉毒素 B1 诱导 SOS 应答的剂量-反应曲线

Fig. 2 Dose-SOS response curve for Aflatoxin B1
o-o PQ37 + S₁ x-x-x PQ37
▲-▲ GC4415 + S₁ ●-●-● GC4415

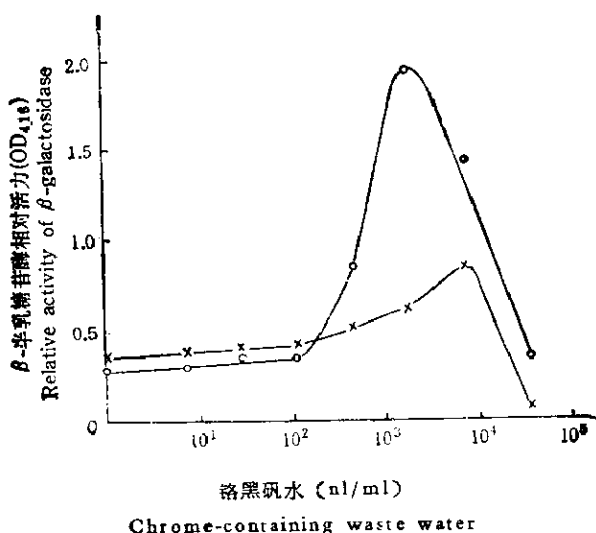


图3 上海某香料厂含铬黑矾水诱导 SOS 应答的剂量—反应曲线

Fig. 3 Dose-SOS response curve for chrome-containing waste water

x—x PQ37 o—o GC4415

讨 论

在我们实验中,采用了 GC 4415 和 PQ 37 这两株菌株,对 45 种化学物质进行了检测,比较研究了 *uvrA* 突变的存在与否对 SOS 应答强度的影响。实验表明,有一系列化学物质,诸如 4-硝基喹啉-1-氧化物 (4-NQO)、吡啶黄、SIPI 系列化合物等在用 PQ37 菌株来进行测试时都得到了阳性结果,但用 GC 4415 菌株都得到了阴性结果,消瘤芥、重氮固兰 RR、N-甲基-N'-硝基-N 亚硝基胍 (NTG) 诱导 PQ 37 菌株产生 SOS 应答的强度也比 GC 4415 菌株高。但是,象丝裂霉素 C、喹啉酮酸、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶、含铬黑矾水和重氮尿嘧啶等化学物质诱导 GC4415 菌株产生 SOS 应答的强度反而比 PQ37 菌株高,至于 5-溴脱氧尿核苷,只能诱导不带有 *uvrA* 突变的 GC 4415 菌株产生 SOS 应答。

据 Hofnung 等^[1]研究,用 PQ37 作为测试菌株进行检测,至今只有发现强致癌

物质联苯胺和环磷酰胺以及弱致癌物质二氯乙烯这三种化学物质表现出阴性结果。在我们的实验中,用 GC 4415 作为测试菌株,联苯胺同样表现出阴性结果。很可能这三种致癌物质的致癌作用并不通过 SOS 途径。

Yamamoto 等^[2]最近报道 *uvrA* 蛋白在丝裂霉素 C 诱导大肠杆菌细胞产生 SOS 应答的过程中起着控制诱导信号的作用,因而喹啉酮酸、用氨喋呤和重氮尿嘧啶等化学物质诱导大肠杆菌细胞产生 SOS 应答的能力可能和丝裂霉素 C 一样,部分取决于 *uvrA* 基因产物的存在。实验证明,在诱变检测法中使用 *uvrA*⁻ 的沙门氏菌测不出已知有诱变和致癌作用的丝裂霉素 C 有诱变作用。为了防止在 SOS 显色法出现类似的假阴性情况,有必要对所有化学物质都同时使用 GC 4415 和 PQ 37 两菌株进行检测,检测结果都为阴性或阳性不明显时再进一步用 PQ 37 + S₁ 和 GC 4415 + S₁ 来进行检测。因为对于象黄曲霉毒素 B1 一类需要代谢活化以后才表现

有致癌活性的化学物质,必须通过加 S_0 以

后才能表现出阳性结果。

参 考 文 献

- [1] Quillardet, P. et al.: *Mutation Res.*, **147**: 79—95, 1985.
 [2] ———: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 5971—5975, 1982.
 [3] Levin, D. E. et al.: *ibid.*, **79**: 7445—7449,

1982.
 [4] Murayama, I. et al.: *Mutation Res.*, **18**: 117—119, 1973.
 [5] Quillardet, P. et al.: *ibid.*, **147**: 65—78, 1985.
 [6] Palajda, M. et al.: *ibid.*, **153**: 79—134, 1985.
 [7] Yamamoto, K. et al.: *ibid.*, **149**: 297—302, 1985.

THE ROLE OF THE *UVRA* GENE IN THE SCREENING OF GENOTOXINS IN THE SOS CHROMOTEST

Chen Zhongfu Feng Xiao Sheng Zujia

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

45 different chemicals, including carcinogens, antitumor agents, base analogues, metabolite inhibitors, food additives and waste water, were screened for their genotoxicity using the SOS chromotest. *Escherichia coli* *uvrA*⁻ strain PQ37 and *uvrA*⁺ strain GC4415 were used to elucidate the role of the *uvrA* gene in the SOS chromotest. Generally, *uvrA*⁻ strain PQ37 is very sensitive in the SOS chromotest while with strain GC4415 we failed to detect the genotoxicity of nitrocapane, acridine yellow and a series of analogues of daunomycin. It has been observed that for

some chemicals, such as mitomycin C, nalidixic acid, methotrexat, the SOS inducibility of strain PQ37 is instead lower than the strain GC4415. It has been known that the ability of certain chemicals to induce SOS response depends partly on *uvrA*⁺ gene product. It is therefore preferable to use *uvrA*⁺ strain and *uvrA*⁻ strain together in the SOS chromotest for screening genotoxins as we did here.

Key words

SOS chromotest; Screening of genotoxins; *uvrA* gene