

文章编号: 1673-1689(2010)02-0298-04

用 *rpsL* 基因突变实验评价丙烯酰胺致突变性的方法初探

刘清岱, 王志伟, 安红杰, 张治洲
(天津科技大学 食品科学与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 采用 *rpsL* 基因突变实验对丙烯酰胺的致突变性进行了初步研究。实验设 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 5 个丙烯酰胺的剂量组和阴性、阳性对照组。结果发现, 丙烯酰胺剂量组的突变频率与阴性对照组相比均有显著差异, 并且有剂量效应关系, 表明丙烯酰胺可诱发 *rpsL* 位点的突变。由于 *rpsL* 突变实验自发突变背景水平低、灵敏度高, 因此 *rpsL* 突变实验有望成为食品和医药领域中致癌物快速检测的有效工具。

关键词: *rpsL* 基因突变; 丙烯酰胺; 致突变性

中图分类号: TS 201.6

文献标识码: A

Application of *rpsL* Mutation Assay for Mutagenicity with Acrylamide

LIU Qing-dai, WANG Zhi-wei, AN Hong-jie, ZHANG Zhi-zhou

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, *rpsL* mutation assay was used as model to determine the mutagenicity induced by acrylamide. *E. coli* MF101 carried with pMOL21 was treated with different concentrations of acrylamide (0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg/mL, respectively). The results showed that with the increasing of the acrylamide concentration, *rpsL* mutation frequency significantly increases. Furthermore, a dosage-dependent relationship was detected. The results present here strongly suggested that the *rpsL* mutation assay may be as a potential tool for investigating food and drug safety.

Key words: *rpsL* mutation assay, acrylamide, mutagenicity

丙烯酰胺(acrylamide)作为工业加工合成聚丙烯酰胺的主要材料, 广泛应用于人类生产、生活和科研等领域。大量研究表明, 丙烯酰胺不仅具有较

强的神经毒性, 而且也具有一定的致突变作用^[1]。国际癌症研究机构对其致癌性进行了评价, 将丙烯酰胺列为二类致癌物^[2]。近年来, 瑞典和德国学者

收稿日期: 2009-07-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800255); 教育部新世纪优秀人才计划; 天津科技大学人才引进基金项目(20060432, 20060424)。

作者简介: 刘清岱(1975-), 男, 满族, 河北保定人, 讲师, 理学博士, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

Email: lqd@tust.edu.cn。

发现某些富含淀粉的食品在经过高温加工处理后
可检测出丙烯酰胺,使得食品中丙烯酰胺的污染问
题引起了国际社会和各国政府的高度关注^[3-4]。然
而,目前很少有文章从分子生物学角度对丙烯酰胺
的致突变原理进行研究,因此有必要利用基因突变
实验研究丙烯酰胺的致突变性。

作者以质粒 pMOL21 的 *rpsL* 基因作为选择标
记进行致突变性的检测。由 *rpsL* 基因编码的核糖
体蛋白 S12 可以与链霉素(Sm, streptomycin)形成
复合物,并增强链霉素与细菌 16S rRNA 结合的能
力,从而阻止了转录的起始,这就是链霉素药理作
用的基础。若 *rpsL* 基因发生突变,将破坏 16S
rRNA 与链霉素的相互作用,而导致细胞对链霉素
产生耐药性^[5]。作者采用的宿主菌 MF101 的 *rpsL*
基因是突变的,具有链霉素抗性;而质粒 pMOL21
包含氨苄青霉素抗性和正确的 *rpsL* 基因序列。当
pMOL21 转化入宿主细胞后,只有质粒的 *rpsL* 基
因被诱发突变才会导致宿主细胞具备链霉素抗性
(链霉素抗性为隐性的遗传表型),从而达到正向筛
选突变 *rpsL* 基因的目的^[6]。本研究的实验方法
是一种灵敏度高且简便易行的体外短期致突变实
验方法,为检测食品加工过程中产生的潜在致癌物
提供了一种快速有效的分析方法。

1 材料与 方法

1.1 细胞株和质粒 DNA

大肠杆菌 MF101: 具有链霉素抗性,可进行
rpsL 突变型质粒的筛选; 质粒 pMOL21(4.1 kb),
包含氨苄青霉素抗性和 *rpsL* 基因序列。菌株和质
粒均由日本奈良科技大学 Hisaji Maki 教授赠予。

1.2 主要试剂

氨苄青霉素 (Ap, ampicillin), 链霉素 (Sm,
streptomycin), 丙烯酰胺 (acrylamide), 溴化乙锭
(EB) 等: 均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 感受态细胞的制备与转化

采用 CaCl₂ 法制备感受态细胞^[7], 将质粒
pMOL21 转化至大肠杆菌 MF101, 涂布在含氨苄青
霉素 (50μg / mL) 的 LB 琼脂平板上筛选转化菌。

1.4 细菌的培养和丙烯酰胺质量浓度的确定

将带有质粒 pMOL21 的大肠杆菌 MF101 培养
至对数生长期 (OD₆₀₀ 为 0.6 左右), 以 1: 100 的比
例稀释至含有丙烯酰胺的 LB 液体培养基中, 37℃
振荡培养, 并且以 600 nm 处的光吸收值测定大肠
杆菌的生长曲线。

丙烯酰胺设 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00

mg/mL 共 5 个剂量组; 以溴化乙锭 (EB) 作阳性对
照, 终质量浓度为 0.1 mg/mL; 以无菌的去离子水
作为阴性对照。各组均培养 10 h 后用于 *rpsL* 突变
频率的测定。

1.5 *rpsL* 基因突变频率的测定

将细菌培养液涂布于含氨苄青霉素的平板 (50
μg/mL) 上来确定转化细胞的总数; 涂板于含氨苄
青霉素和链霉素 (50 μg / mL) 平板上以确定 *rpsL*
基因突变的总数。突变率是突变菌数 (含 Ap 和 Sm
平板的菌数) / 总菌数 (含 Ap 平板的菌数)。每组至
少 3 次重复, 总菌落数不低于 10⁶ 个, 用 SAS 8.0 进
行统计分析。

2 结果与 分析

2.1 丙烯酰胺对大肠杆菌生长的影响

研究了不同浓度的丙烯酰胺对大肠杆菌
MF101/pMOL21 生长在不同时间的影响, 所得结
果见图 1。从图 1 可看出, 对照组的大肠杆菌细胞
振荡培养达到稳定期的时间约为 7 h。随着丙烯酰
胺剂量的增加, 达到稳定期的时间有所延长, 当丙
烯酰胺质量浓度达到 1 mg/mL 时, 大肠杆菌细胞
振荡培养达到稳定期滞后到 10 h 左右。细胞对数
生长期的延长, 表明了一定质量浓度的丙烯酰胺抑
制了大肠杆菌细胞的生长, 对于大肠杆菌具有明显
的细胞毒性。

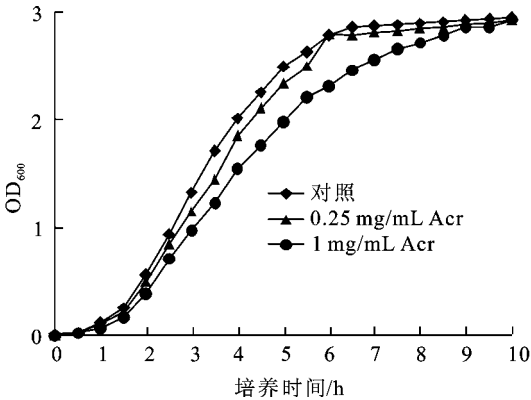


图 1 丙烯酰胺对大肠杆菌 MF101/pMOL21 生长的影响

Fig.1 Effects of acrylamid on *E. coli* MF101/ pMOL21 growth

2.2 丙烯酰胺诱发的 *rpsL* 位点的突变频率 (Mutation Frequency, MF)

研究了不同质量浓度的丙烯酰胺对大肠杆菌
MF101/pMOL21 的 *rpsL* 位点的诱导突变频率, 所
得结果见表 1。在以水作为阴性对照测定的 *rpsL*
基因的自发突变率为 1.85×10^{-6} , 这与日本奈良科

技大学 Hisaji Maki 报道基本是一致的^[8]。作者选择分子生物学实验室常见的诱变剂 EB 作为阳性对照,在较低质量浓度下(0.01 mg/mL)即显示出强的致突变性,阳性对照组突变频率是阴性对照的 6 倍以上。

表 1 丙烯酰胺诱发的 *rpsL* 基因突变频率
Tab. 1 The *rpsL* gene mutation frequencies induced by acrylamide

组别	质量浓度	突变频率($\times 10^6$)
阴性对照(H ₂ O)	1 g/dL	1.85 $\pm$ 0.41
剂量 1	0.05 mg/mL	3.34 $\pm$ 0.91
剂量 2	0.10 mg/mL	5.21 $\pm$ 0.24
剂量 3	0.25 mg/mL	13.36 $\pm$ 0.36
剂量 4	0.50 mg/mL	18.61 $\pm$ 2.19
剂量 5	1.00 mg/mL	28.11 $\pm$ 6.44
阳性对照(EB)	0.01 mg/mL	11.67 $\pm$ 0.99

从表 1 中可以看出,不同质量浓度的丙烯酰胺下的突变频率具有一定的剂量反应关系。为此,作者将这些数据进行了回归分析,所得结果见图 2。

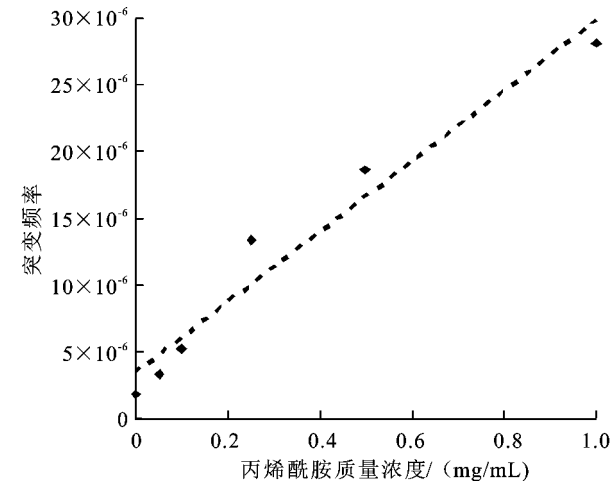


图 2 *rpsL* 基因突变频率与丙烯酰胺浓度的关系示意图

Fig. 2 Effects of acrylamide on the *rpsL* gene mutation frequencies

从图 2 可以看出,丙烯酰胺的不同剂量组与对照组相比均有显著性差异,并且有剂量反应关系。各质量浓度的丙烯酰胺与对照组相比均有显著性差异($p < 0.05$),该检验线性显著($R^2 = 0.945$, $F = 87.26$)。

3 结 语

本研究中阳性对照组 *rpsL* 基因的突变频率是阴性对照的 6 倍以上,根据 *rpsL* 基因突变实验成立的条件判断,实验结果是可靠的。随着丙烯酰胺作用剂量的增加,*rpsL* 位点的突变频率显著增加,并且有剂量效应关系,表明丙烯酰胺可以诱发 *rpsL* 位点的突变。值得关注的是,质量浓度为 0.05 mg/mL 的丙烯酰胺组和对照相比也呈现了显著的差异,说明了该系统具有高度的灵敏性。

目前 *rpsL* 基因正向选择系统主要应用于 DNA 聚合酶扩增产物突变率的检测^[9]。国内有关利用 *rpsL* 基因进行细菌耐药性的研究进行得很多,但是还没有利用该系统定量测定化合物的致突变性。常用的致突变性评测系统主要采用哺乳类细胞正向突变实验,即 HPR^T 基因突变试验和 TK 基因突变实验^[10-11]。但是这些实验均需要复杂的哺乳细胞培养条件,且实验过程大多在 10 d 以上。采用 *rpsL* 系统进行检测,整个分析过程可以在 24 h 内实现。同时 *rpsL* 分析背景较低,如 TK 基因的自发突变率为 10^{-5} ^[11],而 *rpsL* 的自发突变率低至 10^{-6} ,远低于同类正向筛选体系。此外,采用 *rpsL* 正向选择系统进行丙烯酰胺导致的突变性的评价不需要复杂的实验条件,节省人力物力。因此 *rpsL* 基因突变实验有望成为食品和医药领域中致癌物快速检测的有效工具。

参考文献(References):

[1] 袁媛,胡小松. 丙烯酰胺毒性的研究进展[J]. 食品工业科技,2005, 26(4): 187- 189.
YUAN Yuan, HU Xiao-song. Recent research on toxicity of acrylamide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(4): 187- 189. (in Chinese)
[2] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated food stuffs[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 4998- 5006.
[3] Konings E J M, Baars A J, Klaveren J D, et al. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assess-

- ment of the consequent risks[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2003, 41: 1569– 1579.
- [4] 刘稷燕, 江桂斌. 食品中的丙烯酰胺及其形成机制[J]. 化学进展, 2004, 16(6): 1000– 1007.
LIU Ji-yan, JIANG Gui-bin. Acrylamide in foodstuffs and its formation mechanism[J]. **Progress in Chemistry**, 2004, 16(6): 1000– 1007. (in Chinese)
- [5] 黄海南, 韩金祥, 王进鸿, 等. 链霉素耐药结核分支杆菌 *rpsL* 基因分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(4): 376– 381.
HUANG Hai-nan, HAN Jin-xiang, WANG Jin-hong, et al. *rpsL* gene analysis associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. **Acta Genetica Sinica**, 2003, 30(4): 376– 381. (in Chinese)
- [6] 杨文娟, 沈涛超, 张治洲. 检测纳米材料毒性的若干实验方法[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(2): 119– 124.
YANG Wen-juan, SHEN Tao-chao, ZHANG Zhi-zhou. Several approaches for toxicity assessment of nanomaterials [J]. **China Biotechnology**, 2009, 29(2): 119– 124. (in Chinese)
- [7] 张岚岚, 徐春燕, 徐昌杰. 大肠杆菌感受态细胞转化能力的影响因素[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26: 429– 432.
ZHANG Lan-lan, XU Chun-yan, XU Chang-Jie. Factors affecting transformation ability of competent *Escherichia coli* cells [J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2004, 26: 429– 432. (in Chinese)
- [8] Yoshiyama K, Higuchi K, Matsumara H, et al. Directionality of DNA replication fork movement strongly affects the generation of spontaneous mutations in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2001, 307: 1195– 1206.
- [9] Lackovich J, Lee J, Chang P, et al. A measuring fidelity of platinum Pfx DNA polymerase [J]. **FOCUS**, 2001, 23: 6.
- [10] 张勇, 张立实. 两种人类淋巴母细胞 TK、HPRT 基因突变实验比较研究[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2007, 19(1): 36– 39.
ZHANG Yong, ZHANG Li-shi. Comparisons of induced mutations at TK and HPRT loci using two human lymphoblastoid cell lines [J]. **Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis**, 2007, 19(1): 36– 39. (in Chinese)
- [11] 郑卫平, 吕敬章, 孙秀发, 等. 用 TK 基因突变试验评价丙烯酰胺的致突变性[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 250– 252.
ZHENG Wei-ping, LU Jing-zhang, SUN Xiu-fa, et al. Application of tk mutation assay for mutagenicity with acrylamide [J]. **Food Science**, 2006, 27(9): 250– 252. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)