

# 用彗星试验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤\*

陈颖 王子健<sup>†</sup>

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

**摘要** 彗星试验, 又称单细胞凝胶电泳, 因其能够在单细胞水平上灵敏地检验 DNA 链断裂, 成为研究遗传毒性效应的新技术, 近年来得到重要应用。比较而言, 如何利用该技术来检验土壤无脊椎动物活体基因损伤的报道则很少。本研究以丝裂霉素 C (Mitomycin C) 为遗传毒性阳性物质, 研究了用彗星试验检验赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 活体基因损伤的实验方法, 对尾长、“彗尾” DNA 含量和尾矩三个指标定量表达实验结果的敏感性进行讨论, 并以污水灌溉土壤样品为例研究了污染土壤导致的蚯蚓体内 DNA 单链断裂。结果表明, 采用彗星试验检测蚯蚓体内 DNA 单链断裂的基因损伤效应可以作为生物效应标志终点, 尾矩和尾长作为敏感指标可以更好地表达遗传毒性物质基因损伤的剂量-效应关系。

**关键词** 彗星试验; 基因毒性; 蚯蚓; 土壤污染

中图分类号 X171.5; X131.3

文献标识码 A

多年研究表明, 具有“三致”效应物质的基因损伤作用之一是能够破坏生物体内 DNA 分子的整体结构, 引起基因缺失或改变从而导致细胞发生突变, 因此 DNA 断裂水平的检验成为研究遗传毒性效应的重要标志物。彗星试验(又称单细胞凝胶电泳)技术, 因其能够在单细胞水平上敏感地检测 DNA 链断裂, 提供了一种有效检测遗传毒性物质的重要方法, 近来在环境毒理学领域得到广泛应用<sup>[1, 2]</sup>。其实验原理可简单描述为: 在强碱溶液的作用下, 包埋于琼脂糖中的细胞膜、核膜及其他膜结构受到破坏, 膜内的蛋白质、RNA 及其他成分进入凝胶而扩散至电解液中, 而核 DNA 分子量很高, 不能进入凝胶, 只能留于原位。高 pH 值促使 DNA 变性和解螺旋。受损 DNA 片段的缺口暴露了阴电荷, 在电场力的作用下, 离开 DNA 核, 在凝胶分子筛中向阳极移动, 形成彗星状图像, 而未损伤 DNA 仍停留于核中形成圆形荧光团。因此, 含 DNA 链缺口越多, 则进入尾部的 DNA 越多, 表现为尾长和尾部荧光强度增加。目前评价彗星试验结果常用的定量指标主要有: 尾长、“彗尾” DNA 含量和尾矩。其中, 尾长 (Tail length, TL) 是指“彗星”核心到尾部的距离; “彗尾” DNA 含量 (Tail DNA content, TD) 是指迁移到“彗星”尾部的 DNA 的荧光强度占“彗星”头、尾部总荧光强度的比

值。Olive 等<sup>[3]</sup>提出尾矩 (Tail moment, TM) 的概念, 尾矩是由尾长和“彗尾” DNA 含量的相乘得到。在高剂量损伤下, 尾矩与损伤程度仍保持较好的线性关系, 故该参数能较满意地用于多种情况。赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 是目前研究化合物慢性和急性毒性的标准土壤无脊椎动物, 已被广泛用于土壤环境污染物的毒性效应研究。但以蚯蚓体内遗传毒性效应作为生物标志效应的相关研究很少, 应用彗星试验来研究蚯蚓活体暴露基因损伤的研究则更不多见<sup>[4]</sup>。

本工作以丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC)<sup>[5]</sup> 为遗传毒性阳性物质, 研究了用彗星试验检验赤子爱胜蚓活体基因损伤的实验方法, 对“彗星”尾长、“彗尾” DNA 含量和尾矩三个指标定量表达实验结果的敏感性进行讨论, 并以污水灌溉土壤样品为案例, 同时结合土壤样品的持久性有机污染物和重金属的残留情况分析, 提供用蚯蚓活体基因损伤研究污染土壤遗传毒性效应的方法基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

水平电泳槽 (DYCp-31C 型, 北京六一仪器公

\* 中国科学院方向项目 (KZCX3-SW-431) 和国家自然科学基金重点项目 (20237020) 资助

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: wangzj@mail.ices.ac.cn

作者简介: 陈颖, 女, 博士研究生, 主要从事土壤中持久性有毒污染物的生态毒理研究

收稿日期: 2004-08-21; 收到修改稿日期: 2005-01-05

司)。荧光显微镜 (Axioskop 2 mot plus, Zeiss, 德国) 配有 CCD 成像系统 (Axio CAM MRM, Zeiss, 德国) 和分析软件 (Axiovision 4.1, Zeiss, 德国)。冷冻干燥机 (FD-1, 北京博医康技术公司), 冷冻离心机 (Sigma, 德国) 和恒温水浴锅 (DZKW 型, 光明, 余姚市亚星仪器仪表有限公司)。

## 1.2 实验材料

正常熔点的琼脂 (NMA, Agarose), 低熔点琼脂 (LMA, Agarose), Triton X-100, 肌氨酸钠 (N-Lauroylsacrosine sodium salt), 二甲亚砜 (DMSO), 愈疮木酚甘油醚 (Guaiacolglyceryl ether), EB, Tris, 以及 Na<sub>2</sub>EDTA 等购自 Acros (美国); 丝裂霉素 (Mitomycin C, MMC; Sigma, 德国); 17 种有机氯农药混和标样 (OCPs, Cat No. 47913), 16 种多环芳烃混合标样 (PAHs, Cat. No. 48905-U) 等购自 Supelco Co. (美国)。

磷酸缓冲液 (PBS): NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, H<sub>2</sub>O 800 ml, 用盐酸调节 pH 至 7.4 后, 定容至 1 000 ml; 1.0% 正常熔点的琼脂 (用 PBS 配制); 0.7% 低熔点琼脂糖 (用 PBS 配制); 细胞溶解液: 含有 2.5 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 100 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris, 1% 肌氨酸钠, 临用前加 1% Triton X-100, 10% DMSO (pH= 10); 电泳缓冲液: 1 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA 和 300 mmol L<sup>-1</sup> NaOH (临用前将 2 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA 和 600 mmol L<sup>-1</sup> NaOH 等体积混合, pH > 13); 体腔细胞抽提液 (EM): 5% 乙醇, 95% 生理盐水, 2.5 mg ml<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mg ml<sup>-1</sup> 愈疮木酚甘油醚, pH 7.3; 2 mg L<sup>-1</sup> 溴乙啶 (EB) 水溶液。

## 1.3 实验方法

土壤理化性质按常规方法测定; 土壤 Pb、Cu、Ni、Cr、As、Cd 含量采用王水-高氯酸消化, 电感耦合等离子体原子发射光谱仪 (ICP-OES) 测定; 17 种有机氯农药和多环芳烃的测定方法可见以前工作所做描述<sup>[9]</sup>。

**1.3.1 蚯蚓的培养** 蚯蚓 (*Eisenia foetida*), 在室温 20~22℃ 下, 通风良好的暗处培养。土壤的湿度控制在田间持水量的 50%~70%, pH 在 7.0~7.2。驯化期间培养土壤采自北京郊区潭柘寺附近森林褐土, 添加牛粪为食物, 每隔 6~8 周加入新营养物。实验前选取有明显成年环, 发育好的蚯蚓作为实验个体, 每条重约为 300 mg。

**1.3.2 暴露试验** 土壤样品 (编号为 S0、S1 和 S2) 均采自北京东南郊污水灌溉区农田, 主要种植作物为小麦。S1 和 S2 为污水灌溉土壤, 灌溉水源为工业污水与污水处理厂的出水, S0 是在该地区内

采集但近年来已改用机井水灌溉作为实验的野外参考样品。另外, 以驯养蚯蚓的培养土壤, 作为实验室内对照样品。采集农田表层土 (0~10 cm), 在野外混合均匀, 然后冷冻干燥, 去除残留作物, 过 2 mm 筛混匀后, -20℃ 保存。

暴露试验前将蚯蚓放在用 0.85% 生理盐水润湿的滤纸上, 置于保持透气的玻璃皿中, 在光照下, 饥饿清肠 48 h。然后将蚯蚓取出进行暴露实验。以丝裂霉素 C (MMC) 为毒性暴露物质, 分别用 PBS 配成 1、10、100、1 000 μg L<sup>-1</sup> 的溶液, 将蚯蚓放入盛有 1 ml MMC 溶液的 Eppendorf 管中, 管口保持透气, 4℃ 下染毒 2 h。空白对照 (CK) 的蚯蚓, 在同样条件下清肠后, 放入含有 1 ml PBS 溶液中的 EP 管中, 同样暴露 2 h。每个浓度组设 3 只蚯蚓。土壤暴露实验中, 取 100g 土壤, 加入 40 ml 蒸馏水, 混合均匀后将 3 只蚯蚓放入, 在光照透气的条件下 (23±2℃), 暴露 48 h, 并注意补充水分, 保持湿度。土壤试验的空白对照采用直接从培养箱中取出的蚯蚓, 清肠后, 在 100 g 驯养蚯蚓用的土壤 (未加饵料) 中同样条件下培养 48 h。每份土壤样品重复 3 次实验。所有实验中均没有发生蚯蚓死亡现象。

暴露结束将蚯蚓取出, 放在用 4℃ 生理盐水浸湿的滤纸上使其吐去肠内杂物, 然后将动物个体分别移入 EP 管中, 加入 1 ml 的 EM 溶液 (4℃), 3 min 后, 体腔细胞释放完全, 移去蚯蚓, 在 4℃ 下离心沉淀细胞 (3000 r min<sup>-1</sup>, 10 min), 除去上清液, 加入 1 ml PBS 缓冲液 (4℃) 轻轻吹打洗涤细胞, 同样条件下再次离心。洗涤两次后将 3 只蚯蚓的细胞合并, 用 PBS 调节细胞密度为 2×10<sup>5</sup>~30×10<sup>5</sup> 个, 放在冰水浴中待用。

**1.3.3 彗星试验** 彗星试验操作在暗室 (红色灯光) 中进行, 具体步骤为: 采用三层凝胶法<sup>[4,7]</sup>。将 NMA 和 LMA 琼脂糖凝胶水浴加热溶解后, 分别放在 60℃ 和 37℃ 的恒温水浴中。首先在载玻片的毛面上, 滴上 100 μl 1.0% 的 NMA, 迅速盖上盖玻片, 轻压盖玻片使凝胶均匀铺开, 然后在 4℃ 下放置 20 min, 使琼脂糖完全固化。这是第一层凝胶, 可提前铺好, 在 4℃ 下保存, 近期内使用。待第一层凝胶凝固后, 将 10 μl 溶解于 PBS 的细胞悬液与 75 μl 0.7% LMA 琼脂在 EP 管内混合均匀后, 轻轻移开盖玻片, 迅速将混合液滴到第一层凝胶面上, 再次盖上盖玻片, 轻压盖玻片使凝胶均匀铺开, 完成第二次铺胶。将铺好胶的载玻片置于冰面上 20 min 至琼脂糖完全固化。同样移开盖玻片, 将 85 μl 0.7% LMA 滴在第二层凝胶面上, 盖上盖玻片, 置于冰面上固化

15 min。揭掉盖玻片,将铺好凝胶的载玻片浸入新配制的 4℃细胞溶解液中,裂解 1 h,然后取出,用 4℃的蒸馏水轻轻冲洗玻片上的残留液直到凝胶面不粘滑为止,放于 4℃下等待电泳。电泳前,先将两个平行玻片置于新配制的 4℃电泳缓冲液中浸泡 20 min 使 DNA 分子解螺旋,然后将其并排放置在水平电泳槽中的阳极端。调整电泳缓冲液的液面,在 300mA、25V 下电泳 20 min。电泳完毕后,将槽内两端的溶液充分混合,可重复使用 2~3 次。电泳完毕后,将玻片放置于染缸,用 pH 7.5, 0.4 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl 浸洗 3 次,每次间隔 5 min,使玻片呈中性。然后用乙醇脱水后,放于 4℃冰箱内,于 1 周内进行荧光分析。观察时将载玻片用 80μl 2mg L<sup>-1</sup> EB 水溶液染色,盖上盖玻片,放置于潮湿的塑料盒中,然后在荧光显微镜下观察(400 倍放大),选择荧光激发波长为 520 nm,发射波长为 610 nm。每次实验平行电泳两块玻片,每块玻片测定 50 个细胞。采用图像分析软件(Axiovision 4.1)测定尾长(TL)、荧光密度以及“彗星”面积等参数,从而计算出尾矩(TM)和“彗尾”DNA 含量(TD)。

#### 1.4 统计分析

试验结果采用 SPSS 11.5 数据处理软件进行统

计分析。采用 Explore 统计过程和 Kolmogorov-Smirnov Test 检验数据是否呈良好的正态分布以及分布规律的相似性,然后用 Mann-Whitney U Test (2-tailed) 进行空白对照组和各处理组的测量值之间的显著性差别检验( $p < 0.05$ )。以均值和相对标准偏差来表示实验结果,并用箱图(Box-plot)和累积分布曲线来描述数据分布以分析细胞的个体差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蚯蚓(*Eisenia foetida*)活体暴露基因损伤效应的实验参数选择

经 SPSS 软件统计分析得出,MMC 各暴露水平下(1~1000μg L<sup>-1</sup> MMC)彗星试验数据(TL, TD 和 TM)呈非正态分布,但基于同一变量的数值分布规律具有相似性的特点,可以用 Mann-Whitney U Test (2-tailed) 进行非参数检验,即空白对照组和各处理组之间的测量值(TL, TD 和 TM)是否具有显著性差别( $p < 0.05$ )。与对照组相比,在各暴露剂量下用三种指标表示的 DNA 损伤结果均表现出显著性差别。从空白对照结果得到的 DNA 损伤的背景值很低,只有极少数细胞发生明显的 DNA 损伤(图 1, 图 2)。

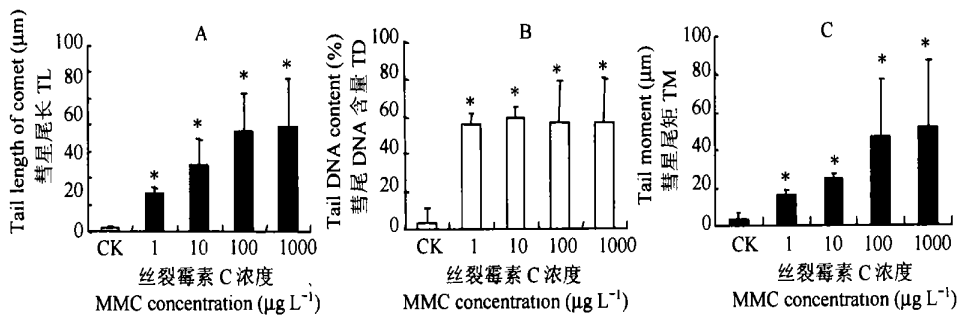


图 1 不同 MMC 处理组中蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤的平均情况

(A、B、C 分别用 TL、TD 和 TM 表示 DNA 损伤结果, \* :  $p < 0.05$ )

Fig. 1 DNA damage in the coelomocytes of earthworms exposed to different levels

of MMC (A: TL, tail length of comet; B: TD, tail DNA content; C: TM, tail moment; \* :  $p < 0.05$ )

相对空白对照,在 1μg L<sup>-1</sup> MMC 暴露剂量下,细胞损伤的数量就明显增加,随着暴露剂量的加大,“彗星”平均尾长和平均尾矩明显增大,但是平均“彗尾”DNA 含量的变化则较小。在高剂量下,细胞 DNA 损伤的个体差异变大,标准偏差增大。同时注意到,在高暴露剂量下,1000μg L<sup>-1</sup> MMC 导致的 DNA 损伤程度与 100μg L<sup>-1</sup> 的剂量产生的效应相近,经检验二者没有显著性差异。类似情况在其他已有研究中也出现过,比如 Pavlica 等<sup>[8]</sup> 检查五氯酚对斑马蚌

类动物的血细胞造成 DNA 单链断裂, Labieniec 等<sup>[9]</sup> 研究单宁酸对贝类动物循环细胞的 DNA 损伤,以及 Koppen 等<sup>[5]</sup> 研究蚕豆根尖细胞对不同遗传毒性物质(包括 MMC)的敏感性等实验结果。Pavlica 等<sup>[8]</sup> 认为其原因可能是由于实验中毒物浓度相近所导致,当毒物浓度进一步提高时仍然会出现明显效应,从而在整体上呈线性的剂量-效应关系,这一点在 He 等<sup>[10]</sup> 的研究结果中得以体现。但是基于 DNA 损伤能够被修复的事实,当毒物浓度很高时是否会导

致其他毒物代谢效应发生, 从而使基因损伤反而降低, 这一点有待进一步研究。

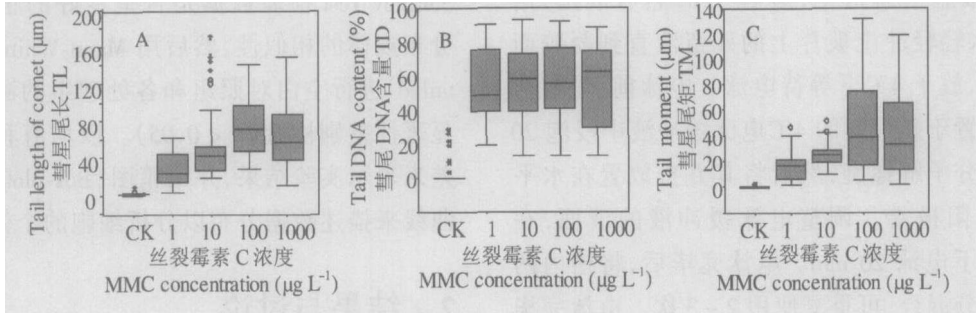


图2 用箱图描述不同MMC暴露剂量下蚯蚓细胞DNA损伤程度的指标敏感度 (A、B、C 分别用 TL、TD 和 TM 表示 DNA 损伤结果)

Fig. 2 Index sensitivity description by box-plot for DNA damage in the earthworm exposed to different levels of MMC(A: TL, tail length of comet; B: TD, tail DNA content; C: TM, tail moment)

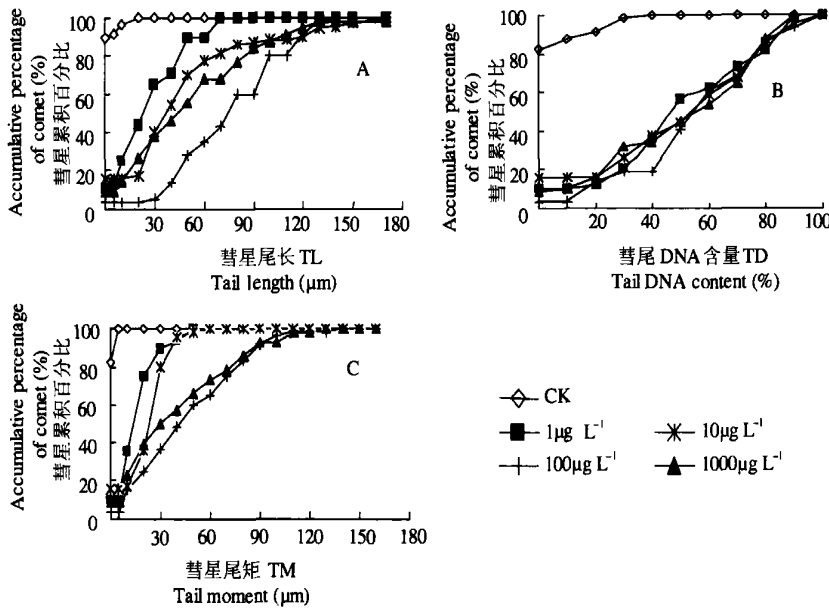


图3 在不同MMC活体暴露剂量下蚯蚓细胞DNA损伤的累积百分比曲线 (A、B、C 分别用 TL、TD 和 TM 表示 DNA 损伤结果)

Fig. 3 Cumulative DNA damage in the earthworm exposed to different levels of MMC (A: TL, tail length of comet; B: TD, tail DNA content; C: TM, tail moment)

由于实验结果的数值分布呈现非正态分布, DNA 受到严重损伤时, 细胞的个体差异变大, 尾长、“彗尾”荧光强度和尾矩会受到极大值的强烈影响, 用均值表示的实验结果有很大的标准偏差, 因此在这种情况下用均值表示的量化结果的意义有所降低<sup>[11, 12]</sup>。针对这种情况, 利用 SPSS 软件的 Explore 统计过程和频数分布功能, 作出箱图和累积百分比曲线进一步分析数据。如图 2 所示, 矩形块的上、中、下三线分别表示变量的 75%、50% 和 25% 的百分位数, 50% 的数据落在矩形块的范围。和矩形块相连的垂直线为触须线, 上下触须线之间的变量值为

本体值, 分别对应本体值的最大值和最小值, 而极值和奇异值则被去掉。除了 1000µg L<sup>-1</sup> 的效应略低于 100µg L<sup>-1</sup> 外, 随着暴露剂量的提高, 三个参数的 50% 的百分位数 (箱体中间线对应的纵坐标) 均增大, 对于 TL 和 TM, 细胞的个体差异也随之增大 (图 2, 图 3)。在同样的暴露剂量下, 细胞个体的敏感程度不同, “彗星”的尾长、尾矩以及尾部 DNA 含量各指标数值由低到高分布。如图 3 (A, B, C), 随着 MMC 暴露剂量的增加, 具有较高 TL 和 TM 值的细胞比例增大, 从而反映出 DNA 损伤程度加重。同一 MMC 剂量下的 TD 值在 0~ 100% 之间分布, 但在不

同 MMC 剂量之间这种个体差异的变化不明显。

有人认为凝胶会限制 DNA 的迁移从而影响尾长和尾矩的测量值,从而倾向于用尾部 DNA 百分含量来表示试验结果,由于细胞和化合物类型的不同,尾长并不能很好地表现出线性的剂量-效应关系<sup>[11]</sup>。但从本研究的结果来看,尾长和尾矩能够反映良好的线性的剂量-效应关系,而用尾部荧光强度表示的

DNA 含量则在反映细胞个体差异的变化上表现平缓,用其平均值和相对标准偏差表示的实验结果没有很明显的剂量-效应关系。有研究表明,剂量效应的明显程度与化合物的种类有关<sup>[13,14]</sup>。从以上讨论结果可以得出,对于不同浓度的 MMC 暴露剂量,用“彗星”尾矩和尾长表示的 DNA 损伤程度与遗传毒性物质 MMC 的浓度基本上成正比。

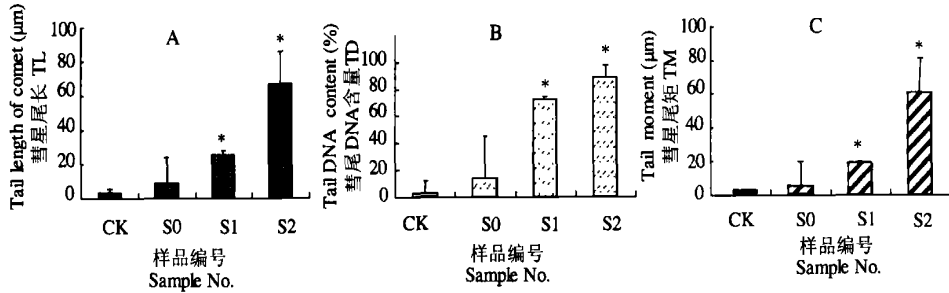


图 4 土壤样品活体暴露试验中蚯蚓体腔细胞的 DNA 损伤

(A、B、C 分别用 TL、TD 和 TM 表示 DNA 损伤结果, \* :  $p < 0.05$ )

Fig. 4 DNA damage in the coelomocytes of the earthworm exposed to soil samples

(A: TL, tail length of comet; B: TD, tail DNA content; C: TM, tail moment; \* :  $p < 0.05$ )

## 2.2 污灌土壤对蚯蚓(*Eisenia foetida*)的基因损伤效应

以污水灌溉土壤样品为例,土壤活体暴露实验中蚯蚓体腔细胞的 DNA 损伤的情况如图 4 所示。经检验,用三种参数表示的实验结果,S1 和 S2 样品 DNA 损伤水平明显高于空白样品( $p < 0.05$ ),而对于用井水灌溉的 S0 样品与空白对照没有显著性差异。用 TM 和 TL 表示的实验结果反映的趋势比较相近,而对于 TD 来说,如图 4 B, S1 和 S2 样点的数值没有显著性差异。这与前面用 MMC 暴露的实验结论比较一致,即用 TM 和 TL 能较好地表示彗星试验中蚯蚓体腔细胞的 DNA 损伤差异。在空白和对照土壤中也出现了一定的基因损伤,这可能是由于实验操作或者动物体内因素引起而不是外界物质造成的 DNA 链断裂,这种现象也在其他无脊椎动物有关研究中发现。Mitchelmore 等<sup>[11]</sup>则认为较高的基因损伤水平是无脊椎动物的一种普遍特征。

土壤理化性质、重金属和持久性有机有毒污染物的含量分别如表 1 和表 2 所示。3 份土壤样品中重金属污染程度较低并且含量相近(Cd 和 As 含量没有检出),有机氯农药的污染轻微,主要由六六六和滴滴涕类农药组成,所有检测出的重金属和有机氯农药的浓度都相应低于国家标准《土壤环境质量

标准》(GB15618-1995)规定的二级土壤质量限值。但是在 S2 样品中发现了较高浓度的多环芳烃,土壤中苯并[a]芘的浓度为  $45.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,多环芳烃总含量为  $297.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,而 S0 和 S1 样品中苯并[a]芘含量和多环芳烃总含量的浓度都很低。S2 样点位于污水灌溉渠道的源头,污染程度相对较重,主要接受来自凉水河的污水灌溉。S1 样点虽然也是污水灌溉土壤但是位于渠道的下游,污水的传输过程使部分污染物质得到沉降,从而减少了对土壤的污染。多年研究表明,致癌物质暴露能够直接作用或通过其代谢产物间接改变 DNA 结构来破坏其完整性。多环芳烃类物质是目前已知的重要致癌物质,从该研究结果看可能是造成 DNA 损伤的原因之一。

但是由于环境体系复杂,目前只有部分物质已知具有明显遗传毒性作用,并且影响 DNA 基因损伤的污染因素很多,仅仅测定已知物质的含量可能并不能反映其真实情况。随着工业的发展,污染物质的增多,化学仪器分析技术的局限使其不可能将所有的遗传毒性物质完全检出,而且即便检出浓度也难以确切反映其毒性效应。动物活体暴露并测定生物标记物可以检验整体土壤环境的遗传毒性和有效性,正好与之互补,成为诊断土壤毒性的有效工具。

表1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Some physical and chemical properties of soil samples tested

土壤编号 Soil No	pH (CaCl <sub>2</sub> )	含水量 Water content (%)	总磷 Total P (mg kg <sup>-1</sup> )	总氮 Total N (mg kg <sup>-1</sup> )	有机碳 Organic C (g kg <sup>-1</sup> )
S0	7.4	14.5	1075	1500	8.9
S1	7.3	12.4	1249	2340	13.3
S2	7.2	7.49	889	1420	7.3

表2 供试土壤重金属和持久性有机污染物含量

Table 2 Contents of heavy metals and persistent organic pollutants in soil samples tested

土壤编号 Soil No	重金属含量 Heavy metal (mg kg <sup>-1</sup> )				持久性有机污染物 Persistent organic pollutants (μg kg <sup>-1</sup> )				
	Cu	Pb	Cr	Ni	六六六 HCHs	滴滴涕 DDTs	有机氯农药 ΣOCPs	苯并[a]芘 B[a]P	多环芳烃总量 Total PAHs
S0	30.5	16.2	55.0	21.7	3.5	7.5	11.2	2.9	14.8
S1	28.0	11.2	51.1	21.9	0.8	9.2	10.0	7.4	36.1
S2	29.7	14.4	50.2	21.6	6.9	5.2	12.1	45.6	297.0

### 3 结论

1) 蚯蚓活体暴露 MMC 各浓度下 (1~1000 μg L<sup>-1</sup> MMC) 彗星试验的数据 (TL, TD, TM) 呈非正态分布, DNA 受到严重损伤时, 细胞的个体差异变大, 用均值表示的实验结果有很大的标准偏差。

2) 用“彗星”尾矩和尾长表示的 DNA 损伤程度与 MMC 的浓度基本上成正比。但是, 在最高暴露剂量下, 即 1000 μg L<sup>-1</sup> MMC 导致的 DNA 损伤程度与 100 μg L<sup>-1</sup> 的剂量产生的效应相近, 没有显著性差异。“彗星”DNA 含量不能反映细胞个体差异的变化, 用其平均值和相对标准偏差表示的实验结果没有很明显的剂量-效应关系。

3) 对于污染土壤的蚯蚓活体暴露, 相对于空白对照, 经污水灌溉的土壤样品的 DNA 损伤水平明显高于对照和空白样品。土壤样品中相对较高的多环芳烃含量可能是 DNA 损伤的原因之一, 但是环境体系复杂, 仍需进一步研究。

采用彗星试验技术检验蚯蚓活体暴露过程中 DNA 损伤水平, 并结合统计学分析方法对“彗星”尾矩、尾长等参数表示的实验数据进行分析, 能够更为准确地定量描述化学品和土壤中污染物造成的动物细胞 DNA 单链断裂。该技术作为一种敏感、方便、快速的生物标记方法, 对于实验室内和野外实地考察

土壤整体环境质量, 判断污染物质的遗传毒性效应具有重要应用意义。

### 参考文献

- [1] 张建平. 国外医学遗传学分册, 1997, 20 (5): 231~234. Zhang J P. Single cell gel electrophoresis assay and its application (In Chinese). Section of Genetics, Foreign Medical Sciences, 1997, 20 (5): 231~234
- [2] 秦椿华, 沈健英, 黄仕和, 等. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (6): 517~520. Qin C H, Shen J Y, Huang S H, *et al.* Single cell gel electrophoresis assay: A DNA breakage detection technique (In Chinese). Prog. Biochem. Biophys., 1995, 22 (6): 517~520
- [3] Olive P L, Banath J P, Durand R E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “Comet” assay. Radiat. Res., 1990, 122: 86~94
- [4] Verschaeve L, Gilles J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1995, 54: 112~119
- [5] Koppen G, Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. Mutat. Res., 1996, 360: 193~200
- [6] Chen Y, Wang C X, Wang Z J, *et al.* Assessment of the contamination and genotoxicity of the soil irrigated with wastewater. Plant Soil, 2004, 261: 189~196
- [7] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., 1988, 175: 184~191
- [8] Pavlica M, Klobučar G I V, Mojačanin, *et al.* Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutat. Res., 2001, 490: 209~214

- [ 9 ] Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat. Res.*, 2003, 539: 19~ 28
- [ 10 ] He J L, Chen W L, Jin L F, *et al.* Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat. Res.*, 2000, 469: 223~ 231
- [ 11 ] Mitchelmore C L, Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 1998, 399: 135~ 147
- [ 12 ] Moretti M, Marcarelli M, Villanni M, *et al.* In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: Cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol. In Vitro*, 2002, 16: 81~ 88
- [ 13 ] Siu W H L, Cao J, Jack R W, *et al.* Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.*, 2004, 66: 381~ 392
- [ 14 ] Poul J M, Huet S, Godard T, *et al.* Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test, comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.*, 2004, 42: 203~ 209

## DETECTION OF GENOTOXICITY OF SOIL POLLUTION TO EARTHWORM INVIVO EXPOSURE BY COMET ASSAY

Chen Ying Wang Zijian

( State Key Laboratory of Aquatic Chemistry, Research Centre of Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China )

**Abstract** The comet assay ( the alkaline single cell gel electrophoresis ) was applied universally in the field of ecotoxicology as a sensitive bioassay to detect DNA damage in the cell level. Little has been reported on its application in assessing effects of mutagens on earthworms in the soil ecosystem. In this paper, earthworms (*Eisenia foetida*) were exposed to different levels of mitomycin C and soil samples collected from an area irrigated with wastewater for years. After the exposure, coelomocytes of the earthworms were extracted and subjected to comet assay. The samples were compared in endpoints, such as tail length ( TL ), tail DNA content ( TD ) and tail moment ( TM ). Results show that the utilization of comet assay in combination with vivo exposure of earthworms is a promising tool for evaluation of mutagenic chemicals and polluted soil, and that among the endpoints, TM and TL are more sensitive in representing the dose-effect relationship.

**Key words** Comet assay; Genotoxicity; Earthworm; Soil pollution