

# 用彗星实验技术检测环境遗传毒性物质\*

陈颖<sup>1</sup> 王磊<sup>2</sup> 王子健<sup>1†</sup>

(1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

(2 中国 21 世纪议程管理中心, 北京 100089)

**摘要** 彗星实验 (COMET Assay) 是近年发展起来的在单细胞水平上定量检测 DNA 损伤的灵敏方法。经过不断改进和完善, 用该方法检验的基因损伤已成为鉴别遗传毒性物质的敏感标记物, 在致癌作用机制、环境污染监测以及环境毒理和风险评价等研究中, 均发挥了重要作用, 国内已有越来越多的研究人员开始采用这项技术。本文对彗星实验技术的发展过程、在环境中的应用以及未来的发展趋势进行综述, 以利科研人员更加准确地掌握该技术, 合理解释有关数据, 来推动其进一步的应用和发展。

**关键词** 彗星实验; 遗传毒性; 环境; 综述

中图分类号 X171.5; X131.3

文献标识码 A

## 1 彗星实验技术的起源、原理和发展

化学致癌物按化学品作用机理分类可以分为: 遗传毒性物质、非遗传毒性物质以及未分类物质。其中, 遗传毒性物质主要是亲电、或经过代谢转化后形成亲电中间体的潜在致癌物, 能与 DNA 产生相互化学作用而引起 DNA 损伤。DNA 损伤是指由化学或物理因素引起的 DNA 链断裂、分子基体修饰和 DNA 交联等。如果这种损伤没有得到及时修复, 就会引起突变, 乃至癌变。用以直接或间接测定 DNA 链损伤的方法很多, 以往常用技术如 SOS/umu 实验、微核实验 (MN) 和姐妹染色体交换实验 (SCE)。SOS/umu 实验是检测环境中具有遗传性毒害污染物的短期筛选试验, 是基于造成 DNA 损伤的化学物质能够诱导 SOS 反应并表达 UmuC 基因, 将 PSK1002 质粒导入 TA1353 的重建菌株而进行的改进型的 SOS 试验方法<sup>[1,2]</sup>。MN 实验原理是, DNA 链损伤导致染色体片断不能整合到姐妹染色体分子中, 转而在细胞内形成小的核体 (微核)<sup>[3,4]</sup>, 通过统计微核发生的比率来定量表示染色体的异常突变。SCE 实验则是评价 DNA 链损伤后染色体单体间的片断交换<sup>[5]</sup>。MN 实验和 SCE 实验测试基因损伤时, 细胞

已经达到有丝分裂, 甚至是分裂间期, 染色体的后期修复已经开始发生。但是, 近年发展起的单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 则可以在细胞水平上检验未修复 DNA 分子的单/双链损伤, 而不需要等到有丝分裂之后才可以观测, 因此是一种更为敏感的 DNA 损伤检测手段。其实验原理可以简单描述为: 包埋于琼脂糖中的细胞, 在强碱溶液的作用下细胞膜结构受到破坏, 膜内的蛋白质、RNA 及其他成分溶解进入电解液中, 而 DNA 核的分子量很大, 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, 而未损伤细胞中 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。

SCGE 技术是在核沉淀和光环测试等检测技术基础上演化而来, 最早期采用的是中性微凝胶技术<sup>[6]</sup>, 然而在中性条件下裂解和电泳只能检测双链 DNA 断片, 不能测定单链断片, 而许多遗传毒性物质诱导的 DNA 单链断片数量比双链断片高 5 ~ 2 000 倍。Singh 等<sup>[7]</sup>首次提出碱性电泳技术, 可检测出单链 DNA 断片, 使 SCGE 敏感性大大提高, 而当

\* 中国科学院知识创新工程方向项目 (KZCX3-SW-431) 和国家自然科学基金项目 (40471129) 资助

† 通讯作者, E-mail: wangzj@rcees.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: 2005-11-30; 收到修改稿日期: 2006-02-22

pH > 13 时,除了 DNA 双链和单链断裂外,还能检测到 DNA 的碱性不稳定结构<sup>[8]</sup>。标准的彗星实验不易检测出 DNA 交联现象(包括 DNA-蛋白交联以及 DNA-DNA 交联)<sup>[9]</sup>,但是如果在处理细胞时同时加入交联剂和 DNA 链断裂剂,化学物质引起的 DNA 交联作用就可以通过测定 DNA 断裂而间接被检测到<sup>[10,11]</sup>。对于凋亡细胞的检测,可去除彗星实验的电泳过程以提高试验的灵敏度,这样染色后 DNA 碎片在核外部形成了晕圈而不是彗星状<sup>[12]</sup>。经过不断改进,彗星实验技术得到了重要发展和应用,其优点可概括为:(1)可以提供单个细胞 DNA 的异质性信息;(2)基本上适用于所有的真核细胞;(3)更加灵敏,可检验 0.1DNA/10<sup>9</sup>道尔顿断裂;(4)所需细胞样本量小(<10 000);(5)无需放射性示踪剂等。

随着彗星实验越来越被广泛地应用于遗传毒性和细胞毒性物质的检验,其实验结果的准确性和一致性也越来越引起人们的重视。可采用两种方法获得彗星试验的结果:(1)用目测千分尺测量彗星的尾长,计算彗尾长和宽的比例,或者将细胞的迁移程度分成四到五级;(2)用配有 CCD 照相、荧光显微镜和软件的成像分析系统来捕获和分析荧光图片,测量荧光强度和 DNA 物质在彗星中的分布。成像分析法更为准确,应用也越来越普遍。

在彗星图像中,彗头是细胞核,即未断裂的、分子量较大的 DNA 片段,彗尾是细胞核中的 DNA 片段在电场作用下向阳极迁移而形成的,片段愈小,迁移的距离愈远,因此彗尾的长度和 DNA 含量可以反映细胞的受损程度。目前评价彗星实验结果常用的定量指标主要有:彗尾尾长、彗尾 DNA 含量和尾矩。其中,尾长是“彗星”核心到尾部的距离;彗尾 DNA 含量是彗尾 DNA 荧光强度和“彗星”总荧光强度的比值。尾长与损伤 DNA 的迁移直接相关,在低损伤剂量范围内尾长与损伤呈线性关系,但当损伤剂量超过某一范围时,尾长并不随损伤的增加而增加,此时,尾部 DNA 密度(荧光强度)与损伤程度的关系更为密切。尾矩的概念是由 Olive<sup>[12]</sup>提出的,尾矩是由尾长和彗尾 DNA 含量的相乘得到。尾矩由于同时将尾长和 DNA 密度两个影响因子计算在内,并且在高强度损伤情况下仍能与 DNA 损伤程度保持较好的线性关系,因此能更准确、更灵敏地反映出细胞核释放的 DNA 片段的量,可适用于多种情况。在最近的工作中,陈颖等<sup>[13]</sup>以丝裂霉素 C 为遗传毒性阳性物质,研究了用彗星实验检验赤子爱胜蚓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。结果表明,采用彗星实验检测蚯蚓体腔细胞 DNA 单链断裂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。经过不断改进和完善,该方法已成为鉴别遗传毒性物质的敏感标记物,在遗传毒性作用机制和环境污染监测方面均发挥了重要作用。

## 2 彗星实验在环境毒理学领域的应用

理论上,几乎所有真核细胞发生的 DNA 损伤都能用彗星实验来检验,人工培养的细胞株或者从动物组织分离出来的细胞都可在离体或活体染毒后进行彗星实验。可用于彗星实验的生物组织多种多样,比如无脊椎动物的肌肉、腮、生殖腺、胚胎组织、消化腺、足、虹吸管等,脊椎动物的肝脏、肾脏、肠、脾、肌肉、腮、生殖腺以及植物和藻类的细胞等<sup>[8,14]</sup>。对于不同类型细胞,其 DNA 单链断裂水平的背景值不同。首先,不同种类的生物体对遗传毒物的灵敏性千差万别;其次,由于毒物作用的靶部位不同,同一生物体内不同器官、组织的细胞引起的 DNA 损伤水平也不尽相同。Aoyama 等<sup>[14]</sup>发现,1-甲基-3 硝基-1-亚硝基胍(MNNG)和苯并[a]芘导致的绿藻(*Euglena gracilis*)细胞 DNA 断裂均表现出剂量-效应关系,在同样条件下甚至比人体淋巴细胞的反应更加明显。

借助于彗星实验,人们已经研究和发现了许多物质的 DNA 损伤作用,如直接作用和断裂 DNA 单链的物质、烷基化剂、DNA 加合物、金属化合物、氧化剂和交联剂等。比如,人们早就知道丙烯酰胺对人类和实验动物有神经毒性的作用,但是 Mani 等<sup>[15]</sup>发现该化合物还能对哺乳动物的脑细胞和生殖细胞造成明显的 DNA 损伤。另外,彗星实验技术也用于研究化学物质对细胞凋亡这种生理现象的影响,凋亡细胞的 DNA 双链断裂,产生大量的 DNA 碎片,在彗星实验中,彗星尾部迁移距离很长,DNA 几乎完全脱核,形成不同于一般损伤的特有形态,如前所述,改进后的彗星实验对凋亡现象的检测更加灵敏。

近年来关于彗星实验的研究工作不仅局限在筛选化学物质是否会造成 DNA 损伤,而且在其损伤机制、损伤与修复关系等问题上也已有了新的探索,是一个值得关注的重要方向。彗星实验既可以用于观察 DNA 损伤的恢复情况,也可以检测由于不完全切除修复造成的 DNA 缺口,为致突变研究提供基础数

据。一方面,DNA 损伤发生以后,生物体内自身的修复机制可以将这种损失降到最低,通过观察 DNA 断裂水平的降低可以研究这种修复过程。另外,DNA 不完全修复也能产生 DNA 链缺口,这些缺口可增加 DNA 的不稳定性,导致碱基突变和染色体畸变。通过采用 DNA 合成抑制剂延缓修复,使 DNA 单链保持断裂,可以研究 DNA 的不完全修复情况<sup>[16,17]</sup>。类似,DNA 交联现象也是环境污染物和致癌物导致生物体基因损伤突变的结果,彗星实验为研究其发生和修复过程提供了可行方法<sup>[18]</sup>。相关研究如 Lee 等<sup>[19]</sup>研究了草虾胚胎细胞经过阳光和 PAH(光合毒性作用)暴露后 DNA 损伤的修复情况;陈颖(未发表数据)等在北京市大兴污水灌溉区观察到暴露于污染土壤中的蚯蚓,其彗星实验的尾距随时间的变化规律为:在 1~7 d 内逐步增加,7 d 后逐步减少,显示明显的时间相关损伤-修复过程。

根据已有研究结果推测,遗传毒性物质发生突变之前很可能存在一个 DNA 损伤的域值,将彗星实验与其他遗传毒性实验(如 DNA 加合物实验等)相结合将有助于了解致癌物质的作用机理,包括毒物对 DNA 的直接损伤、DNA 或染色体突变的可能性<sup>[15,20]</sup>,彗星实验往往比其他细胞遗传毒性实验更灵敏,在相对较低的毒物浓度下就可能发生显著的 DNA 链断裂,而用 SCE 检验的基因组突变和用微核检验的染色体突变则需要更高的观察浓度。

### 3 彗星实验在环境污染监测中的应用

利用彗星实验可以监测环境中存在的遗传毒性物质。Wend 等<sup>[21]</sup>研究不同粒径的空气悬浮物(PM<sub>2.5</sub>和 PM<sub>2.5-10</sub>)导致了老鼠纤维原细胞明显的 DNA 损伤,发现毒性主要存在于细颗粒 PM<sub>2.5</sub>的有机溶剂提取物中,并且冬季样品的毒性是夏季样品的 9 倍和 4.6 倍。DNA 损伤会影响到水生动物的生长发育和繁殖。圣地亚哥海湾的软体动物 *M. edulis* 表现出 DNA 损伤和生长的减缓<sup>[17]</sup>;而该地区另一类软体动物的精子 DNA 受到损伤,与卵子受精成功率的降低有很大的相关性<sup>[22]</sup>。最近 Lemiere<sup>[23]</sup>进行了一项有趣的研究,将多环芳烃污染地区采集到的贝类(*Mytilus*)喂给老鼠后,发现老鼠肝脏和骨髓细胞的 DNA 损伤与 *Mytilus* 体内的 PAH 污染水平有明显的剂量-效应-时间关系,这一结果表明了被初级消费者摄取的污染物对上一级消费者的生物有效性,食物链的传递也能间接导致非污染生境的捕

食者体内发生 DNA 损伤。

直接用彗星实验监测环境介质(水、气、土、动物和植物)遗传毒性的工作尚且不多,一方面是由于相当多的环境研究人员目前主要依靠化学分析工具,很少采用生物测试的技术方法;另一方面,彗星实验类似的毒性测试或生物效应标记物测试方法只能回答潜在的后果,而不能回答产生后果的原因,这在目前基于环境质量标准的管理体制中很难发挥作用。但是可以预期,随着风险管理逐步完善,生物毒性测试的应用会越来越多。用彗星实验进行野外污染监测时,还要考虑自然条件对结果背景值的影响,如季节、时间、阳光、个体差异,以及生物体对环境压力的适应调节能力等<sup>[24]</sup>。

### 4 彗星实验在生态和健康风险评估中的应用

风险评估是收集、整理和解释各种与健康相关的资料的过程。这些资料包括毒理学资料、人群流行病学资料、环境和暴露的因素等,可以分为定性风险评估和定量风险评估。危害鉴定是确定暴露于有害因子所引起不良健康效应发生率升高的过程,即对有害因子引起不良健康效应的潜力进行定性评价的过程,如判定某污染物是否具有致癌性,并进一步确定其致癌风险。类似彗星实验这样的快速筛选和测试方法既可以是健康风险评估的第一步(危害鉴定),又是定性风险评估的关键指标,为研究毒物导致哺乳动物形成慢性肿瘤提供了快速筛选的工具。

彗星实验灵敏、简便,耗时短,可检测大样本,因此是快速筛查风险因子、开展生态系统中遗传毒性物质的生态风险和人群致癌风险调查的理想方法。陈颖等<sup>[13]</sup>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。肖睿洋等<sup>[25]</sup>利用 SOS/umu 试验测试了天津地区 41 个土壤样品有机提取物的遗传毒性,研究了该地区土壤中遗传毒性物质污染水平及区域生态风险的分布规律;同时对其中部分样点进行了蚯蚓活体暴露和彗星实验,结果表明在所研究区域中,遗传毒性的高风险区主要分布在天津市和塘沽、汉沽两个区,离体的 SOS/umu 实验结果和活体的彗星实验结果得到了相互印证(未发表数据)。Yáñez 等<sup>[26]</sup>用彗星实验对污染矿区儿童进行血细胞抽样调查,发现该地区儿童血细胞 DNA 的受损情况普遍高于对照地区的儿童,并且尿液中砷和血液中铅的含量也明显较高。

彗星实验可以用来评价化学品的遗传毒性。已知损伤 DNA 的遗传毒性物质包括直接作用 DNA 导致损伤的遗传毒性物质和代谢活化产物作用于 DNA 导致损伤。直接导致 DNA 损伤的化合物包括烷基化试剂,如 N-甲基-N-亚硝基-胍, 甲基甲烷磺酸脂(MMS), 这些化合物不需要活化代谢过程就能够导致 DNA 损伤。已经证明各种各样的烷基化化合物能够在软体动物和鱼类、两栖动物的细胞中产生彗星,而过氧化氢, 3-氯-4(二氯甲基)-5-羟基-2(5H)-咪喃, N-乙酸-N-2-乙酰基-氨基苄和 4-氨基-联苯也能够直接作用于 DNA,并在鱼类和无脊椎动物细胞中产生彗星<sup>[18,27]</sup>。阿特拉津和草甘磷等除草剂能使牛蛙(*R. catesbeiana*)的红血球细胞产生彗星<sup>[28]</sup>。利谷隆是一种广泛使用的除草剂,对鼠类的体内实验表明其能够产生 DNA 损伤。

第二类导致 DNA 损伤的化合物需要代谢活化后才能对 DNA 发生作用。Mitchelmore 等<sup>[29]</sup>发现苯并[a]芘和硝基芘能使虹鳟鱼(*S. trutta*)体内的肝细胞产生彗星,但是血细胞却没有损伤。从污染的河水中发现的白鲑鱼(*L. cephalus*)体内 EROD 酶活性较高,其红血球 DNA 的彗星尾矩明显高于清洁河水中的同类生物<sup>[30]</sup>。光氧化作用可以使芳烃物质形成阳离子,这种阳离子不仅能稳定地与 DNA 结合,导致单链损伤而且还能够产生氧自由基。杀虫剂 malathion 的主要代谢物是 malaoxon 和它的异构体 isomalathion,彗星实验结果表明其对人血细胞的 DNA 损伤作用存在剂量-效应关系<sup>[31]</sup>。有些化合物可以从多种途径导致 DNA 损伤。例如,甲萘醌本身能够与 DNA 结合导致单链损伤和交联,而甲萘醌还原生成醌自由基后又能与氧生成多种多样的 ROS,这些中间产物都能导致 DNA 损伤<sup>[32]</sup>。

危害鉴定中通常采用化合物结构-活性(QSAR)关系模型,彗星实验可以用来建立遗传毒性物质的 QSAR,然而这方面的研究工作却非常少。Tafazoli 等<sup>[33]</sup>用彗星实验检验了五种氯化烷和烯类物质,结果证明:含氯数目越多对 DNA 损伤作用越强,带双键的烯类比无双键的烷类更容易导致 DNA 损伤。尽管这类研究工作目前还比较少,但是可以预料彗星实验作为遗传毒性物质 QSAR 的验证手段,具有很好的应用前景。

## 5 小结和展望

彗星实验从一种在单细胞水平上检验 DNA 链

损伤的灵敏方法开始,已经逐步成为筛选致癌和致突变遗传毒性物质、监测环境介质中的遗传毒性物质和研究化合物致癌作用机理的重要方法,在风险评估,尤其是在土壤和水环境污染潜在生态风险和致癌健康风险的研究方面也取得了很重要的研究成果。由于 DNA 损伤关系到生物个体遗传信息的表达,与种群密度和生态群落影响很可能存在直接或间接联系,因此该效应标记方法将不仅仅是从生物个体角度起到环境预警的作用,从区域管理的角度也可能作为反映生态和健康效应的重要指标。另外,鉴于彗星实验对于真核细胞的普遍适用性,也为目前致癌物环境毒理组学研究和致癌风险评估体系提供了重要的手段。

## 参考文献

- [1] Oda Y, Nakamuro S, Oki T, et al. Evaluation of the new system (Umur-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 1985, 147: 219 ~ 227
- [2] Quillardet P O, Huisman R D, Hnug M. SOS chromotest a test assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, 79: 5 971 ~ 5 975
- [3] Jennesen D, Ramel C. The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat. Res.*, 1980, 75: 191 ~ 202
- [4] Grisolia C K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C, and various pesticides. *Mutat. Res.*, 2002, 518: 145 ~ 150
- [5] Latt S A, Allen J W. In vitro and in vivo analysis of sister-chromatid exchange formation. In: Kilbey B J, Legator M, Nichols W, et al. eds. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Amsterdam: Elsevier, 1977. 275 ~ 291
- [6] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 1984, 123: 291 ~ 298
- [7] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988, 175: 184 ~ 191
- [8] Lee R F, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, 2003, 544: 43 ~ 64
- [9] Miyamae Y, Iwasake K, Kinae N, et al. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat. Res.*, 1997, 393: 107 ~ 113
- [10] Olive P L, Wlodek D, Durand R E, et al. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.*, 1992, 198: 259 ~ 267
- [11] Fuhler S, Wolf H U. Detection of DNA-cross-linking agents with the alkaline Comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 1996, 27: 196 ~ 201

- [12] Olive P L, Ban áh 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
- [13] 陈颖,王子健. 用彗星实验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤. *土壤学报*, 2005, 42 (4): 577 ~ 583. Chen Y, Wang Z J. Detection of genotoxicity of soil pollution to earthworm *in vivo* exposure by comet assay (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42 (4): 577 ~ 583
- [14] Aoyama K, Iwahori K, Miyata N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: Evaluation of DNA damage and repair. *Mutat. Res.*, 2003, 538: 155 ~ 162
- [15] Mani è I, Godard T, Doerge D R, *et al.* DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide Isabelle. *Mutat. Res.*, 2005, 580:119 ~ 129
- [16] 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
- [17] Steinert S A, Streib-Montee R, Leather J M, *et al.* DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.*, 1998, 399: 65 ~ 85
- [18] 张遵真,衡正昌. 彗星试验检测 DNA 交联及其修复效应的研究. *卫生毒理学杂志*, 2001, 15 (4): 262 ~ 264. Zhang Z Z, Heng Z C. Comet assays to detect DNA Crosslinks and repair (In Chinese). *Journal of Health Toxicology*, 2001, 15 (4): 262 ~ 264
- [19] Lee R, Kim G B. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Mar. Environ. Res.*, 2002, 54: 465 ~ 469
- [20] Betti C, Davini T, Giannessi L, *et al.* Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.*, 1994, 307: 323 ~ 333
- [21] Wendy Hsiao W L, Mo Z Y, Fang M, *et al.* Cytotoxicity of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>2.5-10</sub> ambient air pollutants assessed by the MITT and the Comet assays. *Mutat. Res.*, 2000, 471: 45 ~ 55
- [22] Steinert S A, Streib-Montee R. Comparison of toxicant induced DNA damage in mussel somatic and germ cells, and under acellular conditions. *In: Pensacola FL. ed. Abstracts for 21st SETAC Annual Meeting: Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000. 39
- [23] Lemiere S, Cosse-Leguille C, Bispo A, *et al.* DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutat. Res.*, 2005, 581: 11 ~ 21
- [24] Steinert S A, Streib-Montee R, Sastre M P. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, 1996, 46: 355 ~ 358
- [25] 肖睿洋,禹果,王春霞,王子健. 天津地区土壤中遗传毒性物质的分布规律. *环境科学学报*, 2005, 25 (10): 1 405 ~ 1 407. Xiao R Y, Yu G, Wang C X, Wang Z J. Distribution of genotoxic substances in soils in Tianjin Area (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*. 2005, 25 (10): 1 405 ~ 1 407
- [26] Y áñez L, Garc ía-Nieto E, Rojas E, *et al.* DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environ. Res.*, 2003, 93: 231 ~ 240
- [27] 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
- [28] Clements C, Ralph S, Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mbl. Mutagen*, 1997, 29: 277 ~ 288
- [29] Mitchelmore L L, Chipman J K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.*, 1998, 41: 161 ~ 182
- [30] Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, *et al.* Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P-450IA induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar. Environ. Res.*, 1998, 46: 257 ~ 262
- [31] Blasiak K, Jalszynski P, Trzeciak A, *et al.* *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.*, 1999, 445: 275 ~ 283
- [32] Morrison H, Jernstrom B, Nordenskjold M, *et al.* Induction of DNA damage by menadione (2-methyl-1, 4-naphthoquinone) in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33: 1 763 ~ 1 769
- [33] Tafazoli M, Kirschr Volders M. *In vitro* mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 1996, 371, 185 ~ 202

## DEVELOPMENT AND APPLICATION OF COMET ASSAY FOR DETECTING GENOTOXIC SUBSTANCES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

Chen Ying<sup>1</sup> Wang Lei<sup>2</sup> Wang Zjian<sup>1†</sup>

(1 *Research Center for Eco-Environmental Science, Beijing 100085, China*)

(2 *The Administrative Center for China's Agenda 21, Beijing 100089, China*)

**Abstract** COMET assay is a newly developed technology for detecting DNA damage on single cell level. Recently and after continues modification, the assay has been successfully modified to detect several DNA damages and become a sensitive biomarker. It also plays a more and more important role in identifying genotoxic substances from environmental sample, elucidating mechanisms of carcinogenicity, as well as biomonitoring environmental pollution. COMET technology has also been applied in environmental toxicology and risk assessment. In this paper, the origination and modification, environmental applications, and future trends are reviewed, for the benefits of utilization, data interpretation, and contributing to its further development by Chinese scientists.

**Key words** COMET assay; Genotoxic effect; Environment; Review