

邓雅斌, 杨玉荣. 2007. 利用秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 监测厦门岛海水水质 [J]. 环境科学学报, 27(6): 1034-1037

Deng Y B, Yang Y R. 2007. Use of *Caenorhabditis elegans* as a pollution biosensor in Xiamen Seawater [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 27(6): 1034-1037

利用秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 监测厦门岛海水水质

邓雅斌, 杨玉荣*

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

收稿日期: 2006-09-19 修回日期: 2007-03-16 录用日期: 2007-04-20

摘要: 采用野生型秀丽小杆线虫与带有 hsp16 启动子的转基因虫株分别对厦门岛附近 5 个站位的表层水样污染程度进行了监测, 并将致死率和染色率的检测结果进行比较。结果表明, 秀丽小杆线虫的致死率和染色率具有相关性。应用模式生物秀丽小杆线虫对环境及污染物的监测的方法可行, 用转基因的秀丽小杆线虫能够提高检测的灵敏度, 缩短检测时间。

关键词: 线虫; 海洋污染; 致死率; HSP; 转基因

文章编号: 0253-2468(2007)06-1034-04 中图分类号: X832 文献标识码: A

Use of *Caenorhabditis elegans* as a pollution biosensor in Xiamen Seawater

DENG Yabin, YANG Yuong*

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005

Received 19 September 2006 received in revised form 16 March 2007; accepted 20 April 2007

Abstract *Caenorhabditis elegans* was applied as a pollution biosensor because of its small size, high fecundity and short generation time. Its mortality is a biomonitoring criterion which indicates the degree of pollution. In this study, both the mortality of the wild-type worm and the staining of a transgenic strain were used to test the quality of surface water samples from five stations in the Xiamen sea area. Comparison of both results show that mortality and staining were correlated. Using *C. elegans* stress-inducible transgenic worms as biosensors could shorten the testing time and improve the sensitivity of environmental monitoring.

Keywords nematode; sea pollution; mortality; HSP; transgenic

1 引言 (Introduction)

水源与人类的生产生活关系密切。一般对环境水质污染程度的检测多采用化学的方法, 如 ICP/ES 技术、ICP-MS 技术、原子吸收光谱法等对水体进行分析。但应用这些方法进行污染监测有许多缺点, 如: 样品处理时间长, 方法繁琐, 且大都只能对某几种物质含量作出分析, 不能反映几种物质共同作用时对生物体的联合效应。而生物监测弥补了上述化学方法的不足。

秀丽小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是一种国际公认的模式生物, 为多细胞生物。其结构简单、

遗传背景清楚, 生活周期短, 可在实验室大量培养, 能够排除通常使用贝类、鱼类、藻类等现场采集的动植物由于个体差异造成的误差, 有利于生物监测的标准化与规范化, 可用于毒理学研究和作为生物感受器应用于环境污染的检测研究。加之秀丽小杆线虫全基因组序列已知, 可利用分子生物学技术对其进行改造, 因而可发展出敏感性不同、适用于不同污染程度的超敏或低敏的虫株。

通常生物监测多采用致死率、繁殖能力等作为评价污染程度的指标, 将分子生物学技术运用于生物监测中可以大大提高生物监测器的灵敏度, 缩短检测时间。生物体受到化学等不良条件的刺激会导

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30370695)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30370695)

作者简介: 邓雅斌 (1982-), 女, 硕士研究生, E-mail: in_dyl@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yryang@xmu.edu.cn

Biography: DENG Yabin (1982-), female, E-mail: in_dyl@163.com; * **Corresponding author:** E-mail: yryang@xmu.edu.cn

致热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 的大量表达 (孙卫忠等, 2003; Wah C K *et al.* 2002; Lindquist S *et al.*, 1988), HSP 的表达程度可以作为环境污染程度的指示 (Fire A, 1986). Hsp16 是生物体受到重金属毒性等刺激时会大量表达的热激蛋白, 由 Hsp16 启动子控制的带有 lacZ 报告基因的转基因秀丽小杆线虫可大大提高其作为生物感受器的敏感度. 当这种转基因秀丽小杆线虫暴露于上述的劣性环境中时, 就会激活热激蛋白转录因子与 Hsp16 的启动子结合, 从而诱导 β -半乳糖苷酶的表达; 通过染色可迅速检测 Hsp16 的表达程度, 从而用作污染的生物监测器. 因此, 上述生物方法成为一种快速分析亚致死量的方法 (Guvén K, 1994; Dennis J L *et al.*, 1997).

目前, 国外对 *C. elegans* 的基因调控、生长发育以及细胞信号转导方面的研究比较多, 对于用其作为生物监测器并应用于实践的研究还比较少. 水体的生物监测用藻类、鱼、贝类等水生动植物检测环境污染的较多见, 少有使用线虫的 (柯翎, 2004; Tatara C P, 1997; 林建清等, 2003), 而将转基因的秀丽小杆线虫作为生物监测器, 应用于水体污染实际监测国内外鲜见报道. 本文初步尝试将秀丽小杆线虫应用于实际环境, 对厦门不同海域的海水进行监测. 用现场采集的水样进行生物致死率和染色率实验, 以此来指示厦门附近海水的的海水质量, 旨在为进一步将秀丽小杆线虫运用于环境的生物监测提供实验基础.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料

C. elegans N2 野生型和转基因虫株 PC72 及大肠杆菌 OP50 由 CGC (Caenorhabditis Genetics Center) 提供, 培养、接种器皿经严格消毒.

按 Daniells C (1998) 的方法在含有 OP50 的 NGM 平板上 25°C 条件下培养和繁殖虫株. 戊二醛、NaCl LB X-gal 多聚赖氨酸均购自华舜公司. K 溶液根据 Daniells C 法配制.

2.2 采样点

采样点见图 1, 其中 A 号站位为厦门西港的主要港区, B 号站位为厦门市工业污水和生活污水的主要排污口的外侧, C 号站位为厦门旅游风景区渡口, D 号站位为教育单位, E 号站位为文昌鱼保护区. 采样时间为 2005 年 12 月 1 日. 海水过滤后一部

分用于测定 *C. elegans* N2 野生型致死率, 另一部分用于对转基因虫株 PC72 染色.

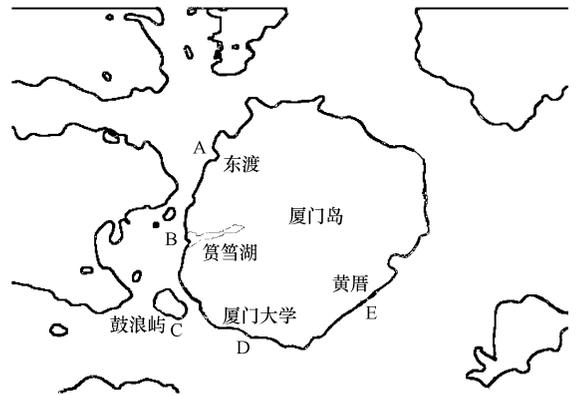


图 1 厦门岛表层水样采样站位

Fig 1 Sampling stations in Xiamen

2.3 方法

2.3.1 线虫的收集 用 1 mL K 溶液冲洗培养线虫平板, 收集虫子至 15 mL 离心管中, 在 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 2 min, 弃上层液体, 加入 5 mL K 溶液, 再次离心洗涤, 重复 4~5 次, 至上清透亮无琼脂及其它杂质.

2.3.2 *C. elegans* N2 的致死率统计 将按上述方法收集的 *C. elegans* N2 线虫稀释至每毫升 2000~4000 条, 混匀后吸取 50 μL 溶液置于培养皿中, 加入 10 μL 大肠杆菌 OP50 和 1940 μL 采集过滤的水样, 对照组加入洁净海水, 统计培养皿中的线虫数. 48 h 后加入 1 mL 蒸馏水, 静置 5 min, 然后轻轻摇晃培养皿使所有线虫活动起来, 在解剖镜下观察并记录线虫的死亡数 (当线虫完全不动并对针尖刺激不再有明显反应即认为该虫已死) 和存活数, 用式 (1) 计算致死率 η

$$\eta = N_D / (N_D + N_F) \times 100\% \quad (1)$$

式中, N_D 、 N_F 分别为死亡数目和存活数目. 实验数据为每次试验同一样品做 3 组重复取平均数, 整个试验重复 8 次所得.

2.3.3 转基因虫株 PC72 的染色率统计 将收集的 PC72 虫体稀释至每毫升 5000~8000 条, 混匀后吸取 20 μL 线虫分别加入 96 孔酶标板, 每孔各加入 1 μL 大肠杆菌 OP50 以及 180 μL 过滤海水, 对照组加入洁净海水. 8 h 后, 用 Fire (1986) 的方法染色, 显微镜下观察和统计染色情况, 用式 (2) 计算染色率 w . 实验数据为每次试验同一样品做 3 组重复取平均数, 整个试验重复 8 次所得.

$$w = n_r / (n_w + n_r) \times 100\% \quad (2)$$

式中, n_r 、 n_w 分别为染色虫体数目和未染色虫体数目。

2.3.4 数据分析 数据采用统计软件 SPSS 10.0 分析。用方差分析检验各站位与空白对照组相比在 0.05 的水平上是否有显著差异。

3 结果 (Results)

3.1 野生型秀丽小杆线虫 N2 对水样的监测

以从上述站位取得的表层 1m 处的水样处理 N2 野生型秀丽小杆线虫, 以洁净海水作为空白对照, 统计致死率。同时, 将方差分析结果列于表 1 表中的数据为整个试验重复 8 次所得的平均值。

表 1 不同采样点海水对 N2 线虫的平均致死率

Table 1 Mortality of N2 in different water samples

站位	致死率	标准差 SD
A	27.7%*	4.7%
B	29.4%*	4.3%
C	21.9%*	2.3%
D	21.2%*	3.7%
E	12.9%*	3.0%
空白	1.9%	1.4%

* $p < 0.05$

3.2 转基因秀丽小杆线虫 PC72 对水样的监测

以从上述站位取得的表层 1m 处的水样处理转基因秀丽小杆线虫 PC72 虫株 8h 而后染色, 以洁净海水作为空白对照, 统计染色率。同时, 将方差分析结果列于表 2 表中的数据为整个试验重复 8 次所得的平均值。

表 2 不同采样点海水对线虫 PC72 的染色情况

Table 2 Staining of PC72 in different water samples

站位	染色率	标准差 SD
A	42.1%*	3.6%
B	47.5%*	4.4%
C	29.4%*	3.6%
D	30.8%*	5.0%
E	16.7%*	3.0%
空白	3.0%	1.0%

* $p < 0.05$

海水处理转基因线虫 PC72 后进行 X-gal 染色, 身体会出现蓝色的斑点见图 2 这些斑点主要位于: 咽 (图 2B)、侧器 (图 2C)、肠道 (图 2D)、胚胎 (图 2E)、生殖腺 (图 2F)。

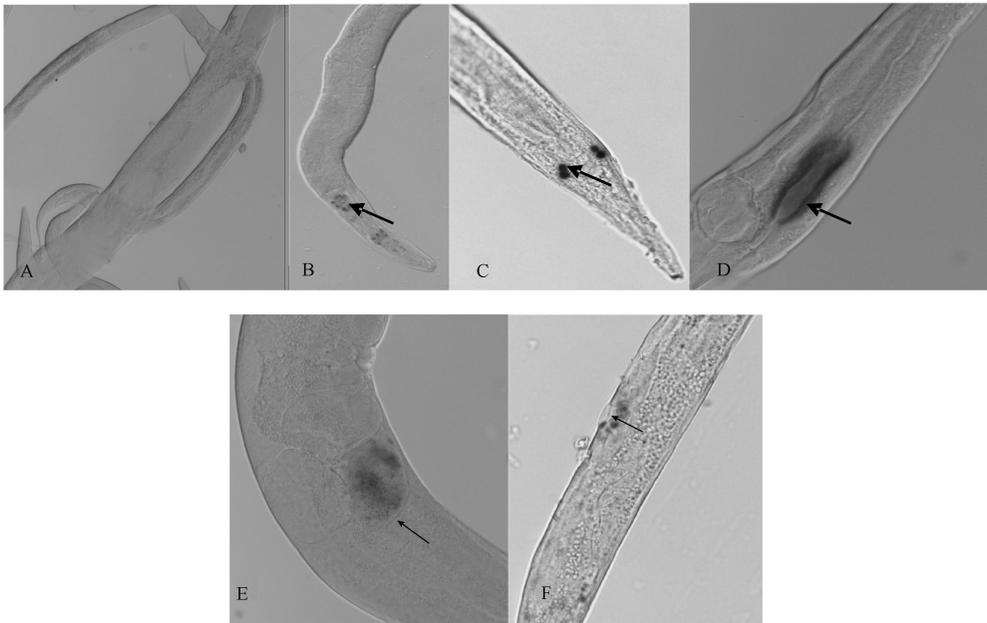


图 2 水样处理的转基因 *C. elegans* PC72 的染色 (A 空白对照; B~F 海水处理后的转基因线虫 PC72 的染色)

Fig 2 Staining of transgenic worms PC72 exposed to water samples (A control, B~F Staining of transgenic worms PC72 exposed to sea water samples. Arrow shows staining)

3.3 致死率与染色率相关分析

染色率和致死率所得结果均表明, A 号站位和

B 号站位污染最为严重。用统计分析软件 SPSS 对致死率与染色率结果进行相关分析, 发现致死率和染

色率之间具有显著的相关关系 (Spearman 相关系数 $r = 0.943$, $p < 0.01$).

4 讨论 (Discussion)

4.1 野生型秀丽小杆线虫 N2 对水样的监测

上述实验结果表明, 空白组的致死率为 1.9%, A 号站位的致死率为 27.7%, B 号站位致死率为 29.4%, 线虫致死率最高, C 号站位致死率为 21.9%, D 号站位的致死率为 21.2%, E 号站致死率为 12.9%. 将不同站位海水处理线虫所得的致死率与空白对照进行比较, 两者均有显著性差异, 可认为各采样点海水与空白对照比较对线虫的致死率有明显不同.

其中 A 号站位和 B 号站位的线虫致死率最高, 说明 A 号和 B 号站位水质最差, A 号站位是厦门的港区, B 号站位位于厦门市工业污水和生活污水主要排放口的外侧. C 号站位和 D 号站位的致死率虽低于 A、B, 但都略高于 E 号站位 (致死率为 12.9%). E 号位点水质污染程度比较低.

4.2 转基因秀丽小杆线虫 PC72 对水样的监测

将不同站位海水处理线虫所得的染色率与空白对照进行比较, 两者均有显著性差异, 可认为各采样点海水与空白对照比较对线虫的染色率有明显不同. 其中, 污染程度越高的水样, 处理的转基因线虫 PC72 的染色率越高, 染色程度也越深.

由于厦门近年来海水质量大为改善, 污染程度大大减少, 所以将处理时间适当延长至 8h, 当污染比较严重时, 时间还可以进一步缩短至 2h (Tatara C P *et al.*, 1997). 转基因虫株的监测试验中, 染色 15min~1h 就可看到比较明显的结果, 因此, 检测时间大大缩短, 短于 48h 致死的急性毒性试验. 应用转基因线虫毒害后染色的方法, 灵敏度明显高于常规的通过致死率来指示水质污染程度的方法.

由上述研究可知, 采用模式生物 *C. elegans* 的转基因线虫作为环境监测的指示生物具有如下的优势: 首先, 与现场采集藻类或贝类等方法相比, 它具有费用低、操作简便的特点, 能直观、有效、快速地评价厦门海域不同站位表层水样的水质综合质量, 可以用作环境的生物监测; 其次, 结合分子生物学方法产生的转基因虫株, 可以大大提高监测的灵敏度, 缩短监测所需的时间.

根据实验结果, 应用模式生物秀丽小杆线虫对环境及污染物的监测的方法可行, 用转基因的秀丽小杆线虫能够提高检测的灵敏度, 缩短检测时间.

通讯作者简介: 杨玉荣 (1965—), 女, 副教授, 博士. 2001.2~2002.4 在美国哈佛大学进修 *C. elegans* 发育生物学, 目前主要从事 *C. elegans* 等研究.

References

- Daniels C, Duce I, Thomas D, *et al.* 1998. Transgenic nematodes as bio monitors of microwave-induced stress [J]. *Mutation Research*, 399: 55—64.
- Dennis J L, Mutwakil M, Lowek C, *et al.* 1997. Effects of metal ions in combination with a non-ionic surfactant on stress responses in a transgenic nematode [J]. *Aquatic Toxicology*, 40: 37—50.
- Fire A. 1986. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Embo Journal* 5: 2673—2680.
- Guvan K, Duce J, Panerai D I. 1994. Evaluation of a stress inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing [J]. *Aquatic Toxicology*, 29: 119—137.
- Ke L. 2004. The Acute Toxicity of Four Heavy Metals to *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 4 (3): 133—135 (in Chinese).
- Lin J Q, Hong H S, Wang X H. 2003. Malformation rate of the developing fish embryo of *Plecotrhinchus cinctus* to indicate marine environment quality [J]. *Marine Environmental Science* 2: 25—28 (in Chinese).
- Lindquist S, Craig N E. 1988. The heat shock protein [J]. *Annu Rev Genet* 22: 671—677.
- Sun W Z, Li B, Wang Y W, *et al.* 2003. The Progress of The Heat Shock Protein [J]. *New letter of Sericultural Science*, 23(1): 21—27 (in Chinese).
- Tarcea C P, Newman M C. 1997. Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions *Caenorhabditis elegans* LC50 [J]. *Aquatic Toxicology*, 40: 37—50.
- Wah C K, Chow K L. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative [J]. *Aquatic Toxicology*, 61: 53—64.

中文参考文献

- 柯翎. 2004. 4种重金属离子对秀丽小杆线虫急性毒性研究 [J]. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 4(3): 133—135.
- 林建清, 洪华生, 王新红, 等. 2003. 厦门西港海水质量对鱼卵胚胎发育畸形率的影响 [J]. *海洋环境科学*, 22(2): 25—28.
- 孙卫忠, 李斌, 王彦文, 等. 2003. 热激蛋白研究进展 [J]. *蚕学通讯*, 23(1): 21—27.