

用秀丽小杆线虫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, 福建 厦门 361005)

摘要: 首次采用野生型秀丽小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 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, 二者研究结果具有相关性, 但采用转基因秀丽小杆线虫大大缩短了监测时间, 提高了灵敏度。这是国内应用模式生物秀丽小杆线虫对环境及污染物的监测研究的首次报道。

关键词: 线虫; 海洋污染; 致死率; HSP 转基因

中图分类号: X832 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2007)06-0527-03

Biomonitor of pollution in seawater in Xiamen using *Caenorhabditis elegans*

DENG Ya-bin, YANG Yu-rong

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The recent biomonitoring was in focus of the environment research. *Caenorhabditis elegans* was applied for the biomonitor of pollution in small size, high fecundity and short generation time. The monitor depth of pollution in seawater is normally using the mortality. Our study is first used both N2 mortality and transgenic strain at five station of surface water in Xiamen Sea Area. Comparing both results found that the mortality and staining have the correlation. *C. elegans* stress-inducible transgenic worms as a biosensor could be shorten the test time and improved the sensitivity. This is first report on the biomonitor of environmental pollution in China using *C. elegans*.

Key words *C. elegans*; marine pollution; mortality; HSP transgenic

环境污染监测中仅从水样的化学成份来评价水质的综合质量, 是无法评价各成分的联合作用效果, 因而具有局限性, 生物监测弥补了这方面的不足。

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, 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^[1-3]不良条件的刺激会导致热休克蛋白

(heat shock protein, HSP) 的大量表达, HSP 的表达程度可以作为环境污染程度的指示^[4]。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, 成为一种快速分析亚致死量的方法^[5-6]。

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中还比较少。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^[7-9], 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未见报道。本文初步尝

* 收稿日期: 2006-01-20, 修订日期: 2006-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370695)

作者简介: 邓雅斌 (1982-), 女, 湖南双峰人, 厦门大学硕士研究生, 主要研究方向为重金属等对 *Caenorhabditis elegans* 的影响。

试将秀丽小杆线虫应用于实际的环境检测,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质量。本研究为进一步将秀丽小杆线虫运用于环境的生物监测提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

C. elegans N2 野生型和转基因虫株 PC72(vb1s5)及 OP50 由 CGC 提供,培养、接种器皿经严格消毒。

按 CHRISTOPHER PT^[10]的方法在含有 OP50 的 NGM 平板上 25℃ 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 CHRISTOPHER P 的方法配制。

1.2 采样位点

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放口的外侧, C 号站位为厦门旅游风景区, 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。海水过滤后一部分以 N2 计算致死率,另一部分用 PC72 染色。



图 1 厦门岛表层水样采样站位

Fig 1 Sampling stations in Xiamen

1.3 方法

1.3.1 线虫的收集

用 1 mL K 溶液冲洗培养线虫平板,收集虫体至 15 mL 离心管中,3 000 r/min 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他杂质。

1.3.2 *C. elegans* N2 的致死率统计

将按上述方法收集的 N2 线虫稀释至 2 000~4 000 条/mL,混匀后吸取 50 μ L N2 秀丽小杆线虫入培养皿中,加入 1 μ L OP50 和 1 960 μ L 采集过滤的水样,对照组加入 0.3 mol/L NaCl 溶液统计指管中的线虫数。48 h 后,加入 1 mL 蒸馏水,静置 5 min,轻轻摇晃培养皿,使所有线虫活动起来,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,用死亡数目/(死亡数目+存活数目)计算致死率,重复 10 次。

1.3.3 转基因虫株 PC72 的染色

将收集的 PC72 虫体稀释至 5 000~8 000 条/mL,混匀后吸取 20 μ L 线虫分别加入 96 孔酶标板,每孔各加入 1 μ L OP50 以及 180 μ L 过滤海水,对照组加入 0.3 mol/L NaCl 溶液。8 h 后,用 Fire^[10]的方法染色,观察和统计染色情况,实验数据为重复 8 次所得。

1.3.4 数据分析

数据采用统计软件 SPSS 分析。

2 结果与讨论

2.1 野生型秀丽小杆线虫 N2 对水样的监测

从上述站位取得的表层 1 m 处的水样处理 N2 的秀丽小杆线虫,由于所采集的水样均是近海表层水,所以以 0.3 mol/L NaCl 作为空白对照,统计致死率,结果见表 1。

表 1 不同采样点海水对 N2 线虫的致死率

Tab 1 Mortality of N2 in different water samples

| 站位 | 致死率/(%) |
|----|---------|
| A | 27.7 |
| B | 29.4 |
| C | 21.9 |
| D | 21.2 |
| E | 12.9 |
| 空白 | 1.9 |

* 表明与空白对照组相比差异显著

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%)的线虫致死率最高, 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比较均有显著性差异,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 号点水质污染程度比较低。

2.2 转基因秀丽小杆线虫 PC72 对水样的监测

我们从上述站位取得的表层 1 m 处的水样处理转基因秀丽小杆线虫 PC72 虫株 8 h 而后染色,由于所采集的水样均是近海表层水,所以以 0.3 mol/L NaCl 作为空白对照,统计染色率,结果见表 2。

结果表明空白中基本没有染色,只有约 3% 的虫子表现出极其微弱的蓝色。将不同站位海水处理线虫染色后的染色率与空白对照相比有显著性区别,可以认为各采样点海水与空白对照对线虫的染色率不同。其中 A 号站

表 2 不同采样点海水对线虫 PC72 的染色情况

Tab. 2 Staining of PC72 in different water samples

| 站位 | 染色率 / (%) |
|----|-----------|
| A | 42 f |
| B | 48 0 |
| C | 29 f |
| D | 30 8 |
| E | 16 7 |
| 空白 | 3 0 |

* 表明与空白对照组相比差异显著

位和 B 号站位的染色率最高, 超过 40%, 说明这两处的水质最差, A 号站位是厦门的主要港区, B 号站位位于厦门市工业污水和生活污水的主要排放口的外侧。C 号站位和 D 号站位的染色率比较低, 但都高于 E 号站位, 表明 C、D 号站位也有一定污染程度, 提示我们在开发旅游的同时还要防治一些人为因素对水质的破坏。

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, 这些斑点主要位于: 咽、侧器、肠道、胚胎、生殖腺。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。

2.3 致死率与染色率相关性分析

通过染色率和致死率所得结果均发现 A 号站位和 B 号站位污染最为严重, 而 C、D 稍好, E 的污染程度最小。用统计分析软件 SPSS 对致死率与染色率结果进行相关性分析得到表 3。

表 3 不同采样点的致死率和染色率相关性分析

Tab. 3 Correlation between mortality and staining

| | 致死率 | 染色率 | |
|-----|-------|--------|--------|
| 致死率 | R | 1 | 0.951* |
| | 双侧显著性 | | 0.003 |
| | n | 6 | 6 |
| 染色率 | R | 0.951* | 1 |
| | 双侧显著性 | 0.003 | |
| | n | 6 | 6 |

** 相关系数在 0.01 的水平 (双侧) 具有显著性

由上表可见, 相关系数 $R = 0.951, P < 0.01$ 相关系数在 0.01 的水平 (双侧) 具有显著性, 因而可以认为致死率和染色率之间具有直线相关关系。

3 结论

试验结果表明 A 号站位东渡和 B 号站位西堤的水样处理线虫得到的致死率和染色率最高, 说明 A 号站位和 B 号站位的水质最差, A 号站位是厦门的主要港区, B 号站位位于厦门市工业污水和生活污水的主要排放口的外侧。C、D 号站位也有一定污染程度, 提示我们在开发旅

游的同时还要防治一些人为因素对水质的破坏。

转基因虫株的监测试验中仅需处理 8 h 染色 15 min ~ 1 h 就可看到比较明显的结果, 检测时间大大缩短, 短于 48 h 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的污染程度。由于厦门近年来海水质量大为改善, 污染程度大大减少, 所以处理时间适当延长至 8 h。

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, 与现场采集藻类或贝类等方法相比, 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。同时由于 *C. elegans* 既能生活在液体中又能生活在固体中, 因而不仅能用于水体污染的监测, 还可以应用于固体介质比如泥土等污染的评价。

参考文献:

[1] 纪灵, 陈福, 刘昌文, 等. 海洋污染监测在海洋环境保护中的地位与作用 [J]. 海洋开发与管理, 2004, 3: 48-50.

[2] WAH C K, CHOW K L. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 61: 53-64.

[3] LINDQUIST S, CRAIG N E. The heat shock protein [J]. Annual Rev Genet 1988, 22: 671-677.

[4] FREY A. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans* [J]. EMBO J 1986, 5: 2673-2680.

[5] GUVEN K, DUCE J, POMERAI D I. Evaluation of a stress inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing [J]. Aquat Toxicol 1994, 29: 119-137.

[6] DENNIS J L, MUTWAKIL M H A Z, LOWE K C, et al. Effects of metal ions in combination with a non-ionic surfactant on stress responses in a transgenic nematode [J]. Aquat Toxicol 1997, 40: 37-50.

[7] 柯翎. 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, 2004, 43: 133-135.

[8] TATARA C P, NEWMAN M C. Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions *Caenorhabditis elegans* LC50 [J]. Aquatic toxicology 1997, 40: 37-50.

[9] 林建清, 洪华生, 王新红, 等. 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, 2003, 2: 25-28.

[10] CHRISPTOHER P T, MICHAEL C N. Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions *Caenorhabditis elegans* LC50 [J]. Aquatic toxicology 1997, 40: 37-50.