

在 BWV 中嵌合胚的发育效果不够理想。后来在进行正式实验时将 BSA 的添加量从 1mg/ml 增加到 5 mg/ml, 与此同时还增加了 PBS + FCS 培养液组合, 以便找出组成更简单的发育用培养液。实验结果在 6 个处理组中嵌合胚的发育率均很高。在整个实验中约有 7—12% 的聚合胚未能正常发育, 其中有的是组成聚合胚的一方发育而另一方不发育, 有的则双方均不发育, 但还能保持彼此之间的连接而成联体。这些现象可能与聚合用胚胎的损伤或胚胎质量有关, 有的胚胎从外形上看不出异常, 然而可能有某种内在的因素使其不能正常发育。

本文以与供体非同步的即晚 24 小时假孕处理的雌鼠为受体所进行的实验, 受胎率和嵌合胚的存活率分别为 58% (33—100%) 和 17% (7—48%), 说明用本文采用的方法制作的嵌合胚发育率不仅较高, 而且能够发育为正常的个体。另外, 在出生的嵌合体小鼠中雄性比例高于雌性, 与横山峯介^[7]的报道相一致。这是因为 XY 胚胎上的 H-Y 抗原的雄性化作用, 使得 XX-XY 嵌合体向雄性发育的结果。

摘 要

本研究采用人工聚合技术, 将小鼠不同品系和同品系之间的 8 细胞胚聚合为一体, 分别

用 PBS + FCS、BWV 和 BMOC-III 培养 20—24 小时后观察了发育率。其结果在昆明白 \leftrightarrow C57 中分别有 88.1% (59/67)、95.0% (115/121) 和 94.8% (73/77), 在昆明白 \leftrightarrow 昆明白中分别有 93.3% (28/30)、87.7% (121/138) 和 86.7% (52/60) 的嵌合胚发育为桑椹胚或胚泡, 各处理组之间无显著差异。将 141 枚嵌合胚分别移植给 12 只受体, 结果有 7 只小鼠妊娠共产仔 25 只。在昆明白 \leftrightarrow C57 的 17 只嵌合体小鼠中毛色为黑、白和杂色的各有 3、4 和 10 只。

参 考 文 献

- [1] Tarkowski, A. K., 1961, *Nature*, 190: 857-860.
- [2] Mintz, B., 1964, *J. Exp. Zool.*, 157: 85-100, 273-292.
- [3] Gardner, R. L., 1968, *Nature*, 220: 596-597.
- [4] 菅原七郎, 1986, 哺乳動物の発生工学実験法, 190-200, 学会出版社センター。
- [5] 大沢伸昭、館鄰等, 1984, 哺乳類の発生工学, 140-149, リフトサイエンス社。
- [6] 妹尾左知丸等, 1981, 哺乳動物の初期発生, 359-366, 理工学社。
- [7] 横山峯介, 1984, 家畜繁殖学雑誌, 5: 54-60.
- [8] 李幼兰等, 1982, 细胞生物学杂志, 3: 34-36.

环氧树脂 618 和 Epon 812 引起鼠伤寒沙门氏

菌株细胞突变的超微结构研究

戴志强 俞月桂 袁幸菊

(中国科学院上海药物研究所)

环氧树脂因其良好的聚合效果和抗电子轰击稳定性而成为透射电镜生物试样的理想包埋剂。然而近年发现 13 种环氧树脂包埋剂具有致突变性^[1], 因而它们的遗传毒性引起了生物电镜工作者的普遍关注。根据我国卫生部颁布的

《新药审批办法》规定, 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验) 是检测化合物致突性的首选试验。以此, 我们检测了国内电镜实验室

本所病理组协助 Ames 试验, 特此致谢。

使用最为普遍的环氧树脂 618 和 Epon 812 的致突变作用。为了深入研究的需要,检测前后,对鼠伤寒沙门氏菌作透射电镜制样并作超微结构观察。

材料和方 法

化合物 环氧树脂 618(Bisphenol propane epoxy resin 618)分子量 300—700;环氧当量 185—250;粘度 $\leq 2,500$ 厘泊,上海树脂厂产品。Epon 812(Aliphatic ether epoxide, Epon 812)分子量 204;环氧当量 150—175;粘度 150—210 厘泊,系日本和光纯药株式会社产品。另选用已经确定不需要代谢激活的 TA 98、TA 100 诱变剂硝基奎诺灵(p-Nitroquinoline 200 $\mu\text{g}/\text{皿}$)以及甲基甲烷磺酸酯(Methyl methanesulfonate, MMS 10 $\mu\text{l}/\text{皿}$)作为阳性反应指示剂,用以鉴定实验结果的可靠性。

菌株 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)组氨酸缺陷型突变菌株 TA 98、TA 100 原引自 Ames 实验室,并按 Ames 法对菌株基因作重复鉴定。其中 TA 98 用于检出移码突变的诱变剂;TA 100 则可检出碱基置换突变的诱变剂。

方 法 诱变试验均采用 Ames 等的方法^[2]。鉴于环氧化物属烷化剂,对细胞有直接作用^[3],其致变与否并不依赖哺乳动物肝微粒体酶系(S-9)的激活^[4],故省略 S-9 的诱导试验。对 TA 100 突变株及其经环氧树脂及 MMS 作用后的回变株分别取样,按透射电镜常规技术固定、脱水、包埋、切片,经醋酸铀、枸橼酸铅染色后,在 H-500 电镜下观察摄片。

实 验 结 果

受检的两种环氧树脂首先作斑点试验。结果显示,对 TA 98 无致突变性;对 TA 100 均呈阳性,可见点样周围长出一圈密集的回变菌落。而后作平板渗入试验,受试环氧树脂浓度从 10 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 起 10 倍递增;每一剂量测试 3 皿,计算其回变菌落数 $\bar{X} \pm \text{SD}$, 该 \bar{X} 值大于自发回变数 2 倍以上为阳性。实验结果见表 1。对于 TA 98 菌株,环氧树脂 618 无致突变性;Epon 812 在 10000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 浓度时呈现诱变作用。对于 TA 100 菌株,两种环氧树脂的致突变剂量均为 1000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。

电镜观察结果显示,TA 100 株的细胞壁较厚,可见 3 个致密层及中间透明区所组成。细胞质膜可见 2 个致密层。胞壁与质膜一般平行走向,稍有间隙。胞浆内充满核糖体颗粒;核区电子密度低(图版图 1)。TA 100 株经诱变剂硝基奎诺灵作用后,细胞壁可见 2—3 个致密层,胞壁、质膜曲折起伏。胞壁与质膜间有时可见较大间隙。胞浆内充满了均匀分布的核糖体颗粒,核区不明显(图版图 2)。经环氧树脂 618 作用后的 TA 100 株细胞壁有 3 个致密层,质膜有 2 个致密层。胞浆内核糖体颗粒较稀疏,核区明显且广泛。有的浅亮区域几无结构;有的则见空泡及有膜囊泡,囊泡中偶而见有少许丝状物质(图版图 3)。TA 100 株在 Epon 812 的作用下亦见有在环氧树脂 618 作用下的类似结构出现(图版图 4)。在不同的剂量浓度下,受试环氧树脂所致的结构变化无显著差异。

讨 论

根据环氧树脂 618 和 Epon 812 不同浓度所致的 TA 100 株及 TA 98 株的回复突变值,表明它们都是直接致突变剂。但两者作用的特定基因座位不同。Epon 812 除了引起 TA 100 株产生碱基置换突变外,还能引起 TA 98 株发生移码突变。环氧树脂 618 对 TA 98 株无致突变性。Ringo^[1]等研究了若干酚基类环氧化物的致突变作用,认为此类环氧树脂的致突变性不随分子量的改变而变化,与脂族醚环氧树脂 Epon 812 的致突变性相比,强于后者 30 倍(回复突变数/毫微克分子)。环氧树脂 618 系国产双酚基丙烷类环氧化物,有关其致突变试验尚未见有报道。本实验提示,在 1000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 以下范围(大于此剂量会产生沉淀),其致突变性虽大于 Epon 812,但与后者基本上是同一数量级,其致突变性在电镜包埋剂中属较低行列^[1]。

TA 100 株经 MMS、环氧树脂 618 及 Epon 812 分别作用后,其回复突变株的细胞形

表1 二种环氧树脂对TA 98、TA 100的直接诱变比较(回变菌落数/皿)

品系	剂量 μg/皿	Epon 812	环氧树脂 618	阳性 对照
TA 100	0	138±29	138±29	
	10	139±16	202±2	
	100	181±43	244±10	
	1,000	297±45	628±31	
	10,000	1,679±187	*873±47	
	10 μl/皿			786±23
TA 98	0	20±7	20±7	
	10	17±1	21±1	
	100	21±5	24±8	
	1,000	27±8	31±3	
	10,000	71±4	34±5	
	200			537±73

*已产生沉淀。

态均呈现不同于TA 100突变株及TA 100野生株^[5]的超微结构变化,但它们的作用机理不尽一致。MMS主要作用于胞壁和质膜。两种受试环氧树脂主要作用于胞浆。从TA 100株的形态结构分析,胞浆内的浅亮部分属核区的一部分,而核区正是DNA丝状结构的所在地。考虑到环氧树脂具有活泼的环氧根基团,它能够通过共轭结合使细胞的DNA断裂、受损。因此TA 100回复突变株细胞胞浆中有较多浅亮区域以及有空泡、囊泡出现可能是环氧树脂618及Epon 812烷化作用的形态表现。而烷化作用的结果往往引起致突变、致癌事件的发生^[6]。

流行病学的研究表明,美国电镜学会会员的癌症发病率偏高^[7]。以往电镜工作者注重X线辐射泄漏的影响^[7,8]。事实上环氧树脂不仅

能诱发接触性皮炎等致敏反应,若干电镜包埋剂的致癌性也已经动物试验证实^[9]。因此,对于致突变试验确认阳性的电镜包埋剂应视为潜在的致癌剂而加以防范。需要特别指出,稀释剂的存在使环氧树脂的通透细胞壁的能力增强,从而增加致突变、致癌的危险性。因此电镜制样应避免包埋剂直接接触及皮肤;用丙酮等有机溶剂揩擦手上污染的环氧树脂必须禁止。

摘 要

电镜实验室常用包埋剂环氧树脂618和Epon 812经Ames检测试验,表明两者均为直接致突变剂,它们的致突变性是同一数量级。超微结构观察提示,回变株细胞核区结构发生变异可能是受试环氧树脂烷化作用的结果。对于致突变试验阳性的电镜包埋剂应视为潜在的致癌剂而加以防范。

参 考 文 献

- [1] Ringo, D. L., and E. F. Brennan. et al., 1982, *J. Ultrastruct. Res.*, 80 : 280-287.
- [2] Ames, B. N. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 70(8) : 2281.
- [3] 黄幸纾、陈星若, 1985, 环境化合物致突变、致畸、致癌试验方法, pp 4, 浙江科学技术出版社。
- [4] Wade, M. J. et al., 1979, *Mutat. Res.*, 66 : 367-371.
- [5] 孙纪申, 1986, 中国医学科学院学报, 8(3) : 221.
- [6] Heidelberger, C., 1975, *Annu. Rev. Biochem.*, 44 : 79-121.
- [7] Parson, D. F. et al., 1974, *Health Phys.*, 26 : 439.
- [8] Devanney, J. A., and C. J. Daniels, 1976, *Health Phys.*, 30 : 231.
- [9] Rinkus, S. J., and M. S. Legaton, 1979, in "Chemical mutagens: Principles and methods for their detection", Vol. 6 F. J. Deserres, et al eds., Plenum, New York. pp 365-473.