

8种市售核酸染料的细菌回复突变实验

余文¹ 安琳¹ 陈怡文¹ 任秀¹ 骆海朋¹ 刘娜¹ 崔生辉¹ 李景云¹

¹ 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 探讨溴化乙锭(ethylene dibromide, EB)、GelGreen、GoldView、GeneGreen、SYBRGreen I、GelRed、SYBRSafe、SYBRGold这8种染料的安全性。方法 使用鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102, 依据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)肉汤稀释法测定8种染料的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 依据GB 15193.4—2014进行细菌回复突变试验。结果 SYBRSafe对TA97、TA100有明显的抑菌性, MIC为染料标准工作浓度的6.25倍, SYBRGreen I对4个菌的抑菌性均较为明显, TA97、TA100的MIC值为染料标准工作浓度的1.56倍, TA98、TA102的MIC为染料标准工作浓度的6.25倍。EB及其代谢产物对4个菌均有强致突变性; SYBRGold及其代谢产物对4个菌均未见致突变性; 另外6种染料对TA97、TA98、TA102存在不同程度的致突变性, 对TA100未见致突变性。结论 除EB外, 其余染料在说明书推荐的实验浓度未见致突变性; 但在高浓度时, 除SYBRGold外呈现不同程度的致突变性。

关键词: 核酸染料 安全性 致突变性 食品安全

中图分类号: R155.5 TS202 TS207.4

文献标志码: A

DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2020.06.011

Safety of eight nucleic acid dyes

Yu Wen¹, An Lin¹, Chen Yiwen¹, Ren Xiu¹, Luo Haipeng¹,
Liu Na¹, Cui Shenghui¹, Li Jingyun¹

¹ National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the safety of eight nucleic acid dyes: EB, GelGreen, GoldView, GeneGreen, SYBRGreen I, GelRed, SYBRSafe and SYBRGold. **METHODS** Salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 and TA102 involved in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the 8 nucleic acid dyes by the Broth dilution, which follows Clinical and Laboratory Standards Institute. The experiment tests the reverse mutation of bacteria with the 8 nucleic acid dyes, which follows GB 15193.4-2014. **RESULTS** EB and its metabolites show significant mutagenicity on TA97, TA98, TA100 and TA102. SYBRGold and its metabolites do not show mutagenicity on TA97, TA98, TA100 and TA102. The other six dyes show varying mutagenicity on TA97, TA98 and TA102, meanwhile show no mutagenicity on TA100. **CONCLUSION** This research shows that except EB, the other dyes show no mutagenicity under working concentration, but show varying mutagenicity under high concentration. SYBRSafe and SYBRGreenI are

基金项目: 国家重点研发计划(No. 2018YFC1603900)

作者简介: 余文,女,硕士,助理研究员,研究方向:生物与食品安全, E-mail: 6646227@qq.com

通信作者: 李景云,主任技师,研究方向:生物与食品安全, E-mail: jingyunli50@sohu.com

highly toxic, and the operators must have high precautions when making diluted solution of them.

KEY WORDS: nucleic acid dyes, safety, mutagenicity, food safety

核酸染料在核酸(DNA/RNA)检测中起重要作用。目前使用较为广泛的核酸染料有溴化乙锭(ethylene dibromide, EB)、GelGreen 和 GelRed、GoldView I 型/II 型、SYBRGreen 和 SYBRGold 等。EB 曾是琼脂糖凝胶电泳中最为常用的核酸染料^[1], 具有染色效果好、性质稳定、易储存、价格便宜和操作简便等优点, 但是 EB 可诱发突变、具有潜在致癌性和中等毒性, 严重危害实验人员和环境, 实验结束后需进行特殊处理才能丢弃^[2]。针对 EB 的这一问题的, 市场上涌现出许多新型染料^[3], 这些染料声称安全, 实验室操作人员经常使用, 因此研究其安全性至关重要。鼠伤寒沙门菌回复突变试验(Ames 试验), 是评判化学物质致突变性的重要试验^[4-6]。本研究选择目前常见的 8 种染料: EB、GelGreen、GoldView、GeneGreen、SYBRGreen I 型、GelRed、SYBRSafe、SYBRGold, 采用肉汤稀释法测定其对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并进行细菌回复突变试验, 评价这 8 种染料及其代谢产物的致突变性。

1 材料与方法

1.1 测试菌株、试剂与仪器

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 均由中国医学细菌保藏管理中心提供。EB、2-氨基苄、甲基磺酸甲酯购自 Sigma 公司; 核酸染料产品 GelGreen、GelRed 购自有限公司; 核酸染料产品 GoldView、SYBRGreen I 购自北京公司; 核酸染料产品 GeneGreen 购自北京公司; 核酸染料产品 SYBR Safe、SYBRGold 购自美国 Invitrogen 公司; MH 肉汤培养基购自美国 BD 公司; 底层培养基购自北京三药科技开发公司。PL2002 电子天平(梅特勒托利多公司); MLS-3780 高压灭菌器(日本三洋公司); Thermo 1389 生物安全柜、PR 205050 GCN 生化培养箱(美国 THERMO 公司)。

1.2 最低抑菌浓度测定

依据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)肉汤稀释法^[7], 用 MH 肉汤配制不同浓度(标准工作浓度

的 0.2~50 倍)的染料溶液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌后加入 96 孔板中每孔 195 μL, 每个染料浓度做 2 个平行孔, 另设 MH 肉汤阳性和阴性对照。取 2 代新鲜 Ame's 菌种 TSA 培养物, 用无菌生理盐水配制 1.0~1.5 个麦氏浊度菌悬液, 用生理盐水 1:100 稀释后, 每孔加入 5 μL, 37 °C 有氧培养 20~24 h 后, 肉眼观察每孔是否有微生物生长, 将菌种不生长的最低染料浓度记录为该染料的最低抑菌浓度。

1.3 细菌回复突变试验

依据 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[8]方法配制 S9 混合液。鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100 选择 2-氨基苄作为阳性物, TA102 选择甲基磺酸甲酯作为阳性物。根据 1.2 中 MIC 测定结果选择染料的测试浓度。每组实验均重复 2 次。

2 结果

2.1 最低抑菌浓度

如表 1 所示, SYBRGreen I 对 4 个菌种均呈现一定程度的抑菌性, 对 TA97 和 TA100 的 MIC 为染料标准工作浓度的 1.56 倍, 对 TA98 和 TA102 的 MIC 为染料标准工作浓度的 6.25 倍; SYBRSafe 对 TA97 和 TA100 呈现一定程度的抑菌性, MIC 为染料标准工作浓度的 6.25 倍; 其余 MIC 值均大于或等于染料标准工作浓度的 50 倍。依据上述结果设计了细菌回复突变试验使用的测试浓度。

2.2 对 TA97 的致突变测试结果

如表 2 所示, GelRed 和 GoldView 在最高测试浓度(50 倍)并添加 S9 时, 回复突变菌落数大于对照组数值的 2 倍, 且实验结果具有可重复性, 说明 GelRed 和 GoldView 浓度为 50 倍时, S9 活化代谢产物对 TA97 有致突变性。EB 浓度为 5.6、16.7 和 50 μg/mL 时, 加或不加 S9 均有致突变性。其余染料在测定浓度范围内对 TA97 均未见致突变性。

2.3 对 TA98 的致突变性结果

由表 3 可见, SYBR Green I 在浓度为推荐浓度的 1.1 倍且添加 S9 时, TA98 的回复突变菌落数大于未处理对照组的 2 倍, 而在推荐浓度 3.3 倍时, 无论是否添加 S9, 回复突变菌落数均大于

表 1 8 种核酸染料最低抑菌浓度(染料标准工作浓度的倍数)

染料	最低抑菌浓度				细菌回复突变试验使用的测试浓度
	TA97	TA98	TA100	TA102	
EB ⁽¹⁾ / (μg/mL)	>50	>50	>50	>50	50、16.7、5.6、1.9
GelRed	100	100	100	100	50、16.7、5.6、1.9
GeneGreen	100	>100	100	>100	50、16.7、5.6、1.9
GoldView	50	100	100	100	50、16.7、5.6、1.9
SYBRGold	100	>100	100	>100	50、16.7、5.6、1.9
SYBRSafe	6.25	100	6.25	100	10、3.3、1.1、0.4
SYBRGreen I	1.56	6.25	1.56	6.25	10、3.3、1.1、0.4
GelGreen	100	>100	50	>100	50、16.7、5.6、1.9

注: (1) EB 的标准工作浓度为 0.5 μg/mL, 其余染料均为液体, 未标识具体浓度

表 2 8 种核酸染料对 TA97 的致突变性实验结果

染料	测试浓度 (标准工作浓度的倍数)	实验 1						实验 2					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性
EB	0	190±11	1.0	-	220±1	1.0	-	178±3	1.0	-	226±10	1.0	-
	1.9	301±4	1.6	-	340±29	1.5	-	331±11	1.9	-	355±12	1.6	-
	5.6	650±30	3.4	+	627±8	2.9	+	672±32	3.8	+	619±21	2.7	+
	16.7	854±25	4.5	+	862±28	3.9	+	820±34	4.6	+	882±51	3.9	+
	50	969±37	5.1	+	949±17	4.3	+	921±25	5.2	+	962±27	4.3	+
GelRed	0	206±5	1.0	-	90±6	1.0	-	110±1	1.0	-	88±12	1.0	-
	1.9	227±11	1.1	-	107±11	1.2	-	127±16	1.2	-	104±8	1.2	-
	5.6	200±20	1.0	-	103±18	1.1	-	122±6	1.1	-	106±16	1.2	-
	16.7	216±6	1.0	-	147±6	1.6	-	118±34	1.1	-	122±12	1.4	-
	50	223±12	1.1	-	230±13	2.6	+	159±4	1.4	-	185±17	2.1	+
GelGreen	0	99±1	1.0	-	117±34	1.0	-	98±6	1.0	-	98±8	1.0	-
	1.9	110±25	1.1	-	142±32	1.2	-	109±10	1.1	-	107±5	1.1	-
	5.6	108±35	1.1	-	108±11	0.9	-	107±7	1.1	-	120±6	1.2	-
	16.7	116±19	1.2	-	132±3	1.1	-	120±2	1.2	-	126±8	1.3	-
	50	93±23	0.9	-	149±5	1.3	-	128±2	1.3	-	142±5	1.4	-
GeneGreen	0	105±10	1.0	-	126±11	1.0	-	110±1	1.0	-	88±12	1.0	-
	1.9	114±12	1.1	-	104±3	0.8	-	89±5	0.8	-	98±23	1.1	-
	5.6	79±4	0.8	-	75±6	0.6	-	144±52	1.3	-	147±23	1.7	-
	16.7	80±1	0.8	-	126±12	1.0	-	123±17	1.1	-	134±25	1.5	-
	50	108±7	1.0	-	140±7	1.1	-	149±12	1.4	-	147±6	1.7	-
GoldView	0	93±10	1.0	-	90±23	1.0	-	156±4	1.0	-	170±27	1.0	-
	1.9	110±21	1.2	-	110±10	1.2	-	193±21	1.2	-	278±5	1.6	-
	5.6	120±30	1.3	-	107±59	1.2	-	196±17	1.3	-	283±24	1.7	-
	16.7	129±18	1.4	-	189±6	2.1	+	281±8	1.8	-	281±16	1.7	-
	50	123±28	1.3	-	204±30	2.3	+	302±2	1.9	-	401±11	2.4	+
SYBRGold	0	123±6	1.0	-	104±16	1.0	-	154±10	1.0	-	177±6	1.0	-
	1.9	129±4	1.0	-	107±1	1.0	-	192±12	1.2	-	150±21	0.8	-
	5.6	101±18	0.8	-	115±8	1.1	-	153±4	1.0	-	175±7	1.0	-
	16.7	121±6	1.0	-	147±23	1.4	-	167±6	1.1	-	139±36	0.8	-
	50	122±1	1.0	-	115±13	1.1	-	139±6	0.9	-	192±22	1.1	-
SYBRSafe	0	118±13	1.0	-	104±16	1.0	-	154±10	1.0	-	177±6	1.0	-
	0.4	108±14	0.9	-	124±28	0.9	-	215±18	1.1	-	236±13	1.1	-
	1.1	130±23	1.1	-	162±14	1.2	-	237±37	1.2	-	244±35	1.1	-
	3.3	130±1	1.1	-	151±9	1.1	-	256±1	1.3	-	269±16	1.2	-
	10	115±0	1.0	-	173±12	1.3	-	169±8	0.8	-	215±61	1.0	-
SYBRGreen I	0	123±30	1.0	-	77±7	1.0	-	121±29	1.0	-	117±10	1.0	-
	0.4	139±18	1.1	-	87±5	1.1	-	133±33	1.1	-	134±15	1.1	-
	1.1	122	1.0	-	113±1	1.5	-	121±12	1.0	-	107±53	0.9	-
	3.3	92±5	0.7	-	81±1	1.1	-	114±10	0.9	-	106±5	0.9	-
	10	49±1	0.4	-	62±9	0.8	-	124±8	1.0	-	119±21	1.0	-
2-氨基苄	10 μg/皿	ND		>1000		+	ND		>1000		+		

注: 阴性对照: 回复突变菌落数/自发回复突变菌落数; ND: 未检测

未处理对照组的 2 倍,且上述实验结果具有可重复性,说明 SYBR Green I 及其代谢产物对 TA98 有致突变性。EB 在 4 个测试浓度,加或不加 S9 均有致突变性。其余染料在测定浓度条件下对 TA98 均未见致突变性。

表 3 8 种核酸染料对 TA98 的致突变性实验结果

染料	测试浓度 (标准工作浓度的倍数)	实验 1						实验 2					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性
EB	0	24±6	1.0	-	16±2	1.0	-	27±8	1.0	-	22±4	1.0	-
	1.9	348±39	14.5	+	477±23	29.8	+	362±10	13.4	+	421±33	19.1	+
	5.6	701±16	29.2	+	743±24	46.4	+	773±26	28.6	+	791±12	36.0	+
	16.7	1237±49	51.5	+	1346±45	84.1	+	1316±32	48.7	+	1496±71	68.0	+
	50	1777±63	74.0	+	1902±40	118.9	+	1831±76	67.8	+	1938±39	88.1	+
Gelred	0	26±1	1.0	-	16±2	1.0	-	27±8	1.0	-	22±4	1.0	-
	1.9	24±3	0.9	-	20±2	0.8	-	20±0	0.9	-	26±5	1.4	-
	5.6	22±1	0.8	-	21±3	0.8	-	20±1	0.9	-	26±5	1.4	-
	16.7	29±2	1.1	-	22±1	0.9	-	24±6	1.0	-	24±6	1.3	-
	50	23±1	0.9	-	36±2	1.4	-	22±1	1.0	-	28±8	1.5	-
GelGreen	0	34±8	1.0	-	34±8	1.0	-	26±2	1.0	-	28±2	1.0	-
	1.9	21±3	0.6	-	27±5	0.8	-	33±2	1.3	-	30±3	1.1	-
	5.6	37±4	1.1	-	27±4	0.8	-	36±8	1.4	-	35±2	1.3	-
	16.7	41±1	1.2	-	35±8	1.0	-	38±8	1.5	-	39±4	1.4	-
	50	41±9	1.2	-	37±11	1.1	-	39±4	1.5	-	38±6	1.4	-
GeneGreen	0	20±3	1.0	-	34±8	1.0	-	26±2	1.0	-	28±2	1.0	-
	1.9	33±1	1.7	-	13±1	0.9	-	27±1	1.1	-	28±3	1.8	-
	5.6	20±0	1.0	-	20±1	1.4	-	26±15	1.1	-	18±1	1.1	-
	16.7	17±2	0.9	-	22±3	1.6	-	23±6	1.0	-	19±1	1.2	-
	50	19±1	1.0	-	18±1	1.3	-	27±11	1.1	-	18±6	1.1	-
GoldView	0	27±0	1.0	-	33±2	1.0	-	29±2	1.0	-	22±3	1.0	-
	1.9	21±1	0.8	-	35±5	0.8	-	26±11	0.9	-	35±16	1.3	-
	5.6	35±8	1.3	-	17±0	0.8	-	26±8	1.0	-	24±0	1.5	-
	16.7	23±10	0.9	-	25±3	0.5	-	29±2	0.9	-	32±1	1.1	-
	50	46±11	1.7	-	25±3	1.1	-	27±0	0.9	-	28±9	1.6	-
SYBRGold	0	25±2	1.0	-	15±4	1.0	-	22±3	1.0	-	22±1	1.0	-
	1.9	36±7	1.4	-	25±9	1.7	-	23±1	1.0	-	23±1	1.0	-
	5.6	25±3	1.0	-	18±1	1.2	-	34±6	1.5	-	30±13	1.4	-
	16.7	23±6	0.9	-	24±7	1.6	-	26±4	1.2	-	26±6	1.2	-
	50	22±2	0.9	-	23±2	1.5	-	26±6	1.2	-	23±1	1.0	-
SYBRSafe	0	24±6	1.0	-	15±4	1.0	-	22±3	1.0	-	22±1	1.0	-
	1.9	33±10	1.4	-	24±3	0.9	-	42±1	1.9	-	29±4	1.4	-
	5.6	29±4	1.2	-	27±7	1.0	-	26±1	1.2	-	31±10	1.5	-
	16.7	34±11	1.4	-	30±5	1.1	-	14±5	0.6	-	31±5	1.5	-
	50	24±1	1.0	-	33±6	1.2	-	8±1	0.4	-	20±6	1.0	-
SYBRGreen I	0	25±6	1.0	-	18±4	1.0	-	22±4	1.0	-	21±1	1.0	-
	0.4	31±10	1.2	-	27±7	1.5	-	44±3	2.0	+	43±4	2.0	+
	1.1	36±8	1.4	-	55±2	3.1	+	63±4	2.9	+	58±1	2.8	+
	3.3	59±6	2.4	+	49±3	2.7	+	56±18	2.5	+	55±4	2.6	+
	10	33±11	1.3	-	23±1	1.3	-	21±9	1.0	-	22±10	1.0	-
2-氨基苄	10 μg/皿	ND			>1000			ND			>1000		

注: 阴性对照: 回复突变菌落数/自发回复突变菌落数; ND: 未检测

2.4 对 TA100 的致突变性

EB 在 4 个测试浓度,加或不加 S9 均有致突变性,其余染料对 TA100 均未见致突变性。

2.5 对 TA102 的致突变性

由表 4 可见,GelRed、GeneGreen、GelGreen 和

GoldView 在最高测试浓度条件下(标准工作浓度的 50 倍)加或不加 S9 时回复突变菌落数均大于未处理对照组的 2 倍,且实验结果具有可重复性,说明 GelRed、GeneGreen、GelGreen 和 GoldView 在标准工作浓度的 50 倍时,对 TA102 有致突

表 4 8 种核酸染料对 TA102 的致突变性实验结果

染料	测试浓度 (标准工作浓度的倍数)	实验 1						实验 2					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性	$\bar{x} \pm s$	阴性对照	致突变性
EB	0	324±4	1.0	-	336±5	1.0	-	290±12	1.0	-	302±17	1.0	-
	1.9	559±25	1.7	-	512±17	1.5	-	521±21	1.8	-	477±28	1.6	-
	5.6	864±46	2.7	+	858±21	2.6	+	746±29	2.6	+	801±34	2.7	+
	16.7	938±15	2.9	+	920±11	2.7	+	967±23	3.3	+	982±51	3.3	+
	50	1017±20	3.1	+	1088±45	3.2	+	1113±21	3.8	+	1029±53	3.4	+
Gelred	0	365±12	1.0	-	292±9	1.0	-	283±12	1.0	-	252±12	1.0	-
	1.9	421±13	1.2	-	431±11	1.5	-	311±21	1.1	-	296±20	1.2	-
	5.6	468±21	1.3	-	474±16	1.6	-	367±18	1.3	-	300±19	1.2	-
	16.7	548±16	1.5	-	572±31	2.0	+	496±22	1.8	-	314±27	1.2	-
	50	538±20	1.5	-	594±21	2.0	+	496±27	1.8	-	503±41	2.0	+
GelGreen	0	257±13	1.0	-	345±35	1.0	-	286±11	1.0	-	357±25	1.0	-
	1.9	308±8	1.2	-	375±85	1.4	-	316±17	1.1	-	481±25	1.3	-
	5.6	408±36	1.6	-	419±1	1.2	-	451±16	1.6	-	496±16	1.4	-
	16.7	470±26	1.8	-	407±15	1.2	-	516±10	1.8	-	501±12	1.4	-
	50	514±24	2.0	+	493±6	1.1	-	630±47	2.2	+	586±11	1.6	-
GeneGreen	0	260±5	1.0	-	293±7	1.0	-	292±6	1.0	-	272±16	1.0	-
	1.9	321±17	1.2	-	359±22	1.2	-	311±4	1.1	-	381±25	1.4	-
	5.6	456±22	1.8	-	457±12	1.6	-	430±4	1.5	-	359±2	1.3	-
	16.7	527±31	2.0	+	476±28	1.6	-	451±3	1.5	-	483±20	1.8	-
	50	563±19	2.2	+	596±31	2.0	+	592±6	2.0	+	561±8	2.1	+
GoldView	0	286±11	1.0	-	252±38	1.0	-	406±25	1.0	-	448±45	1.0	-
	1.9	289±59	1.0	-	395±14	1.6	-	443±87	1.1	-	396±56	0.9	-
	5.6	448±1	1.6	-	389±86	1.5	-	546±58	1.3	-	581±1	1.3	-
	16.7	554±17	1.9	-	460±33	1.8	-	720±57	1.8	-	752±188	1.7	-
	50	579±9	2.0	+	540±3	2.1	+	1053±106	2.6	+	1087±12	2.4	+
SYBRGold	0	518±35	1.0	-	390±34	1.0	-	283±9	1.0	-	272±16	1.0	-
	1.9	478±47	0.9	-	435±10	1.1	-	323±4	1.1	-	318±33	1.2	-
	5.6	516±64	1.0	-	560±50	1.4	-	354±9	1.3	-	364±4	1.3	-
	16.7	625±33	1.2	-	558±49	1.4	-	429±25	1.5	-	440±20	1.6	-
	50	723±63	1.4	-	687±5	1.8	-	528±52	1.9	-	527±34	1.9	-
SYBRSafe	0	335±45	1.0	-	391±9	1.0	-	278±4	1.0	-	299±7	1.0	-
	1.9	362±17	1.1	-	347±66	0.9	-	317±45	1.1	-	344±16	1.2	-
	5.6	561±29	1.7	-	521±8	1.3	-	760±4	2.7	+	424±2	1.4	-
	16.7	1028±45	3.1	+	636±43	1.6	-	844±25	3.0	+	632±12	2.1	+
	50	1188±124	3.5	+	833±47	2.1	+	862±24	3.1	+	652±17	2.2	+
SYBRGreen I	0	366±74	1.0	-	406±14	1.0	-	315±22	1.0	-	316±8	1.0	-
	0.4	742±53	2.0	+	656±68	1.6	-	558±24	1.8	-	477±41	1.5	-
	1.1	803±53	2.2	+	901±52	2.2	+	597±33	1.9	-	730±71	2.3	+
	3.3	1221±53	3.3	+	1111±68	2.7	+	826±81	2.6	+	1116±11	3.5	+
	10	1455±11	4.0	+	1428±88	3.5	+	1340±88	4.3	+	1478±2	4.7	+
甲基磺酸甲酯	1 μL/皿	>2000			+	ND	>2000			+	ND		

注: 阴性对照: 回复突变菌落数/自发回复突变菌落数; ND: 未检测

变性; SYBR Safe 在标准工作浓度的 5.6、16.7 和 50 倍时,未加 S9 时回复突变菌落数大于未处理对照组的 2 倍,且实验结果具有可重复性,表明 SYBR Safe 在标准工作浓度的 5.6、16.7 和 50 倍条件下,对 TA102 有致突变性; SYBR Green I 在标准工作浓度的 0.4、1.1 和 3.3 倍时,加或不加 S9 回复突变菌落数大于未处理对照组的 2 倍,且实验结果具有可重复性,表明 SYBR Green I 在标准工作浓度的 0.4、1.1 和 3.3 倍时,对 TA102 有致突变性。EB 在浓度为 5.6、16.7 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,加或不加 S9 均有致突变性。SYBR Gold 在测定浓度范围内对 TA102 未见致突变性。

3 讨论

DNA 染料是分子生物学实验室的常用试剂,在本研究测试的 8 种染料中,7 种对 TA97、TA98、TA100、TA102 均呈现不同程度的致突变性,SYBR Safe 和 SYBR Green I 呈现一定程度的抑菌性,仅 SYBR Gold 在测试条件下未见致突变性。

最低抑菌浓度是测量抗菌物质对受试菌种抑制效力一项指标。8 种染料的最高测试浓度设定应低于 MIC 值。本研究结果显示,SYBR Safe 对 TA97、TA100 有较强的抑菌性, MIC 为标准工作浓度的 6.25 倍, SYBR Green I 对 4 个菌的抑菌性较强,对 TA97、TA100 的 MIC 值为标准工作浓度的 1.56 倍, TA98、TA102 的 MIC 为标准工作浓度的 6.25 倍。测试 8 种染料的最低抑菌浓度对选择细菌回复突变试验测试浓度具有指导意义,有效的指导了后续实验的设计。

细菌回复突变实验用菌种 TA97、TA98、TA100、TA102 可对不同突变机制的受试物进行测试。TA97 在 hisD6610 处有 6 个连续的胞嘧啶,是突变的敏感点^[9],移码诱变剂能特异性地选择作用于原突变顺序部位,使之回变。本研究显示, GelRed 和 GoldView 是 TA97 的移码诱变剂。TA98 在 hisD3052 位置上可发生移码突变,它含有 8 个重复 GC 残基,是突变的敏感点^[10],能被移码诱变剂所回复突变,本研究显示 SYBR Green I 及其代谢产物可以使 TA98 的 hisD3052 位置回复突变。TA102 携带 pAQ1 和 pKM101 两种质粒,包含在 pAQ1 质粒内的 hisG428 在氧化剂等有致突变性的化学物影响下,易发生赭石突变^[11],本研究显示 GelRed、GeneGreen、GoldView、SYBR Safe、SYBR Green I 及其代谢产物对 TA102 有致突变性。

现有研究表明, EB 有致癌性^[2], SYBR Green I

及其代谢产物对 TA98 和 102 有致突变性^[12],其余染料的安全性尚无文献报道。本研究验证了 EB 和 SYBR Green I 的致突变性,还发现了其余染料的致突变性以及致突变结果与突变机制的关系。本研究结果显示,除 EB 外,其余染料在工作浓度对细菌回复突变试验测试用菌种均未见致突变性,其致突变性明显低于 EB。SYBR Gold 在各测试浓度均未见致突变性,其余染料在高浓度均呈现不同程度的致突变性,可能对实验人员健康造成一定的危害,故此实验操作人员在配置稀释染料时,需加强防护措施。

参考文献

- [1] LI Z, CHANG P H, JIANG W T, et al. Enhanced removal of ethidium bromide (EtBr) from aqueous solution using rectorite [J]. *J Hazardous Materials*, 2020, 384: 121254.
- [2] TANG Q. The improved method in agarose gel electrophoresis of nucleic acid [J]. *Asia-Pacific J Blood Types Genes*, 2018, 2(1): 67-70.
- [3] XU J, DeVRIES S H, ZHU Y L. Quantification of adeno-associated virus with safe nucleic acid dyes [J]. *Hum Gene Ther*, DOI: 10.1089/hum.2020.063.
- [4] NORINDER U, AHLBERG E, CARLSSON L. Predicting ames mutagenicity using conformal prediction in the ames/qsar international challenge project [J]. *Mutagenesis*, 2019, 34(1): 33-40.
- [5] VIJAY U, GUPTA S, MATHUR P, et al. Microbial mutagenicity assay: Ames test [J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(6): e2763.
- [6] MORTELMANS K. A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay [J]. *Mut Res/Genetic Toxicol Environm Mutagen*, 2019, 841: 14-16.
- [7] JORGENSEN J H. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria [D]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [8] 中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会. 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2014 [S]. 北京: 国家标准出版社, 2014.
- [9] SAKAI Y, ISHII T, TAKAHASHI Y, et al. Comparative study of Salmonella typhimurium tester strains TA1537, TA97 and TA97a in mutagenicity evaluation of tobacco products [C]// *Toxicology Letters*. Ireland: Elsevier Ireland Ltd, 2019, 314: S121-S122.

(下转第 948 页)

- 2006, 580(12): 2843-2849.
- [5] CAMPBELL K J , PERKINS N D. Regulation of NF- κ B function [J]. *Biochem Soc Symp* ,2006 ,73 (3) : 165-180.
- [6] DONELLY S C , BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease [J]. *Mol Med Today* ,1997 ,3: 502-507.
- [7] BERNHAGEN J. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction [J]. *J Exp Med* , 1996 , 183(1) : 277-282.
- [8] CALANDRA T , ECHTENACHER B , ROY D L , et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor [J]. *Nat Med* , 2000 , 6(2) : 164-170.
- [9] BERNHAGEN J , CALANDRA T , BUCALA R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features [J]. *J Mol Med* , 1998 , 76(3-4) : 151-161.
- [10] DAUN J M , CANNON J G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α [J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000 , 279(3) : R1043-R1049.

收稿日期: 2020-08-18

(上接第 943 页)

- [10] AKYIL D , KONUK M , EREN Y , et al. Mutagenic and genotoxic effects of Anilofos with micronucleus , chromosome aberrations , sister chromatid exchanges and Ames test [J]. *Cytotechnology* , 2017 , 69(6) : 865-874.
- [11] FIORENTINO A , RIZZO L , GUILLOTEAU H , et al. Comparing TiO₂ photocatalysis and UV-C radiation for inactivation and mutant formation of *Salmonella typhimurium* TA102 [J]. *Environ Sci Poll Res* , 2017 , 24(2) : 1871-1879.
- [12] SINGER V L , LAWLOR T E , YUE S. Comparison of SYBR (R) Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test) [J]. *Mut Res/Fundam Mole Mechan Mutagen* , 1999 , 439(1) : 37-47.

收稿日期: 2019-12-09