

青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立

陈军建 夏宜琚

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

以青蛙蝌蚪为实验生物, 利用甲基磺酸乙酯(EMS)和亚硝基胍(MNNG)探讨其化合物浓度、暴露时间和蝌蚪发育阶段等因素对诱发青蛙蝌蚪红细胞微核的影响, 不同统计单位的特点和相互关系; 提出了青蛙蝌蚪微核试验作为一种水体诱变剂检测系统的基本实验程序和一般原则。此外, 还描述了“小体 M”——一种特殊的细胞学现象, 并初步讨论了微核代谢机制。

关键词 青蛙蝌蚪, 微核试验, 甲基磺酸乙酯(Ethyl methane-sulphonate), 亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), “小体 M”

随着水环境的恶化, 对污染水体中具有诱变和致癌活性的化学物质的筛选和检测, 日益显得重要。探索新的方法以检测不同环境中污染物的遗传毒性效应, 并从不同角度评价它们对生物和人类健康造成的潜在危害业已成为一项新课题^[1]。

在以前的工作中作者初步描述了实验生物黑斑蛙(*Rana nigronaculata* Hallowell)水生幼体(俗称青蛙蝌蚪)的红细胞微核试验技术^[2]。青蛙蝌蚪, 其红细胞分裂旺盛, 具有低而稳定的微核本底, 对污水的诱变活性很敏感^[2], 是一种有效的指示生物。青蛙取材方便、经济, 作为实验胚胎学的经典材料, 其胚胎发育全过程和其它生物学特性均已得到充分研究, 建立了完整的胚胎发育时序表, 具有丰富的生物学背景资料, 无疑是一种很有应用前景的实验材料。为此作者进行深入的研究, 并将青蛙蝌蚪红细胞微核试验发展成监测水体污染物诱变活性的一种规范化、标准化的生物活体快速检测系统。

材 料 和 方 法

(一) 实验生物

野外采集刚产出的青蛙受精卵, 带回于实验室水族箱(60×40×20cm)中培养。培养用水为活性炭过滤并放置一周以上的自来水, 水深 5 至 6cm。小蝌蚪刚开始进食时选喂以少量熟蛋黄粉, 随后便以轻微煮过且剁得很碎的菠菜叶喂养。蝌蚪稍大后转入较大水族箱

本所所长择优基金资助项目。

1991 年 12 月 6 日收到。

(100×60×25cm)中培养,经常换水。当蝌蚪发育至一定阶段时选用发育状态良好的个体用于实验。同一批实验需选用来自相同亲本和发育阶段同步的蝌蚪。

(二)化学品

本文选用两种标准化学品,甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulphonate, EMS),上海试剂一厂出品和 N 甲基 N' 硝基 N 亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG), Fluka Chemie AG。每次换液前,两种化学品用蒸馏水配成原液。

(三)预实验

确定化学品最高实验浓度(MC)。EMS 和 MNNG 的 MC 分别为 100ppm 和 0.5ppm。

(四)实验设计

1. EMS 诱发青蛙蝌蚪微核的浓度、时间关系实验 取来自相同亲本,处于第 XXX 期^[3]的蝌蚪为实验材料。在 5L 玻璃水槽(Φ, 27cm)中,20 只蝌蚪一组分别暴露于 EMS 浓度为 MC、MC/2 和 MC/10 的 2L 活性炭过滤水中。另 20 只蝌蚪保持在 2L 过滤水中为对照。蝌蚪喂以适量轻微煮过并剁碎的菠菜叶,每 d 两次。每 24h 更换新配制的处理液。实验组于 6d 和 12d 时分别制备蝌蚪血涂片,对照组在 12d 后制片。

2. MNNG 诱发青蛙蝌蚪微核的浓度、时间关系实验 以来自相同亲本,XXX 期蝌蚪为材料,20 只一组。设置 MNNG 的浓度分别为 MC、MC/2 和 MC/10,另设一对照组。在与实验 1 相同的条件和程序下,在处理的第 6d 和 12d 后分别制片,对照于第 12d 制片。

3. 不同发育阶段的蝌蚪对微核形式的影响实验 取来自同一亲本,第 XXVII 期的蝌蚪为材料。20 只一组,分别暴露于 2L 浓度为 100、50 和 10ppm 的 EMS 溶液中。另设一对照组。在与上述实验相同条件下处理 12d,然后制片。所有实验均在 23±1.5℃ 温度下进行。

(五)制备血涂片

采用取心脏血涂片法^[2,4],取蝌蚪充血心脏迅速制备血涂片。甲醇固定 10 至 15min, 5% Giemsa(pH6.98)染色 15min,风干。

(六)结果分析

每只蝌蚪制备 1 张血涂片,每一实验组制备 15—20 张。每张涂片检查 1000 个形态良好的红细胞,计算微核细胞率、微核率和“小体 M”率。

(七)统计方法

本实验采用两种方法进行数据分析

1. 方差分析法 原始数据经平方根变换后进行 F 检验和 q 检验。因篇幅有限,这部分统计数值未列出。

2. 中位数分析法^[5,6] 将每组 n 个样品的微核细胞率、微核率和“小体 M”率分别由大至小顺序排列,计算中位数、低四分位数和高四分位数。用 M、IQR 和 n 分别代表中位数、四分位数间距和样品大小,则中位数的 95% 置信限为:

$$M \pm 1.57IQR / \sqrt{n}$$

当对照组的置信区间与处理组的置信区间不存在共同值时,在 5% 水平上两组中位数之间被认为存在显著性差异。如果处理组的中位数经上述计算差异显著,而 M 值小于 2 倍对照组 M 值,则认为它们之间的差异为弱阳性。

结 果

(一)EMS 诱发青蛙蝌蚪微核

图 1 显示 EMS 诱发青蛙蝌蚪微核的浓度、时间效应。三个不同统计单位的特征值列于表 1。

对照微核本底为 1.5‰。经 6d 和 12d 处理,三种不同浓度 EMS 均诱发蝌蚪红细胞微核细胞率和微核率与对照相比显著增高,两种统计单位的最大值分别达 38‰和 42‰。

“小体 M”本底为 1‰。经 6d 处理,“小体 M”只在 100ppm 浓度组为阳性反应;12d 后,50 和 100ppm 组分别达到 3.5‰和 9‰。均为统计上显著增高。

表 1 EMS 处理实验中三种不同统计单位的特征值

Tab. 1 Characteristic values for three different testing indices in the experiment on EMS treatment

EMS 浓度	Conc. of EMS(p. p. m)	暴露时间 Exposure time						
		6d			12d			
		10	50	100	10	50	100	Control
微核细胞率	Frequency of MNEs(%)							
动物数	Number of animals	17	18	20	20	20	17	18
最小值	Lower extreme	2	4	8	2	4	22	0
低四分位数	Lower quartile	3	6	12.5	4.5	8	32	1
中位数	Median	5	9	14.5	6.5	11.5	38	1.5
高四分位数	Upper quartile	6	10	18.5	9	14	43	3
最大值	Upper extreme	9	12	30	19	23	58	4
95%置信限	95% confidence limit	1.14	1.48	2.11	1.58	2.46	4.19	0.74
平均值	Mean	4.76	8.33	16.15	7.05	11.55	38.47	1.83
结果	Results	+	+	+	+	+	+	
微核率	Frequency of MN(%)							
动物数	Number of animals	17	18	20	20	20	17	18
最小值	Lower extreme	2	4	8	2	4	26	0
低四分位数	Lower quartile	4	8	13	5	8	34	1
中位数	Median	5	9	16	6.5	11.5	42	1.5
高四分位数	Upper quartile	7	10	19.5	9	14.5	50	3
最大值	Upper extreme	10	17	32	22	24	65	4
95%置信限	95% confidence limit	1.14	0.74	2.28	1.4	2.28	6.09	0.74
平均值	Mean	5.47	9.44	17.45	7.3	11.9	42.82	1.83
结果	Results	+	+	+	+	+	+	
“小体 M”	Frequency of “Small baiy”(%)							
动物数	Number of animals	17	18	20	20	20	17	18
最小值	Lower extreme	0	0	0	0	0	4	0
低四分位数	Lower quartile	0	0	1	0	1	7	0
中位数	Median	0	0	2	0.5	3.5	9	1
高四分位数	Upper quartile	0	1	2	1.5	6	12	1
最大值	Upper extreme	6	3	4	4	11	19	2
95%置信限	95% confidence limit	0	0.37	0.35	0.53	1.76	1.90	0.37
平均值	Mean	0.59	0.61	1.65	0.9	4.05	10.06	0.89
结果	Results	-	-	+	-	+	+	

+ 阳性结果; - 阴性结果

+ positive result; - negative result

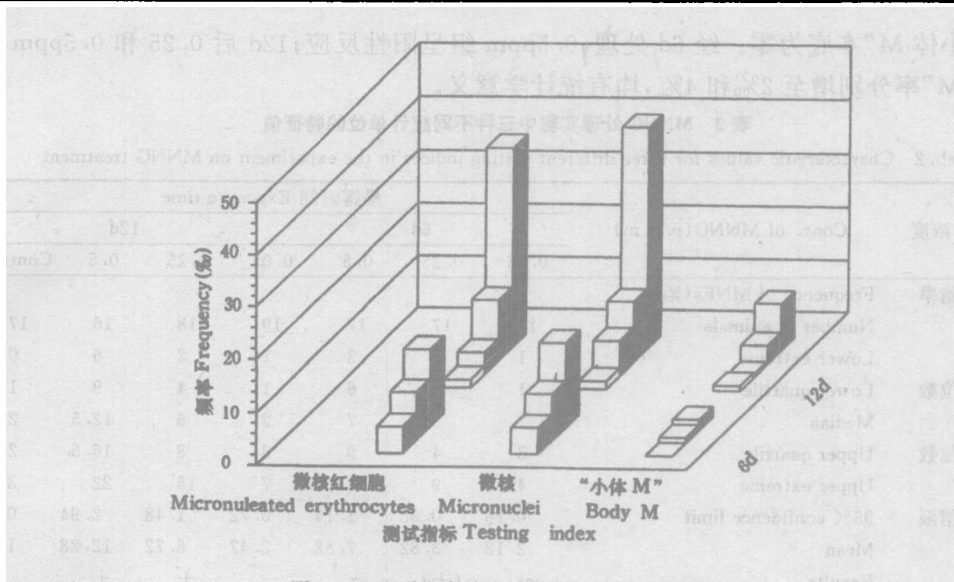


图 1 EMS 诱发青蛙蝌蚪微核的浓度、时间效应

Fig. 1 The effects of concentration and time on the induction of micronuclei in frog tadpoles by EMS

■ 10ppm, ▨ 50ppm, ■ 100ppm, □ control

(二) MNNG 诱发青蛙蝌蚪微核

图 2 显示 MNNG 诱发蝌蚪微核的浓度、时间效应。三种不同统计单位的特征值列于表 2。

对照微核本底为 2%。经 6d 和 12d 处理, 0.25 和 0.5ppm 浓度组蝌蚪微核细胞率和微核率与对照相比呈统计上显著增高(其中 0.25ppm, 6d 组微核细胞率的增高为弱阳性); 两种单位的最大值分别达 12.5% 和 13.5%。0.05ppm 组在两个处理期间均为阴性结果。

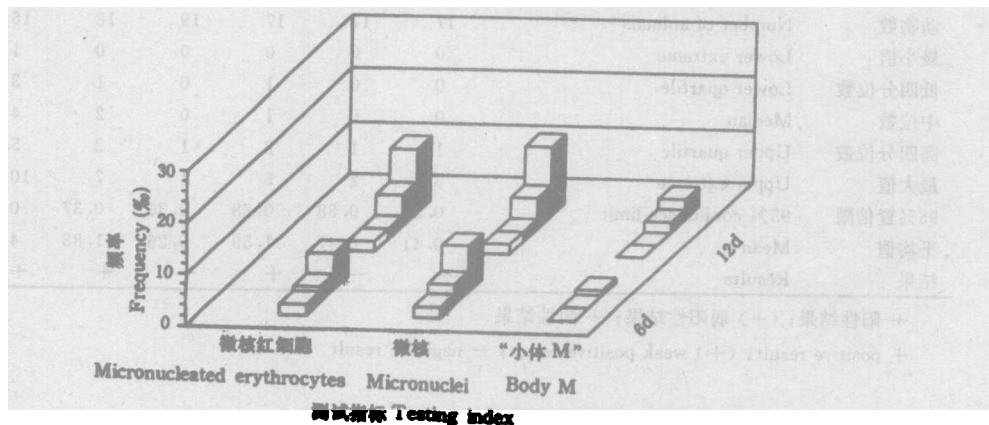


图 2 MNNG 诱发青蛙蝌蚪微核的浓度、时间效应

Fig. 2 The effects of concentration and time on the induction of micronuclei in frog tadpoles by MNNG

▨ 0.05ppm, ▨ 0.25ppm, ■ 0.5ppm, □ control

“小体 M”本底为零。经 6d 处理, 0.5ppm 组呈阳性反应; 12d 后 0.25 和 0.5ppm 组“小体 M”率分别增至 2‰和 4‰, 均有统计学意义。

表 2 MNNG 处理实验中三种不同统计单位的特征值

Tab. 2 Characteristic values for three different testing indices in the experiment on MNNG treatment

MNNG 浓度	Conc. of MNNG (p. p. m)	暴露时间 Exposure time					
		6d			12d		
		0.05	0.25	0.5	0.05	0.25	0.5 Control
微核细胞率	Frequency of MNEs (%)						
动物数	Number of animals	17	17	17	19	18	16 17
最小值	Lower extreme	1	1	3	1	2	6 0
低四分位数	Lower quartile	1	3	6	1	4	9 1
中位数	Median	2	3	7	2	6	12.5 2
高四分位数	Upper quartile	3	4	9	3	8	16.5 2
最大值	Upper extreme	4	9	12	7	15	22 3
95%置信限	95% confidence limit	0.76	0.38	1.14	0.72	1.48	2.94 0.38
平均值	Mean	2.12	3.82	7.82	2.47	6.72	12.88 1.53
结果	Results	—	(+)	—	—	+	+
微核率	Frequency of MN (%)						
动物数	Number of animals	17	17	17	19	18	16 17
最小值	Lower extreme	1	1	4	1	2	6 0
低四分位数	Lower quartile	1	3	6	1	4	12 1
中位数	Median	2	4	9	2	6	13.5 2
高四分位数	Upper quartile	3	5	11	3	8	20.5 2
最大值	Upper extreme	4	9	16	7	18	26 3
95%置信限	95% confidence limit	0.76	0.76	1.90	0.72	1.48	3.34 0.38
平均值	Mean	2.12	4.29	9.29	2.41	7.11	15.38 1.59
结果	Results	—	+	+	—	+	+
“小体”	Frequency of “Small body” (%)						
动物数	Number of animals	17	17	17	19	18	16 17
最小值	Lower extreme	0	0	0	0	0	1 0
低四分位数	Lower quartile	0	0	1	0	1	3 0
中位数	Median	0	0	1	0	2	4 0
高四分位数	Upper quartile	1	1	2	1	2	5.5 1
最大值	Upper extreme	3	2	5	1	7	10 1
95%置信限	95% confidence limit	0.38	0.38	0.38	0.36	0.37	0.98 0.38
平均值	Mean	0.41	0.47	1.59	0.26	1.83	4.69 0.35
结果	Results	—	—	+	—	+	+

+ 阳性结果; (+) 弱阳性结果; — 阴性结果

+ positive result; (+) weak positive result; — negative result

(三)不同发育期蝌蚪对微核形成的影响

图 3 显示 EMS 诱发第 XXVII 期蝌蚪的微核效应。三种不同单位的特征值列于表 3。

对照微核本底为 2‰。经 12d 处理三种浓度的 EMS 均诱发微核细胞率和微核率统计上显著增高, 最大值分别达 35‰和 40‰。“小体 M”本底为零。12d 后, 50 和 100ppm 组“小体 M”率分别为 1‰和 6‰, 均为阳性反应。

表 3 不同发育期蝌蚪实验中三种不同统计单位的特征值

Tab. 3 Characteristic values for three different testing indices in the experiment on different stage of tadpoles.

27 期蝌蚪	Tadpole of stage 27	12d			
		EMS 浓度 Conc. of EMS (p. p. m)			Control
		10	50	100	
微核细胞率	Frequency of MNEs(‰)				
动物数	Number of animals	16	20	15	16
最小值	Lower extreme	2	7	21	0
低四分位数	Lower quartile	3.5	9.5	29	2
中位数	Median	5.5	10	35	2
高四分位数	Upper quartile	7.5	13	41	3
最大值	Upper extreme	12	17	46	3
95%置信限	95% confidence limit	1.57	1.23	4.86	0.39
平均值	Mean	5.75	11.2	34.6	2.06
结果	Results	+	+	+	
微核率	Frequency of MN(‰)				
动物数	Number of animals	16	20	15	16
最小值	Lower extreme	2	7	24	0
低四分位数	Lower quartile	3.5	10	30	2
中位数	Median	6	11.5	40	2
高四分位数	Upper quartile	7.5	14	50	3
最大值	Upper extreme	14	20	54	5
95%置信限	95% confidence limit	1.57	1.40	8.11	0.39
平均值	Mean	6.38	12.05	40	2.19
结果	Results	+	+	+	
“小体 M”	Frequency of “Small body”(‰)				
动物数	Number of animals	16	20	15	16
最小值	Lower extreme	0	0	3	0
低四分位数	Lower quartile	0	0.5	5	0
中位数	Median	0	1	6	0
高四分位数	Upper quartile	0.5	2	9	1
最大值	Upper extreme	2	5	22	2
95%置信限	95% confidence limit	0.20	0.53	1.62	0.39
平均值	Mean	0.31	1.45	7.93	0.5
结果	Results	-	+	+	

+ 阳性结果; (+) 弱阳性结果; - 阴性结果

+ positive result; (+) weak positive result; - negative result

讨 论

(一) EMS 和 MNNG 诱发青蛙蝌蚪微核

1. EMS EMS 是一种磺酸酯类烷化剂,它在以病毒到哺乳类的许多遗传毒性试验系统中都发现具有诱变/致癌活性^[7]。因此常常作为一种典型的阳性对照物。在 EMS 诱发青蛙蝌蚪微核实验中,同一处理时间微核细胞率呈现明显的浓度依赖性增高,各浓度组之间微核细胞率均存在统计上显著差异(q 检验)。同一浓度下则显示一定时间依赖性增高,

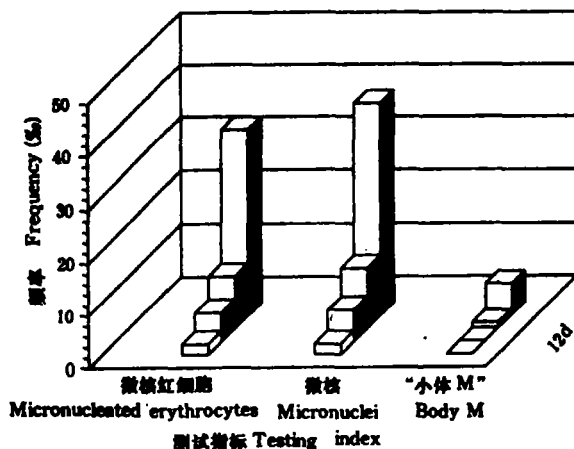


图3 EMS诱发不同发育期蝌蚪的微核效应

Fig. 3 The effect of different stage of tadpole on the induction of micronuclei by EMS

□ 10ppm, ▨ 50ppm, ■ 100ppm, □ control

这种关系在MC浓度组尤其突出,反映出EMS在毒性浓度水平产生最大效应的特点。在EMS作用下,青蛙蝌蚪红细胞遗传物质的损伤,一方面表现在具有微核的红细胞增多;另一方面,随着损伤加重,还表现在双微核和多微核细胞增多,有的细胞发生核碎裂现象(图版I:1—4)。这一特点可以从微核细胞率和微核率的差别中看出。

有人将泥荫鱼(*Umbra pygmaea*)暴露于浓度200ppm EMS中3个星期,40ppm中6个星期,分别产生1.6‰和3.7‰的微核红细胞^[8]。本实验中青蛙蝌蚪经12d处理,50和100ppm的EMS分别诱导11.5‰和38‰的微核红细胞。由于微核主要是由细胞分裂期间滞留的染色体或其碎片引起的,微核的产生与细胞分裂密切相关^[9,10]。鱼类红细胞微核试验法敏感性差的主要原因在于它是以不再分裂或分裂指数很低的成熟红细胞为靶细胞。相反,青蛙蝌蚪红细胞本身正处在旺盛增殖阶段,诱变物引起的遗传物质损伤能够通过细胞分裂很快以微核形式体现出来。

2. MNNG MNNG是亚硝酰胺类烷化剂,一种强烈的致突变和致癌剂^[11]。然而用啮齿类动物进行微核实验,MNNG除在某些种类报道为阳性结果外^[12],多次得到阴性结果^[13—15],或可疑阳性结果^[16]。至今还未见到MNNG诱发生物微核的报道。在青蛙蝌蚪实验中,高浓度组(MC和MC/2)均能诱发微核细胞率和微核率统计上显著增高,且呈现明显的浓度和时间依赖性。与EMS相比,MNNG对青蛙蝌蚪具有很强的急性毒性(MC为0.5ppm),但其诱变活性的浓度范围却相当窄,微核产生幅高也较小。MNNG的遗传毒性作用特点与其甲基衍生物N-乙基-N'-硝基-N-亚硝基胍(ENNG)对肋鳃(*Pleurodeles waltl*)幼体的作用特点^[5]十分相似。

化学品诱变活性大小除与其诱变特性相关,也受理化稳定性的影响。在水溶液中EMS和MNNG是两种不稳定的化合物,EMS在一种哺乳类动物培养基中的半衰期只有53min^[17]。MNNG则更不稳定,极易受pH、光照和温度等理化因子的作用而降解^[11]。这也许是MNNG在一些啮齿类动物微核实验中得到阳性结果的原因之一。由此可见,青蛙蝌

蚪微核试验不仅能够很好地反映出不同化学品的作用特点,而且可用于不稳定化学品的诱变活性检测。

3. 不同发育期蝌蚪的微核效应 选用 XXVII 期蝌蚪进行 EMS 处理实验,结果表明早期蝌蚪对化学品也很敏感。从处理 12d 的结果来比较(表 1、3),三种浓度 EMS 诱发的微核细胞率和微核率都十分接近,具有相同的作用特点。这说明不同发育期蝌蚪对实验结果没有明显影响;另一方面也表明青蛙蝌蚪微核实验结果重复性很好,是一种可靠的测试方法。考虑到蝌蚪太小制备血涂片比较困难,而蝌蚪过大又可能受到变态的影响,因此采用第 XXX 期蝌蚪开始实验比较合适。

(二)微核相关性胞质“小体 M”

在一些血涂片,尤其是高浓度组的涂片中经常出现一种包含有微核的细胞质小体。它既不同于含有微核的有核红细胞,亦不同于哺乳类骨髓细胞中具有微核的多染红细胞。为行文方便,作者暂称这类与微核相关的特殊细胞结构为“小体 M”。“小体 M”实际上是一类具有不同大小微核和胞质的细胞质小体。它可以包含一个或多个微核(图版 I : 5—7),微核的形态特征与正常细胞中的微核标准一致。“小体 M”的胞质具有清晰的边界,大小变化很大,以正常细胞的 1/4 左右大小为多见(图版 I : 8—12)。裸露的微核和不含核物质的胞质均不计入“小体 M”。

在 EMS 和 MNNG 诱发蝌蚪微核实验中,“小体 M”率的变化具有共同特点。MC 浓度组在两个处理期间都呈阳性反应,MC/2 浓度组只在 12d 后才有统计学意义。将“小体 M”率与相应的微核细胞率相比较,微核细胞率愈高,“小体 M”率也愈高;但不完全成比例关系。

“小体 M”的成因尚不清楚,它可能是一种发育不正常的异常细胞,也可能是微核细胞的一种代谢产物。在查片过程中观察到一些“小体 M”形成的中间过程,主要有缢裂型、芽突型和排主核型(图版 I : 13—16)。由此推断“小体 M”更可能是微核红细胞的一种代谢产物。这样就不难理解它与微核细胞率相关的特点。对“小体 M”与微核细胞的关系及“小体 M”成因和变化规律的进一步研究,将有助于对微核代谢机制的了解和对微核毒理学意义的全面认识。

(三)几个值得注意的问题和基本实验程序

与哺乳类试验系统相比,以往水生脊椎动物微核试验方法还很不规范。为使青蛙蝌蚪微核试验发展为一种规范化的水体诱变剂检测系统,一些基本问题有必要提出讨论。

1. 质量保证 青蛙蝌蚪微核自发频率低且稳定,根据作者几年来的实验记录,本底平均值 $\leq 2\%$ 。由于取材环境、实验方法及操作的不同,微核本底会有波动。本底过高($\geq 6\%$),实验结果的可靠性值得怀疑。保持实验材料低且稳定的微核本底($\leq 4\%$)是实验成功的前提条件。

2. 最高实验浓度 由于化学品性质不同,某些化学品只在毒性剂量水平才引起微核水平的显著增高^[15]。对弱诱变剂来说,测试浓度选择不当往往会获得假阳性结果。若浓度选择过高,则会导致试验生物中毒,细胞分裂受阻,微核率下降,造成结果判断上的困难。可见待测物最高实验浓度(MC)的确定是遗传毒性试验的关键问题之一。这个问题在以往以水生生物为动物模型的遗传毒性试验中没有很好地解决。在青蛙蝌蚪微核试验中,作

者以蝌蚪在处理期间不出现死亡和明显生理异常(如进食受阻、失重和形态异常等)的最大浓度作为最高实验浓度。此外,由于细胞分裂与微核的形成密切相关,细胞分裂指数的变化也是确定 MC 的参考指标。

3. 统计方法 由于微核细胞不遵循正态分布原则^[18],选择适当的统计方法显得十分必要。方差分析法能够充分利用所得数据,获得较多的信息。但它比较复杂,不易掌握,有时对数据还需必要的专家加权。本文介绍的中位数分析法是一种非参数统计法,不受微核细胞率组内变异的限制,适于大样本数据分析。本实验数据分别用两种方法进行分析,统计结果几乎完全一致。加之中位数分析法比较简单、容易掌握和普及,是青蛙蝌蚪微核试验的较理想的数理统计方法。

4. 结果判定 运用适当的统计方法得到的统计结果是判定实验结果阳、阴性的主要依据。此外还必须考虑实验浓度的选择、处理时间长短及实验结果的重复性等因素。在任何一种浓度不同处理时间所取得的可重复的阳性结果都是有效的。强诱变剂往往在较短的处理时间或较低浓度下就能取得阳性结果,而弱诱变剂则需较长的时间和较高的浓度。阴性结果的判定比较复杂,一种化学品只有在最大实验浓度(MC)和足够长的处理时间(12d)条件下取得的阴性结果才能被接受。

5. 取材的季节限制 在自然环境中两栖类幼体只有在春季和初夏可获得,这无疑是该实验材料的一大缺陷,限制了该实验方法的应用。在实验胚胎学中获得非生殖季节两栖类胚胎的技术早已建立^[19-21]。因此,通过冷藏、催青和人工授精的途径以及实验材料的实验室培养,不仅使一年四季获得实验材料成为可能,而且可充分掌握实验材料的环境背景和遗传背景资料,有利于质量控制。

根据本实验结果及以前的研究工作,作者提出以下青蛙蝌蚪微核试验(micronucleus test on frog tadpoles)的基本程序和原则:

1. 实验材料 取人工授精的卵或野外采集刚产出的授精卵,实验室培养。选第 XXX 期蝌蚪用于实验。同一批实验的蝌蚪须来自相同亲本。

2. 预实验 确定待测化学品的最高实验浓度(MC)。

3. 实验处理 每种待测化学品设置 MC, MC/2, MC/10 三个浓度和对照。20 只蝌蚪一组,在 $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 条件下处理 12d。

4. 制备血涂片 蝌蚪麻醉后取心脏法制备血涂片。每只蝌蚪制备一张涂片,每组制备 15 至 20 张。(n>9)。

5. 数据分析 每张血涂片检查 1000 个红细胞,计算微核细胞率。中位数分析法进行数据分析。

6. 结果判定

参 考 文 献

- [1] Zimmermann F K, Faylor-Mayer R E. Mutagenicity testing in environmental pollution control. Ellis Horwood Limited. 1985,9—13.
- [2] 陈军建、夏宜珍. 城镇污水诱发青蛙蝌蚪微核及其在环境监测中的应用. 水生生物学报, 1989, 16(4): 305—312.
- [3] 赵尔宓. 介绍一种蛙类胚胎及蝌蚪发育的分期. 生物学通报, 1990, 1: 13—17
- [4] 贺维顺、王蕊芳. 蝌蚪 *Bufo bufo andrewsi* 血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究. 动物学研究, 1990, 11(1): 1—5.
- [5] Jaylet A, Depairs P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res*, 1986, 164: 245—257.
- [6] MacGill R, Tuckett J W, Larsen W A. Variations of box plots. *Am Statist*, 1978, 32: 12—16.
- [7] Segal G A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulphonate. *Mutation Res*, 1984, 134: 113—142.
- [8] Hooftman R N, de Raat W K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Res*, 1982, 104: 147—152.
- [9] Heddle J A, Hite M, Kirkhart B, Mavournia K, MacGregor J T, Newell G W, Salamone M F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, A report of the U S Environmental Protection Agency GeneTox Program. *Mutation Res*, 1983, 123: 61—118.
- [10] Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A (ed). Chemical mutagens, principles and methods for their detection. Plenum, New York. 1976, 4: 31—53.
- [11] Gichner T, Veleminsky J. Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mutation Res*, 1982, 99: 129—242.
- [12] 陈世明、朱永洪、曹卫. 微核试验敏感动物种系的研究, I. NIH 小鼠和中国地鼠对 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱发微核效应的敏感性比较. 药物分析杂志, 1989, (2): 96—99.
- [13] Bruce W R, Heddle J A. The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella*, and sperm abnormality assays. *Can J Genet Cytol*, 1979, 21: 319—334.
- [14] Friedman M A, Carter H, Staub J, Segreti A. Relative mutagenic potencies determined in the micronucleus test. *J Theor Biol*, 1978, 73: 575—584.
- [15] Matter B E, Grauwiler J. Micronuclei in mouse bone marrow cells, a simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberration. *Mutation Res*, 1974, 123: 239—249.
- [16] Watanabe M, Honda S, Hayash M, Matsuda T. Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. *Mutation Res*, 1982, 97: 43—48.
- [17] Abbondandolo A, Dogliotti E, Lohman P H M, Berends F. Molecular dosimetry of DNA damage caused by alkylation, I. Single-strand break induced by ethylating agents in cultured mammalian cells in relation to survival. *Mutation Res*, 1982, 92: 361—377.
- [18] Mackey B E, MacGregor J T. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutation Res*, 1979, 64: 195—204.
- [19] 王幽兰. 长年控制蟾蜍生殖期的研究. 动物学报, 1954, 6(1): 81—84.
- [20] 张贵寅. 青蛙催育和人工授精的方法. 生物学通报, 1959, (10): 458—460.
- [21] Rugh R. Experimental Embryology, Techniques and Procedures, 3rd ed. Burgess Publishing Company, 1962, 91—104.

ESTABLISHMENT OF A TESTING SYSTEM, THE MICRONUCLEUS TEST ON FROG TADPOLE, TO DETECT MUTAGENS IN WATER BODY

Chen Junjian and Xia Yicheng

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072*)

Abstract

An investigation was made on the effects of chemical concentration, exposure time and developmental stage of the tadpole on the induction of micronuclei in the erythrocytes of the frog tadpole (*Rana nigromaculata*) by two chemicals, ethyl methanesulphonate and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Characters and correlations among several testing indices were analysed. Suggestions were made on the basic procedures and principles for a testing system, the micronucleus test on frog tadpole, for the detection of mutagens in aquatic environments. Besides, a unique cytological structure, the "Small body", was described, and the metabolic mechanism of micronuclei was discussed preliminarily.

The testing system is sensitive, standardized and practical. It can be used not only for screening mutagens in water body and evaluating genotoxicity of chemicals, but also for detecting mutagenic activity of polluted fresh-waters.

Key words Frog tadpole, Micronucleus test, Ethyl methanesulphonate, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, "Body"