DOI:10.19789/j.1004-9398.2024.04.011
文献引用:李雅轩,张飞雄,赵昕,等.蚕豆根尖细胞微核检测方案与数据分析[J].首都师范大学学报(自然科学版),2024,45(4):85-89. LI Y X, ZHANG F X, ZHAO X, et al. Micronucleus detection design and data analysis of *Vicia faba* root-tip cells [J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition),2024,45(4):85-89.

蚕豆根尖细胞微核检测方案与数据分析*

李雅轩，张飞雄，赵 昕，胡英考，晏月明，李小辉**
（首都师范大学生命科学学院，北京 100048）

摘要:微核检测技术在世界范围内被广泛应用于环境监测以及食品安全性检测,由于其可操作性强,亦是大学开展课外活动,培养学生科研能力的有效方法。本文针对传统方法中本底微核数变异大和检验效率低的问题,提出了新的设计方案及分析方法。对师生进行课外研究及环境因素的遗传安全性分析与鉴定具有一定指导意义。

关键词:微核;微核检测;有丝分裂指数;数据分析;生物统计
中图分类号:Q3-3 **文献标志码**:A

Micronucleus detection design and data analysis of *Vicia faba* root-tip cells*

LI Yaxuan，ZHANG Feixiong，ZHAO Xin，HU Yingkao，YAN Yueming，LI Xiaohui**
（College of Life Sciences，Capital Normal University，Beijing 100048）

Abstract: Micronucleus detection technology is widely used in environment monitoring and food safety inspecting all over the world and it is also a routine method for undergraduates to perform scientific research thinking training in genetics experiment teaching of university. In this study, a proposal was presented to enhance the test efficiency of micronucleus detection technology. Compared with the traditional micronucleus detection method, the new method is easier to find the difference among the experimental data and therefore identify the disadvantageous effectors on biological development. This work has a certain guiding significance for teachers and students to carry out the research of laboratory opening project and identification of genetic safety of environmental factors.

Keywords: micronucleus; micronucleus detection; mitotic index; data analysis; biostatistics
CLC: Q3-3 **DC**: A

0 引 言

微核是独立于主核之外的微小核体,位于细胞质中;其直径不超过主核的1/3,呈圆形或椭圆形。在不利环境诱导下,染色体断裂产生的小片段或迁移异常的整条染色体未能在细胞分裂末期进入子核,从而形成细胞质中的微小核结构[1-2]。微核试验正是通过分析异常结构出现的比例来评估环境因素对遗传物质作用的强度。微核检测技术创建于20世纪70年代中期,从80年代早期开始以蚕豆(*Vicia faba*)、紫露草(*Tradescantia reflexa*)等植物生长点细胞或减数分裂小孢子形成过程中各阶段细

收稿日期:2023-11-13
* 北京市自然科学基金项目(6212001)
** 通信作者:lixiaohui@cnu.edu.cn

胞作为试验材料[1-3]。相较于其他材料,蚕豆具有天然优势,主要表现在:材料易获得,成本低;操作相对简单,试验周期短;染色体数量相对较少,染色体较大,易于观测;染色体对于环境因素的作用敏感,会对微量的生物毒素做出显著反应;能够同时呈现染色体断裂、丢失、不分离、细胞分裂延迟和凋亡等多种表型,信息量大;蚕豆根尖与动物试验的微核测试结果高度一致,可达99%以上[4],对于鉴定影响人体遗传物质的环境因素具有参考价值。基于以上特点,蚕豆已成为研究人员青睐的试验材料,其根尖微核检测技术被我国生态环境部收录为环境监测标准[5],广泛应用于环境质量和食品安全性评价[6-19]。如:张丽霞等[13]的研究表明常规氯化物消毒剂处理后出厂的自来水引起蚕豆根尖细胞微核率增加,证实化学消毒处理过程可增强水体的致突变性;赵昕等[14]利用微核检测技术对时下颇受青少年欢迎的辣条进行食用安全性分析,结果显示不同稀释浓度下的辣条提取液均有一定遗传毒性;张乐等[15]研究证实市售染发剂对蚕豆根尖细胞有丝分裂有抑制作用,并增加微核发生风险;张英慧和刘君[18]证实廉价的$CaCl_2$能有效消除蚕豆的铅中毒症状,降低根尖细胞微核发生率和染色体畸变率,为治理被重金属污染的土壤提供了新思路。

饮食与环境安全直接关系到公众的身体健康和生命安全,摄入一定剂量的诱变剂有可能引起染色体损伤而诱发畸变,甚至导致癌症的发生。在组织开展课外活动中,可以引导学生根据自己的兴趣,利用简便易操作的蚕豆微核检测技术探索身边环境因素对遗传物质的影响。一方面通过选择课题、设计试验方案、收集及分析数据等实践活动,可以训练学生的动手能力和培养科研思维[20-21];另一方面,由于选题大多与生活密切相关,其结果有助于学生提高环境保护意识[22],树立健康的饮食观念,从而对个人的社会活动产生积极影响。

在传统微核试验中,对照组及处理组各选取6粒种子的主根根尖,每个根尖观察约1 000个细胞,统计其中具有微核的细胞数量,计算微核千分率、污染指数或变异指数,以说明处理因素作用的显著性[1],这样的试验设计和数据分析存在着一些问题。包括:(1)对照组与处理组分配了不同的种子,种子之间的本底差异有可能会影响对待测因素遗传毒理性的判定;特别是在种子数量较少的情况下问题更为突出。(2)种子用量偏少也会影响重复性和准确性,降低试验精度。(3)数据处理和分析方法不合理,结果不可信。针对以上问题,本文对试验设计方案进行优化,同时介绍了数据处理和分析的一般方法,以期对培养学生分析问题能力提供帮助。

1 试验设计方案的优化与统计量的选择

方案1:主根根尖微核数检测参照常规微核试验方法[5],采用成组试验设计。

方案2:为了有效控制种子间本底微核数差异,以侧根为研究对象,采用配对试验设计。具体操作如下:6粒种子(命名为蚕豆1~6)经过清洗消毒于25 ℃常规培养,待侧根长到2~3 cm时,取每株蚕豆的1/2侧根进行固定保存(卡诺氏固定液固定24 h),作为对照组;蚕豆及其余侧根由待测液(环境因素)处理后缓苗24 h固定保存,作为处理组。该试验设计中,对照组与处理组的根尖细胞均来源于同一粒种子,其遗传背景与培养微环境相同,只存在处理条件的差异。同时,由于每粒种子侧根数量多(>10条),为制片提供了更多的受试材料,从而保证数据的可靠性。

在微核检测中,通常以微核千分率和污染指数来分析测试因素的毒理作用[1-2,7]。污染指数或变异指数是微核检测中最基本的参数;数值的变化反映了待测因素的毒理状况。以水质监测为例,该数值为0~1.5时,表示基本没有污染;数值为1.5~2.0时,表示存在轻度污染;数值为2.0~3.5时,表示存在中度污染;数值>3.5则表示有重度污染。凡数值处于临界值时,定义为上一级污染水平[1-2,7]。

微核的形成,不仅取决于染色体的损伤或纺锤体形成异常,还同时与细胞分裂水平密切相关。上一个细胞周期中发生的染色体损伤,将在下一个细胞周期的间期以微核的形式表现出来。因此,还应对有丝分裂指数加以关注。所谓有丝分裂指数是指分裂期细胞在所观察细胞中所占的比例,以百分率表示。由于微核的形成源于环境因素对染色体造成的损伤,因此在显微镜下,不仅能观察到存在于细胞分裂间期的微核,还可以看到微核的形成过程,其前期标志物为染色体断片和桥(图1)。当待测因素显著抑制细胞分裂,会降低有丝分裂指数[23],必然导致微核千分率偏小,最终影响对待测因素毒理效应的判定。因此,在统计微核数之前,要确保对照组和处理组细胞处于同等分裂状态。

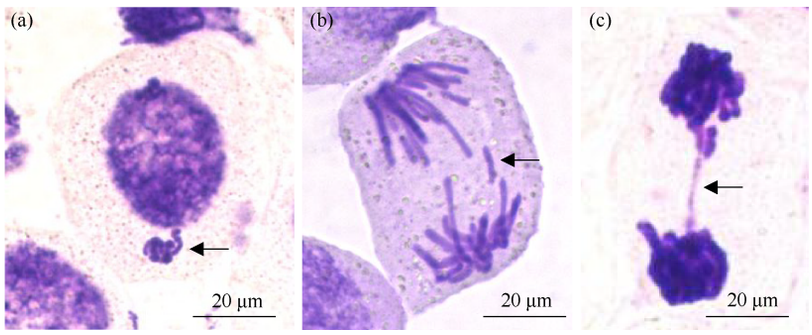


图1　环境诱导染色体损伤

(a)微核;(b)染色体断片;(c)染色体桥

2　数据分析方法的选择

2.1　细胞分裂差异性分析

鉴于细胞分裂状态也影响微核的形成,故在统计微核之前,应确保细胞处于相同的分裂状态。在此,通常采用列联表卡方(χ^2)检验法判定细胞分裂是否依赖于处理手段[24]。接下来,以2×2列联表为例介绍χ^2检验的原理和应用。将对照组和处理组的间期和分裂期细胞数按行(或列)排列,形成2×2实测数据表。基于独立公式,间期和分裂期细胞数的理论值(T_{ij})为

$$T_{ij}=(T_i\times T_j)/T,$$

式中:T_i为第i行的总和;T_j为第j列的总和;T为总和。χ^2计算式为

$$\chi^2=\sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1}^{2}\frac{(O_{ij}-T_{ij})^2}{T_{ij}},$$

$$df=(a-1)(b-1),$$

式中:O_{ij}为实测频数;df为自由度;a为行数;b为列数。查表得0.05的上侧分位数。当χ^2值小于等于上侧分位数(即$P\geq0.05$)时,差异不显著,此时可对微核数直接比较;当χ^2值大于上侧分位数(即$P<0.05$)时,细胞分裂状态差异显著,需要调整环境因素的剂量,以满足微核分析所需条件。

需要注意的是,χ^2检验应用的前提是$T_{ij}\geq5$;当$T_{ij}<5$时,应该用Fisher精确检验法。由于该试验数据一般满足上述条件,故在此不作赘述。

2.2　多样本均值差异性分析

方差分析(F检验)可以同时判定多个总体均值是否相同,应满足的条件是:每个总体都应服从正态分布,各个处理的总体方差必须相同,以及处理效应和误差效应可叠加[24]。值得注意的是:对于微核检测试验来说,样本间的数据变异容易出现较大幅度波动,因此应着重考察方差齐性。

2.3　微核平均数差异显著性分析

依据试验设计方案的不同,选择独立样本或配对样本t检验[24]。在方案2中,将来源相同的侧根随机分配到对照组和处理组,选择配对数据t检验。所谓配对数据是指依据试验材料之间内在的联系,特别是遗传上的同质性,将试验材料配成对子,分别施加不同的处理而获得的数据。由于同一对子的遗传背景相近,可以较大程度控制试验误差,提高检验的精确度与准确性。

3　应用SPSS分析遗传学数据

Excel、SPSS、SAS都是数据分析的常用软件。下面结合实例,介绍SPSS19.0软件的具体操作[25]和数据报告解读。

3.1　列联表χ^2检验

用质量分数分别为0.1%、0.2%和0.5%的某试剂与对照组各处理6粒蚕豆种子的主根根尖,各统计≥6 000个根尖细胞的分裂状态(表1)。在0.05水平下判定细胞分裂状态是否与试剂的质量分数有关。建立数据文件后,在数据下拉菜单中,点击加权个案,先对数据变量进行加权。在分析下拉菜单中,依次点击描述统计、交叉表,再分别将行变量(r)引入行框,列变量(c)引入列框;点击统计量,勾选χ^2。相关数据如表1所示,所有单元格理论频数均>5,满足χ^2分析的条件。经计算,χ^2=4.731,相应的伴随概

表1　不同质量分数处理下的间期和分裂期细胞数

单位:个

质量分数/%	间期细胞		分裂期细胞	
	实测频数	理论频数	实测频数	理论频数
0	5 838	5 836	162	164
0.1	5 913	5 933	187	167
0.2	5 933	5 933	167	167
0.5	5 991	5 972	149	168

率为0.193,P>0.05。因此,认为根尖细胞的分裂状态与试剂的质量分数无关,可以进行后续分析。

3.2 方差分析

每根根尖统计1 000个细胞中具有微核的细胞数,数据如表2所示。在0.05显著性水平下判定待测试剂对细胞毒理的影响。建立数据文件后,在分析菜单下,选择比较平均值,点击单因子方差分析,将分析变量(即因变量)点入分析变量框中,分组变量(即因子)点入因子框;做两两比较时,从假定方差齐性中选择Duncan;显著性水平设为0.05;在选项中选择方差同质性检验。首先,应用Levene统计量对方差齐性进行判定。本例F=3.385,相应的伴随概率为0.038(<0.05),因此否定方差齐性的假设。其次,利用反正弦对原始数据进行转化。经Levene再次检验,计算得F=1.806,相应的伴随概率为0.179(>0.05),因此方差具有齐性。基于转化后数据,利用方差分析判定该试剂是否对微核数有影响。处理均方和误差均方的比值为13.553,相应的伴随概率接近于0(<0.01),这表明不同质量分数处理下,微核数量的差异达到极显著水平。最后,应用Duncan法检验处理之间的差异是否显著(α=0.05)。质量分数分别为0、0.1%、0.2%和0.5%时,蚕豆根尖细胞平均微核千分率分别为3.17‰、4.67‰、6.50‰和9.17‰。经检验,0.1%处理下蚕豆根尖细胞产生的微核数虽较0有增加,但二者的差异未达到显著性水平(P>0.05);0.2%处理下蚕豆根尖细胞产生的微核数与0差异显著(P<0.05),但与0.1%差异不显著(P>0.05);0.5%处理下蚕豆细胞根尖产生的微核数与前三者差异均显著(P<0.05)。

3.3 配对试验设计与配对数据t检验

在上述分析中,0.1%的试剂处理蚕豆根尖细胞诱导出的微核数虽然高于对照组,但结果差异无统计学意义,为了进一步证实此质量分数下,试剂是否会对细胞产生毒害作用,采用配对试验设计进一步优化实验。对上述2种试剂处理后蚕豆侧根的微核千分率进行统计分析,相关结果如表3所示。SPSS工作界面中输入数据,在分析菜单下,选择比较均值,选择配对数据t检验;在对话框中输入要比较的样本,将置信区间百分比设为95.0%。2种质量分数试剂处理后,6粒蚕豆侧根的微核千分率差值分别为0、3‰、0、1‰、2‰和3‰,经检验,与0相比,0.1%处理下蚕豆侧根产生的微核数差异显著(t=2.666,P=0.045,即P<0.05);说明0.1%质量分数的试剂也会对细胞产生毒害作用。上述案例说明,对于关键剂量毒害作用的判定,配对试验设计比成组试验设计更有效。

4 讨论与总结

2019年,生态环境部发布了《水质 致突变性的鉴别蚕豆根尖微核试验法标准:HJ 1016—2019》[5],数据处理采用Kruskal-Wallis非参数检验法,主要原因在于原始数据不易满足方差分析应用条件,尤其是方差齐性。在满足应用条件以及显著性水平和样本容量相同的条件下,方差分析检验法的检验效率要高于Kruskal-Wallis。因此,通常的做法是优先采用反正弦或平方根转换[24,26];仍不满足方差齐性的,可以采用非参数检验法。水质和食品安全关系我国14亿人口的身体健康和生命安全;基于提升饮食安全基准线考虑,宜坚持最严格的标准。因此,在应用Kruskal-Wallis法检验微核发生率差异显著性时,是否下调显著性水平(增大α值)是值得进一步探讨的问题。另外,针对某些化学物质显著影响细胞分裂行为的问题[27-28],国家标准要求有丝分裂指数>20.0‰[5]。采用这一经验数据作为品质控制标准,简单、直接和高效,但缺点是无法判定接近20.0‰时待测因素的毒理作用。一个替代方案是,采用χ^2统计量检验对照组和处理组的有丝分裂指数是否存在差异。

本案例中,Duncan检验法未能检测出0.1%质量分数的试剂对微核发生的效应,但在采用配对试

表2 不同质量分数试剂时重复处理6粒蚕豆根尖细胞产生的微核数统计

质量分数/%	微核千分率/‰							转换值[a]					
	蚕豆1	蚕豆2	蚕豆3	蚕豆4	蚕豆5	蚕豆6	平均值	蚕豆1	蚕豆2	蚕豆3	蚕豆4	蚕豆5	蚕豆6
0	3	3	4	2	4	3	3.17	3.14	3.14	3.63	2.56	3.63	3.14
0.1	3	3	4	6	6	6	4.67	3.14	3.14	3.63	4.44	4.44	4.44
0.2	5	8	6	7	5	8	6.50	4.05	5.13	4.44	4.80	4.05	5.13
0.5	13	9	10	11	7	5	9.17	6.55	5.44	5.74	6.02	4.80	4.05

注:[a]为反正弦转化后数据。

表3　不同质量分数试剂诱发的6粒蚕豆侧根微核千分率

单位:‰

质量分数/%	蚕豆1	蚕豆2	蚕豆3	蚕豆4	蚕豆5	蚕豆6
0	4	2	3	4	4	2
0.1	4	5	3	5	6	5
差值	0	3	0	1	2	3

验设计方案后,该质量分数下的微核千分率较对照组显著增加。与成组设计相比,配对设计能够排除数据之间可能存在的相关性[24],更容易检验出平均数之间的差异。通常情况下,1粒蚕豆可以生出>10条侧根,将同一种子的侧根随机分配到对照组和处理组,可以有效控制由本底差异所造成的误差。

本文以微核检测为例,分析了如何在试验设计中尽量减少误差来源,并介绍了与之相应的数据处理与分析方法,对教师指导学生开展课外活动,帮助学生合理设计试验方案,选择适当及有效的统计方法,得出准确的研究结果具有重要指导意义。

参 考 文 献

[1] 金波,陈光荣.遗传毒理与环境检测[M].武汉:华中师范大学出版社,1998:1-5+275-280.

[2] 曹佳,林真,余争平.微核试验原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M].北京:军事医学科学出版社,2004:1-9.

[3] 周俊,陈桥,沈丽娟.蚕豆根尖微核致突变性试验标准修订背景研究[J].环境监测管理与技术,2018,30(3):8-11.

[4] 王映雪.微核技术在环境监测中的应用概况[J].云南环境科学,2000,19(4):53-55.

[5] 生态环境部.水质 致突变性的鉴别蚕豆根尖微核试验法:HJ 1016—2019[S].北京:中国环境出版集团,2019.

[6] 屈艾,汪承润,薄军.稀土元素钬对蚕豆的细胞毒性和遗传毒性研究[J].遗传,2004,26(2):195-201.

[7] 李雅轩,胡英考,蔡民华,等.应用微核技术对北京三海水域污染状况的研究[J].生物学杂志,2005,24(9):1106-1109.

[8] 刘增禹,蔡文国.方便面调料对蚕豆根尖的遗传毒性[J].食品科技,2009,34(4):252-253+258.

[9] 赵昕,胡英考,蔡民华,等.3种维生素对亚硝酸钠致蚕豆根尖细胞微核效应的影响[J].食品科学,2010,34(5):240-243.

[10] 赵志国,郭红娟,王任翔.应用蚕豆根尖细胞微核技术评价广西平乐锰矿废弃地土壤的污染状况[J].广西植物,2011,31(1):102-106.

[11] 李雅轩,赵昕,胡英考,等.有机硒粉对亚硝酸钠引起蚕豆根尖微核的拮抗作用研究[J].安徽农业科学,2012,40(24):11934-11935.

[12] 李艺,张燕青,李鑫,等.杏鲍菇提取液对蚕豆根尖细胞微核形成的影响[J].安徽农业科学,2013,41(13):5646-5647.

[13] 张丽霞,张明,治洪,等.两种遗传毒性检测方法在饮水安全监测的应用对比[J].环境与健康杂志,2018,35(8):707-710.

[14] 赵昕,陈宣齐,张燕翔,等.微核检测在辣条食用安全性评估中的应用[J].首都师范大学学报(自然科学版),2022,43(2):56-60.

[15] 张乐,胡滢,宋家璇,等.染发剂对蚕豆根尖细胞的遗传毒性研究[J].当代化工研究,2023,19:44-46.

[16] 刘伟,王立安.简介微核检测技术[J].生物学教学,2016,41(7):64-65.

[17] 曹佳.微核试验在中国的应用、发展与展望[J].遗传,2003,25(1):73-76.

[18] 张英慧,刘君.钙对铅胁迫下蚕豆根尖细胞微核率和染色体畸变率的影响研究[J].种子科技,2022,40(3):7-9.

[19] 秦永燕,王雪婷,班子茹,等.抗坏血酸对铜胁迫蚕豆种子萌发和根尖细胞损伤的缓解作用[J].农业研究与应用,2022,35(2):12-17.

[20] 翁贵英,谢斐,李金辉.遗传学设计性实验的探索与实践:以微核检测技术为例[J].六盘水师范学院学报,2019,31(3):109-112.

[21] 左佳靓,朱津苇,肖润民,等.环境毒理学自主实验设计与创新能力培养[J].实验室科学,2020,23(5):52-55.

[22] 刘梅芳,谭艳平,王文燕.遗传学“微核检测技术”自主设计实验的教学探索[J].实验室科学,2019,22(3):17-19+23.

[23] 刘羽,罗瑭秋琦,张亮,等.4种酚类物质对蚕豆根尖细胞的遗传毒性研究[J].环境科技,2019,32(1):7-11.

[24] 杜荣骞.生物统计学[M].北京:高等教育出版社,1999:103-185.

[25] 时立文.SPSS19.0统计分析从入门到精通[M].北京:清华大学出版社,2012.

[26] 李春喜,姜丽娜,邵云,等.生物统计学[M].北京:科学出版社,2016:126-130.

[27] 易志刚,傅巧姑.应用蚕豆根尖微核技术研究3种重金属的遗传毒性[J].福建农林大学学报(自然科学版),2009,38(4):396-399.

[28] 王强,孟巧巧,王煜,等.两种桉树叶挥发物对蚕豆根尖细胞有丝分裂行为的影响[J].四川师范大学学报(自然科学版),2023,46(5):685-692.

(责任编辑:王　媛)