

鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₂、TA₉₄ 预培养进行 Ames 试验的研究

黄念君 林 飞

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

自 1975 年 Ames^[1] 等首创用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验检测化学物质的潜在致癌性以来,受到世界各国的重视,被首选为观察基因

点突变的好方法,应用于筛选化学物质的遗传毒性和潜在致癌性。

近年,Ames 法又得到很大的改进,主要是

测试菌种和测试程序的变动,使 Ames 法的敏感性有所提高。我们用鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₂、TA₉₄ 预培养法进行 Ames 试验后,使丝裂霉素 C 获得阳性反应,并使正定霉素、甲基亚硝基胍在更低的浓度下获得阳性反应,现将结果报道如下:

材料与方 法

(一) 测试菌株

组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhimurium*) TA₉₂、TA₉₄ 及 TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₅₃₅、TA₁₅₃₇ 分别由日本变异原部及 Ames 教授赠给。贮存菌株液氮保存。应用菌株于 -80℃ 低温保存。

(二) 培养基

1. 肉汤培养基: 蛋白胨 1g, 氯化钠 0.5g, 牛肉浸液 100ml, 调 pH 至 7.4。

2. 牛肉浸膏培养基: 琼脂 2g, 蛋白胨 1g, 氯化钠 0.5g, 鲜牛肉浸出液 100ml, 调 pH 至 7.4。

3. 底层培养基: Vogel-Bonner* 培养基加 2% 纯化琼脂, 2% 葡萄糖, 15 磅 20 分钟高压灭菌。

4. 上层培养基: 纯化琼脂 0.6g, 氯化钠 0.5g, 磷酸缓冲液 100ml, 15 磅 20 分钟高压灭菌, 临用时加 0.5mM-HCl 组氨酸和生物素 D 混合液 10ml。

(三) S₉ 及 S_{9mix} 的制备

体重 200g 的 Wister 大鼠 (雄性) 10 只。每只按 500mg/kg 剂量腹腔注射多氯联苯。给药后 5 天, 腋动脉放血致死, 无菌剖腹后用 0.15M 氯化钾肝门静脉灌注冲洗, 然后取肝称重。每 g 肝加 2ml 0.15M KCl 溶液, 制成匀浆液 (以上操作均在 4℃ 左右)。然后以 9000rpm 低温离心 20 分钟, 取上层液, 此液即 S₉, 贮存于 -80℃ 冰箱备用。每毫升 S_{9mix} 中含辅酶 II 4 μmol, 6-磷酸葡萄糖 5 μmol, 氯化镁 8 μmol, 氯化钾 33 μmol, pH7.4 磷酸缓冲液 100 μmol, S₉ 100 μl, S_{9mix} 必须临用临配, 并保持在 4℃ 以下。

(四) 增菌培养

从 -80℃ 冻存的小管中, 取少许菌液, 接入含 5ml 肉汤培养基的 L 型增菌管中, 37℃ 振荡培养或静止培养当天使用。

(五) 受试物的制备

称取下列化学物质: 丝裂霉素 C (Mitomycin C), 盐酸正定霉素 (Daunomycin · HCl), 甲基亚硝基胍 (N-methy-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine), 环磷酰胺 (Cyclophosphamide), 阿的平 (Atabrium), 用合适的溶媒配制成不同的浓度。每一种化学物质至少有 5 种测试浓度。

(六) 预培养法

每平皿加底层培养基 20ml, 固化。在每一标记的试管中, 依次加入受试物 40—100 μl、增菌培养液 100 μl 及 500 μl S_{9mix} 液或磷酸缓冲液, 在恒温水浴摇床中 37℃ 振荡培养 20 分钟。将已预培养后的每管加入 2.5ml 溶化的上层培养基 (45℃), 充分混匀后, 均匀倒入每个平皿中, 37℃ 培养 48—72 小时。首先用实体显微镜检查有无生长背景, 然后用半自动菌落计数器, 计数每个平皿的回复突变菌落数。实验应设有阳性和阴性对照 (溶媒及空白)。

(七) 直接法

受试物, 增菌培养液及 S_{9mix} 混合液混合后, 不经振荡培养, 其余过程和预培养法相同。

(八) 判断标准

每一浓度至少设有 2 个平行的平皿, 初筛的最高浓度应达到 5mg/皿或背景有轻微毒性的剂量。最低剂量所出现的回复突变菌落数应和溶媒对照皿基本相仿。在上述基础上, 受试物所诱发的回复突变菌落数, 如果超过阴性对照组的 2 倍, 并有剂量反应关系或某一测试点的可重复阳性反应可记为阳性, 反之则为阴性。

结 果

(一) 测试菌株的遗传标记及自发回复突变 (表 1)

* V-B 培养基配方: MgSO₄ · 7H₂O 2g, Citric acid · H₂O 20g, K₂HPO₄ 100g, Na₂NH₄HPO₄ · 4H₂O 35g, 加水至 1000ml。

表 1 6 株测试菌株的特性

菌株	His ⁻	rfa	R 因子	uvrB	自发回复突变数/皿
92	+	+	+	-	70-105
94	+	+	+	-	10-45
98	+	-	+	+	35-50
100	+	-	+	+	200-300
1535	+	-	-	+	25-40
1537	+	-	-	+	10-20

表 1 显示以上测试菌株均带有一定的遗传标记,即组氨酸缺陷(His⁻);脂多糖(rfa)屏障的丢失或存在;有或无带抗药因子的质粒(R因子),切除修复系统(uvrB)的丢失或存在;具有一定的自发回复突变数。符合 Ames 原菌株的要求,可供试验用。

(二) 振荡与静止培养

不同培养法对细菌的生长速度是不同的。

TA₉₂、TA₉₄、TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₅₃₅ 及 TA₁₅₃₇ 静止培养法的活菌数只能达到 3.1—7.8×10⁸/ml,而振荡培养能达到 1.4—3.5×10⁹/ml,振荡培养的活菌数明显高于静止培养。

(三) TA₉₂、TA₉₄ 等测试菌株在预培养法中的敏感性(表 2, 图 1)

从图 1 及表 2 结果可见,5 种致突/致癌剂在一定的浓度范围内诱发了突变活性。丝裂霉素 C 和盐酸正定霉素既诱发移码突变又诱发碱基置换突变,但盐酸正定霉素诱发碱基置换突变的能力很弱。环磷酰胺和甲基亚硝基胍只诱发碱基置换突变,而阿的平只诱发移码突变。各种化学物质所诱发的回复突变数均呈现一定的剂量反应关系。

在 Ames 试验中引入预培养测试程序后和直接法所得的结果不完全相同。甲基亚硝基胍

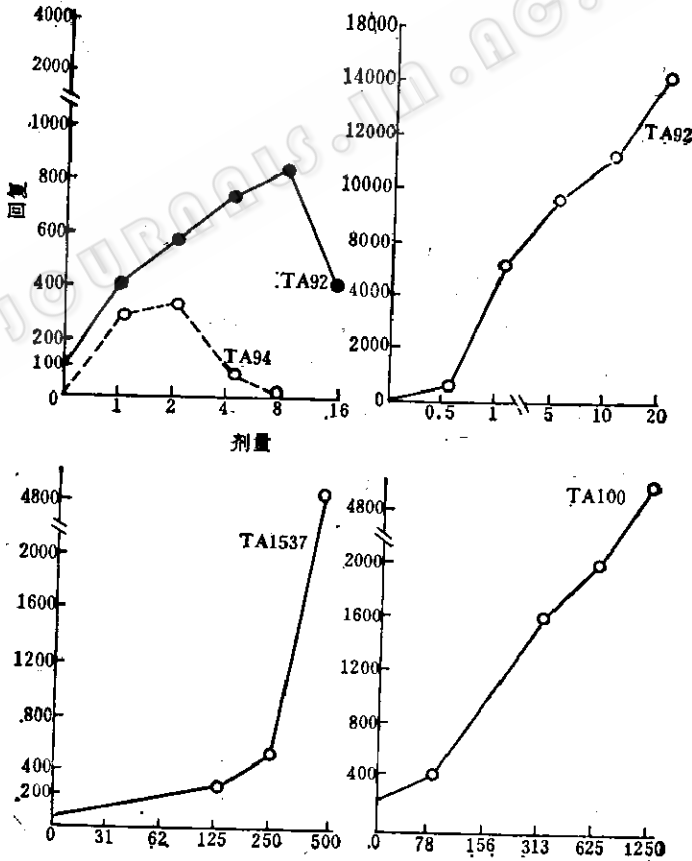


图 1 四种致突/致癌剂所诱发的剂量反应曲线

1. 丝裂霉素 C 2. 甲基亚硝基胍 3. 阿的平 4. 环磷酰胺

表2 测试菌株在预培养法中的敏感性

化学物质	浓度 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	溶媒**	菌株的回复突变数*												
			TA ₉₂		TA ₉₄		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₅₃₅		TA ₁₅₃₇		
			- S _{9mix}	+ S _{9mix}	- S _{9mix}	+ S _{9mix}	- S _{9mix}	+ S _{9mix}	- S _{9mix}	+ S _{9mix}	- S _{9mix}	+ S _{9mix}	- S _{9mix}	+ S _{9mix}	
丝裂霉素C	0.05-16	S	++	-	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
盐酸正定霉素	0.15-20	S	-	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	-	-	-
环磷酰胺	78-5000	D	-	+	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	-	-
阿的平	31.3-1000	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
甲基亚硝基胍	0.09-20	D	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-

*“-”<对照2倍, “++”>对照5倍, “+++”>对照10倍。

**“S”: 生理盐水, “D”: 二甲基亚砷。

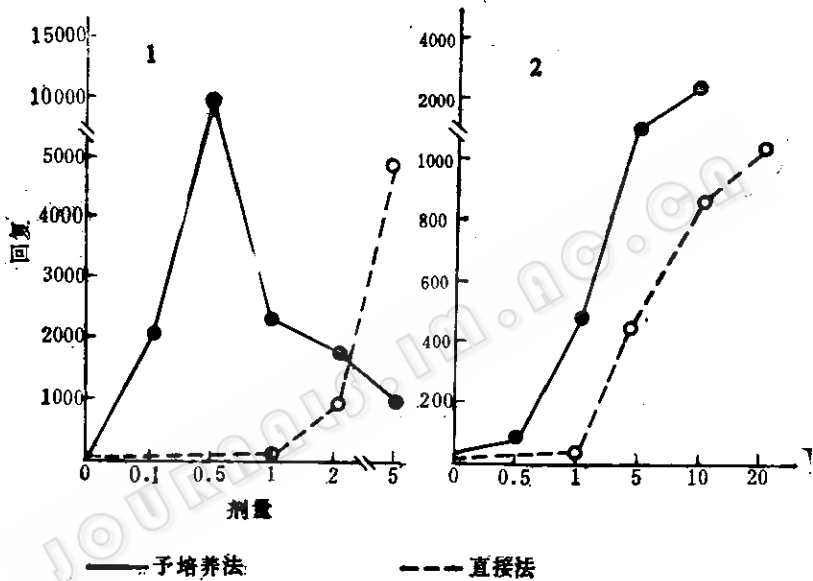


图2 测试菌株在预培养法和直接法中的敏感性比较

1. 甲基亚硝基胍, TA₁₅₃₅。2. 盐酸正定霉素, TA₉₈。

和盐酸正定霉素采用预培养后, 受试物可以在更低的浓度出现阳性反应, 并达到更多的回复突变菌落数(图2)。

讨 论

1. Ames 法敏感性的提高: 用 Ames 法测试的化学物质有烷化剂、亚硝胺、多环碳氢化合物、霉菌毒素、芳香胺、硝基咪唑类、抗肿瘤抗菌素及一些已知对人有致癌性的化学物质, 其阳性检出率为 87.7%^[3], 测试范围之广和阳性符合率之高是比较满意的。但毕竟还有一定的假阴性结果。致突/致癌剂丝裂霉素 C 用过去沿用

的 5 株标准菌株 (TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₅₃₅, TA₁₅₃₇, TA₁₅₃₈) 进行测试, 只能获得阴性结果。本文用前 4 株菌测试也证实这一点。近年 Yahagi 等^[2]学者又发展了测试菌株 TA₉₂、TA₉₄。这 2 株菌对硝基类和 DNA 交联剂等敏感, 因此丝裂霉素 C 能诱发 TA₉₂ 和 TA₉₄ 回复突变。本实验显示了丝裂霉素 C 的诱变活性并呈现剂量反应关系(见图 1)。

盐酸正定霉素, 环磷酰胺, 甲基亚硝基胍, 阿的平测试的结果基本上和国外、国内结果相仿。McCann (1975)^[3] 曾用 TA₁₀₀ 使盐酸正定霉素获阳性反应。Horbold (1976)^[4] 曾报道,

用 TA₁₅₃₈ 在缺乏活化因子的条件下也能使环磷酸胺发生回复突变。甲基亚硝基胍一般在此条件下发生阳性回复突变,但本实验在存在活化因子的条件下,在高剂量时也可发生回复突变,是否和大剂量化学物质作用于活化因子有关?值得进一步研究。

近年,日本国立肿瘤研究所和东京大学医学科学所的学者们还发展了预培养法,进一步提高了 Ames 法的敏感性。我们发现甲基亚硝基胍和盐酸正定霉素用预培养法后提高了敏感性,可以在更低的浓度呈现更高的诱变活性。预培养法之所以能提高 Ames 法的敏感性,可以使化学物质在更低的浓度下发生回复突变,可能是化学物质和细菌在振荡培养下充分接触起作用有关。预培养法对稳定性好、诱变性弱的化学物质提供了有用的手段。日本 NIHS 等实验室已将预培养法列入 Ames 试验的常规测试程序,我们也用预培养法检测了数十种化学物质,获得满意结果。

在提高 Ames 法敏感性的工作中,近年还陆续发现了数株更敏感的测试菌株,计有 TA₉₇、TA₁₀₂ 和 TA₁₀₄,并建议用 TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ 及 TA₁₀₂ 作为新的 4 株标准测试菌株,应用于常规检测^[5]。

2. Ames 试验中几个值得注意的问题: 根

据实践,我们认为要获得 Ames 试验的稳定和可重复,主要取决于菌种的稳定和一致及一定量的活菌数,静止和振荡培养的结果显示:为了达到 10⁹/ml 的细菌浓度,振荡培养是十分必要的。Ames 菌株在生长过程中极易下沉,我们在振荡培养中采用 L 型增菌管,保证了充分振荡。用静止培养法进行试验,有可能使底层草地样背景铺不满,这样就可能导致假阳性结果。因此振荡培养对保证一定量活菌数,对 Ames 试验的正常进行是必要的。

带有一定遗传标记的组氨酸缺陷型沙门氏菌株和野生型鼠伤寒沙门氏菌不同,在 4℃ 条件下保存相当时期,不一定能保证它的不变。每次实验从普通斜面上挑取的不同菌落,不能保证它的一致性,试验可能有一定波动。为了保证这些变异菌株的稳定性和一致性,-80℃ 冻存看来是必要的。

参 考 文 献

- [1] Ames, BN. et al.: *Mutation Res*, 31: 347, 1975.
- [2] Yahagi, T. et al.: *Mutation Res* 48: 121, 1977.
- [3] McCann, J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)
- [4] Horbold, B. and Buselmaror, W.: *Mutation Res* 40: 73, 1976.
- [5] Matsushima, T. et al.: In Short-term test Systems for Detecting Carcinogens. New York, 1980.