全自动 Ames 试验仪准确性研究

文 / 宁波海关技术中心　刘燕妮　赵少浩　蒋清清
北京慧荣和科技有限公司　李朝文　杨富城　王瑛

摘要:使用鼠伤寒沙门氏菌开展基于人工操作和全自动仪器的 Ames 试验,为确立全自动 Ames 试验仪的试验奠定研究基础。5 种不同的鼠伤寒沙门氏菌 (TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535) 经鉴定和增菌后,分别使用全自动 Ames 试验仪和人工操作在有无 S9 代谢活化条件下对某化妆品开展平板渗入法 Ames 试验,并置于 37℃培养 48h 后进行菌落计数及分析。结果显示,无论是采用全自动 Ames 试验仪,还是采用人工操作进行 Ames 试验,菌株回复突变数均未有较大差距,说明全自动 Ames 试验仪与手动操作的 Ames 试验结果存在一致性,可替代人工操作开展 Ames 试验。

关键词:细菌回复突变试验　全自动 Ames 试验仪　结果一致性

细菌回复突变试验 (简称“Ames 试验”) 是一种以营养缺陷型的突变体菌株作为指示生物来检测基因突变的体外试验。近年来,由于人类疾病基因的研究快速发展,遗传毒性试验成为其必不可少的一项,Ames 试验由于方法操作简单、试验周期短且其有较好的灵敏度及特异性,已成为一种遗传毒性常规检测的初筛试验。但由于该试验操作流程较为繁琐,试验条件要求严格,存在实现全自动化程度难度大、仪器开发成本高等问题。目前,Ames 试验在大多数机构都是由人工操作完成的,随着 Ames 试验在各个领域研发和注册过程中进行毒理学评价时的广泛应用,全国各地的检验机构样品数量急剧增加,检测效率低是各相关机构面对日益增长的检测需求时亟待解决的问题,传统的人工操作方式已经成为提高检测效率的瓶颈。本研究采用北京慧荣和科技有限公司研发的全自动 Ames 试验仪替代传统繁琐、低效的人工操作,在实现提高试验精度和可靠性的前提下进行高通量试验检测,进一步缩短了试验周期,提高了试验精准度。本研究将同一样品分别在全自动 Ames 仪试验下与人工操作下完成所需的时间和试验得出的数据进行对比,用以说明仪器的检测效率和精确度。

一、材料与方法

(一) 材料

1.菌株

本研究使用的菌株为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型 (his$^-$) 标准测试菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535,购自美国 MOLTOX 公司,对其是否存在氨基酸及生物素合成缺陷、细胞壁脂多糖缺失 (rfa)、紫外线 (uvrA 或△uvrB) 修复缺陷、抗氨苄青霉素及抗四环素 (含 pKM101 或 pAQ1 质粒) 等生物学特性进行鉴定,鉴定结果如表 1 所示,鉴定结果符合要求后用于试验。

表 1:菌株鉴定结果

基因型	鉴定结果					备注
	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	
组氨酸缺陷	+	+	+	+	+	“+”表示需要组氨酸
脂多糖屏障缺损	+	+	+	+	+	“+”表示有抑菌带
R因子(抗氨苄青霉素)	+	+	+	+	−	“+”表示具有R因子
抗四环素	−	−	−	+	−	“+”表示有四环素抗性
uvrB修复缺损	+	+	+	−	+	“+”表示无修复能力

2.试剂与培养基

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide,DMSO) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司,敌克松 (Dexon) 购自德国 Dr. Enrenstorfer GmBH 公司,2－氨基芴 (2-AF)、环磷酰胺 (CP) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司,叠氮钠 (SA) 购自上海埃彼化学试剂有限公司,1,8－二羟基蒽醌 (1,8-DHQ) 购自上海麦克林生化科技有限公司。其他试剂包括营养肉汤 (CM0067 nutrient broth No.2) 购自 OXOID;琼脂粉 (agar powder)、氨苄青霉素、葡萄糖、组氨酸、生物素、NADP、G－6－P 等均购自 Sigma;大鼠肝 S_9 混合液购自 CHI Scientific,Inc。

3.主要仪器

全自动 Ames 试验仪购于北京慧荣和科技有限公

万方数据

司，生物安全柜购于 Thermo 公司，高压灭菌锅、生化培养箱购于 SANYO 公司，恒温水浴振荡器购于金坛友联仪器研究所，电子天平购于 TOLEDO 公司。

（二）试验方法

1.增菌培养

将保存的鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 菌株接种于营养肉汤培养基内，37℃ ± 2℃振荡（100 次 /min）培养 10h。各菌株培养物应每毫升不少于 1×10^9—2×10^9 CFU。

2.平板渗入法 Ames 试验人工操作

根据预试验表明，受试物浓度为原液时对该组细菌无杀菌作用，且易溶于水，故选择原液、1/2 原液、1/4 原液、1/8 原液作为受试物剂量组，同时设空白对照、溶剂对照、阳性诱变剂对照，剂量设置如表 2 所示。试验时，将含 0.5mmol/L 组氨酸－0.5mmol/L 生物素溶液的顶层琼脂培养基 2.0mL 分装于试管中，45℃水浴中保温，然后每管加入磷酸盐缓冲液 0.5mL 或者 S_9 混合液 0.5mL（需代谢活化时），试验菌株增菌液 0.1mL，受试物溶液0.1mL，充分混匀，迅速倾入底层琼脂平板上，转动平板，使之分布均匀。水平放置待冷凝固化后，倒置于 37℃培养箱里孵育 48h。每个剂量做 3 个平行，记数每皿回变菌落数。

表 2：Ames 试验剂量设置

样品剂量（mg/皿）				阳性诱变剂对照（μg/皿）					溶剂对照	溶剂对照
组 1	组 2	组 3	组 4	敌克松	叠氮钠	2-氨基芴	1,8-二羟基蒽醌	环磷酰胺	无菌纯水	DMSO
1/8 原液	1/4 原液	1/2 原液	原液	50.0	1.5	10.0	50.0	200.0	/	/

3.全自动 Ames 试验仪上机试验

采用全自动 Ames 试验仪对受试物进行 Ames 试验。试验前对仪器及仪器部分设备进行紫外灭菌或高压蒸汽灭菌处理（121℃，20min），以保障试验环境处于无菌状态。将底层琼脂平板、含 0.5mmol/L 组氨酸－0.5mmol/L 生物素溶液的顶层琼脂培养基、各浓度梯度样品、各阳性诱变剂及对照溶剂、磷酸盐缓冲液、S_9 混合液、各试验菌株等进行分装，并放置于仪器相应位置。按相应要求设置所需试验方案并保存。试验前对仪器进行复位，以确保仪器正常运行。复位完成后可运行已设置完成的试验方案，待试验全部完成且平板冷凝固化后将其取出，并倒置于 37℃培养箱里孵育 48h。每个剂量做 3 个平行，记数每皿回变菌落数。

4.菌落计数及结果判定

计数每皿中的回复菌落数量，每个浓度组分别求得均值，并以 $\bar{x}\pm s$ 表示。当试验组平均每皿中的回复菌落数大于或等于溶媒对照组数值 2 倍，且存在量效关系时判断结果为阳性，反之为阴性。

二、结论

对比不同操作模式下该样品各浓度组的回复突变数进行观察和记录，均未发现有细菌毒性和沉淀，且背景菌苔生长良好，自发回变数符合要求。表 3、表 4 结果显示，无论是人工操作还是上机进行 Ames 试验，各系列浓度的受试物在加或不加 S_9 时，上机试验各剂量组的回复突变数与人工操作下各剂量组的回复突变数相比无明显差异，数据真实可靠，且各剂量组各菌株回变菌落数均未超过自然回变菌落数的 2 倍，而阳性对照组超过自然回变菌落数的 2 倍以上，并且无剂量－效应关系。

三、讨论

在同等条件下，Ames 试验仪的效率高于人工操作的 3—5 倍，仅需一位试验人员即可完成一个或者多个样品的 Ames 试验。仪器自带的加热和保温装置，避免了在试验过程中出现顶层冷凝而导致试验中断的情况，且减少了人工误操作的可能性，本仪器属于生物样品仪器，一切操作尽可能需要在无菌条件下进行，所以对于环境洁净度要求很高。使用仪器的同时也极大地减少了人力的消耗，解放了劳动力，同时，仪器自动移液加样，减少了试验人员和菌液以及受试物的接触机会，保障人员安全。

万方数据

表 3：非 S_9 代谢活化条件下手动与上机条件下回复突变菌落计数 (n=3)

组别	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	手动	上机	手动	上机	手动	上机	手动	上机	手动	上机
1/8 原液	103±3.2	112±7.5	30±0.6	32±1.5	128±3.5	121±4.9	257±7.5	244±18.3	13±1.0	13±1.2
1/4 原液	106±7.5	107±1.0	32±1.5	29±1.0	115±5.6	137±2.0	269±3.6	241±12.5	11±1.5	10±1.0
1/2 原液	102±4.2	112±9.2	29±0.6	32±2.1	126±9.7	128±11.4	254±10.0	238±16.5	10±1.0	10±2.6
原液	103±8.0	98±2.6	30±0.6	30±1.0	131±6.8	120±5.5	247±14.3	260±13.2	12±1.5	12±0.6
自发回变	114±8.1	114±8.1	32±2.1	32±2.1	127±10.2	127±10.2	244±9.0	244±9.0	13±1.0	13±1.0
阴性对照（无菌水）	105±2.1	105±2.1	30±1.0	30±1.0	135±8.5	135±8.5	257±7.5	257±7.5	10±1.0	10±1.0
阴性对照（DMSO）	98±2.5	98±2.5	30±1.5	30±1.5	124±7.8	124±7.8	237±13.7	237±13.7	12±1.0	12±1.0
阳性对照	2777±132.3[a]	2777±132.3[a]	1235±169.4[a]	1235±169.4[a]	2799±137.2[b]	2799±137.2[b]	952±38.6[a]	952±38.6[a]	609±27.2[b]	609±27.2[b]

注:a 为敌克松,50μg/ 皿;b 为叠氮钠,1.5μg/ 皿。

表 4：S_9 代谢活化条件下手动与上机条件下回复突变菌落计数 (n=3)

组别	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	手动	上机	手动	上机	手动	上机	手动	上机	手动	上机
1/8 原液	102±7.0	109±8.7	32±1.5	30±1.5	139±3.1	126±9.7	256±9.0	255±8.7	11±1.5	12±1.5
1/4 原液	102±3.8	110±13.6	29±1.0	30±1.5	128±7.5	127±13.0	239±10.5	232±5.7	9±0.6	11±2.1
1/2 原液	112±6.0	106±4.0	30±1.0	31±2.0	128±6.0	121±4.0	251±17.0	250±9.0	12±1.5	12±1.5
原液	105±9.7	108±4.2	32±1.5	32±2.1	129±3.6	134±7.2	249±17.7	260±13.4	12±1.2	10±1.5
自发回变	117±3.1	117±3.1	31±3.2	31±3.2	126±6.0	126±6.0	257±9.1	257±9.1	11±1.0	11±1.0
阴性对照（无菌水）	102±3.6	102±3.6	29±1.5	29±1.5	128±6.0	128±6.0	246±14.1	246±14.1	13±1.5	13±1.5
阴性对照（DMSO）	107±7.0	107±7.0	31±1.2	31±1.2	126±11.6	126±11.6	253±15.0	253±15.0	12±2.5	12±2.5
阳性对照	1185±70.7[a]	1185±70.7[a]	2211±136.6[a]	2211±136.6[a]	1217±127.8[a]	1217±127.8[a]	1205±102.2[b]	1205±102.2[b]	512±57.7[c]	512±57.7[c]

注：a 为 2－氨基芴，10μg/ 皿;b 为 1,8－二羟基蒽醌，50μg/ 皿；c 为环磷酰胺，200μg/ 皿。

参考文献：

[1]李朝文,杨富成,温占波,等.遗传毒理细菌回复突变试验(AMES 试验)自动化仪器的研制[A].2019 全国呼吸毒理与卫生毒理学术研讨会论文集[C].2019 年.

[2]文海若,宋捷,鄂蕊,等.微孔板与标准平皿 Ames 试验比较研究[J].药物评价研究,2019(05).

[3]胡燕平,宋捷,李波.细菌回复突变试验背景数据的采集[J].中国新药杂志,2009(22).

[4]何冬梅,王建,严纪文,等.Ames 试验对特殊用途化妆品致突变性的研究[J].中国卫生检验杂志,2007(11).

基金项目：本文为国家质量基础的共性技术研究与应用，项目编号：2017YFF0211200。作者简介：刘燕妮(1997—)，女，本科；通讯作者：李朝文(1987—)，男，硕士。

万方数据