

一种用微生物诱变试验快速 鉴定化学致癌物的方法

张 桥 李雅观

(中山医学院卫生系) (广东微生物研究所)

目前环境保护工作需要大量化学物质的致癌性进行检查,若使用常规动物试验方法,需要大量人力物力,费时亦较长,一般需两年左右始得结果,这无疑远远落后于实际需要。近年,逐渐发展了一些快速、简易鉴定方法,微生物诱变试验(Ames法)属其中一种。对该法使用价值国外已有较肯定的结论,但国内使用尚少。本文拟根据有关文献资料结合我们使用这种方法的一些体会^[1],对该法作一介绍,供有关部门参考。

一、方法原理

Ames于七十年代早期提出用组氨酸营养缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)作为诱变试验用菌株。这种菌株在缺乏组氨酸的最低培养基中,由于不能合成本身所需组氨酸,故不能生长。但若受诱变物作用后,可产生回复突变(Reverse mutation),简称回变,即回复原来野生型菌株所具有的生物特性,在缺乏组氨酸的条件下仍可长成菌落。因此根据试验菌与受试物接触后出现回变菌落的情况,可判断该物质是否具有诱变性^[2-3]。按照体细胞突变是肿瘤形成基础的学说,并根据大量实验材料所提供的事实,一般认为:致癌物是诱变物,二者可能是同一现象的两个不同阶段^[6],因此可利用较易进行的诱变试验,初步推断致癌性是否存在。Ames法是属于筛选性质试验。

试验用菌共五株:TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₅₃₅、

TA₁₅₃₇、TA₁₅₃₈。其中TA₁₀₀、TA₁₅₃₅用于检查碱基置换型(Base Substitution)诱变物;TA₉₈、TA₁₅₃₇、TA₁₅₃₈用于检查移码型(Frameshift)诱变物。五株菌均属组氨酸营养缺陷型突变株。另外有两个附加突变:(1)在染色体上gel-bio-uvr B区出现缺失,失去切除修复系统,细菌的DNA受损后,无修复能力。(2)细菌细胞壁上有深粗糙型(rfa)突变,对大分子的透过性增加。这两种突变使鼠伤寒菌对诱变物作用的敏感程度增加。Ames于1974年将抗抗菌素的质体PKM101转移至TA₁₅₃₅与TA₁₅₃₈,分别获得含R因子的TA₁₀₀与TA₉₈对于回变作用,比原来菌株更为敏感。

近年,发现了不少化学物质需经代谢活化形成所谓活化型后,始显示其诱变性,因此,Ames法又加进一个代谢活化系统,即在试验时加入肝细胞微粒体酶,以便将受试物转化成活化型。

二、培养基制备

所用培养基有四种

(一)肉汤培养基(培养试验菌菌液用):牛肉浸羔5克;蛋白胨10克;氯化钠5克;蒸馏水1000毫升,pH调至7.2。

(二)肉汤琼脂培养基(用于菌种鉴定和斜面试管)

成份同上,再加入2%琼脂

(三)最低葡萄糖琼脂培养基(底层培养基)

葡萄糖	20 克
琼脂	15 克
Vogel-Bonner E 液	100 毫升
蒸馏水	900 毫升

Vogel-Bonner E 液, 葡萄糖与琼脂分别高压消毒后再行混合。所用琼脂需处理, 除去杂质。

Vogel-Bonner E 液成份是

硫酸镁* ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2 克
柠檬酸 [$\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$]	20 克
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	100 克
磷酸氢钠铵 ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	35 克

蒸馏水	加至 1000 毫升
-----	------------

* MgSO_4 需在其他盐溶解后加入, 该溶液 pH 为 7.0

(四) 上层琼脂: 琼脂 7 克, 氯化钠 5 克, 加蒸馏水至 1000 毫升, 上层琼脂加入微量组氨酸, 使细菌能分裂数次, 诱变作用会更易得到显示。每 100 毫升上层琼脂加 10 毫升 0.5mM 组氨酸—0.5mM 生物素液 (即每 100 毫升溶液内含组氨酸 7.76 毫克、生物素 12.2 毫克)。配好的上层琼脂以 2 毫升为一份, 分装在试管内, 高压消毒备用。配制上层的琼脂亦需处理、除去杂质。

三、菌液制备与菌种保存

将菌种接种于盛有 20 毫升肉汤培养基的 250 毫升三角烧瓶内。于 37℃ 振荡培养 14—16 小时, 菌液浓度为 $1-3 \times 10^8$ /毫升, 将菌液保存于冰箱内, 可用一周。菌种的长期保存, 可采用低温深冻保藏法, 即取 0.8 毫升菌液, 放入有玻璃旋盖的无菌小瓶 (大小为 2 毫升) 中, 加入 0.07 毫升二甲基亚砷 (DMSO), 用干冰迅速冰冻后, 放在 -80℃ 低温冰箱内保存。每一菌株做两份, 一份长期保存, 一份供日常使用, 需用时, 用灭菌小棒括下一块, 按上述方法接种。

四、试验菌的性状鉴定

对于新索取得的菌种和使用一段时间后的菌种, 应就其性状进行检查, 检查以下五项内容:

(一) 组氨酸缺陷型鉴定: 取灭菌平皿若干个分成两组, 每皿加入底层培养基 20 毫升。一组在底层培养基上加入 0.1 毫升无菌的 0.1M 组氨酸, 与 0.1 毫升 0.5mM 生物素, 均匀分布在底层培养基上, 将需鉴定的菌种划线接种, 在 37℃ 培养 24 小时, 在划线处应有菌生长。另一组平皿除不加组氨酸外, 其余处理同, 因平皿内无组氨酸, 在划线处应无菌生长。

(二) 深粗糙型鉴定: 五种试验用菌株均为深粗糙型变异株, 结晶紫的大分子可透过细胞壁, 并抑制该菌生长。取直径为 6 毫米的滤纸片, 高压消毒后, 每片滤纸滴加 10 微升 (1 毫克/毫升) 的结晶紫液; 或 2 毫克去氧胆酸钠液。取消毒平皿加入肉汤琼脂培养基 20 毫升, 待其凝固后, 取受试菌液 0.1 毫升, 加在 2 毫升已熔化 (45℃ 保温) 的上层琼脂内, 混合摇匀, 倒在底层培养基上, 然后在平皿中央放入一片上述滤纸片, 在 37℃ 培养 12 小时, 纸片周围应有直径 14 毫米的透明圈。

(三) UVrB 缺失性状检查: 五种试验用菌均有此性状。这些菌株因无切除修复能力, 故对低剂量紫外线作用很敏感。受检菌株划线接种在肉汤琼脂平板上。打开平皿; 用消毒黑纸覆盖一半, 用 15 W 紫外线灯在距离为 33 厘米处, 照射 6 秒 (有 R 因子者照射 8 秒), 于 37℃ 培养 12—24 小时, 受照射部分应无菌生长。

(四) 含 R 因子菌株鉴定: 含 R 因子的 TA_{98} 与 TA_{100} 对苯氨青霉素 (Ampicilline) 有抗药性。取 10 微升苯氨青霉素 (用 0.02N NaOH 配成 8 毫克/毫升溶液) 在肉汤琼脂平板中央划线, 待划线干后, 再取受检菌液作交

又穿过划线,于37℃培养12—24小时。有R因子者,在苯氨青霉素划线交叉处仍有菌生长。

(五)自然回变量的测定:各个菌株在缺组氨酸的培养基中37℃培养48小时后,每皿均有一定量自然回变菌落:TA₁₅₃₅:20;TA₁₅₃₇:7;TA₁₅₃₈:25;TA₉₈:40;TA₁₀₀:160;若自然回变数异常增高,可能是有杂菌污染。

五、受试物溶液配制

受试物溶于水者,用无菌蒸馏水配成所需浓度。不溶于水者可用一些有机溶剂,例如用DMSO(每皿加入量在0.5毫升以下)二甲基乙酰胺(Dimethyl-acetamide)(每皿25微升以下),二氧杂环己烷(P-Dioxane)、丙酮、酒精(每皿100微升以下),每皿在上述浓度范围内,不会影响细菌的生长,亦不致引起回变菌落过度增加。受试物应低温保存,具有高度活性受试物,应在用前新鲜配制。

六、激活系统制备

(一)肝细胞匀浆上清液(S-9)制备:(1)取体重在150—200克的雄性大鼠,用玉米油配制的聚氯联苯(PCB)溶液(200毫克/毫升),按500毫克/公斤体重剂量作一次腹腔内注射,以进行酶诱导。(2)五天后击头处死,处死前12小时禁食,饮水不限。(3)大鼠皮毛经3%碘酒与75%酒精消毒后,用无菌剪刀剪开腹腔,取出肝脏。以下步骤全部在低温无菌条件下进行。(4)放入盛有0.15M冷KCl的烧杯(预先称重)中,加入KCl呈约为每克湿肝1毫升,称取肝重。(5)按每克湿肝加入3毫升冷0.15M KCl。用消毒剪刀将肝剪碎。(6)将剪碎的肝组织连同KCl液倒入玻璃匀浆器内。在冰浴条件下,将肝组织做成匀浆。(7)将匀浆倾入经消毒的离心管内,以9000×g离心10分钟。其上清部分即为S-9。每毫升S-9所含的肝细胞微粒体酶相当于250毫克湿肝组织含量。(8)S-9

以2毫升为一份,分装到有盖玻璃管内,用干冰迅速冰冻,放入-80℃(或-40℃)内保存。(9)取样检查有无细菌污染,有污染者需用细菌滤器过滤除菌。

(二) S-9 混合液(S-9M) 配制

S-9 还需加入辅酶 II(NADP), 6-磷酸葡萄糖(G6P)以及一些盐溶液,使微粒体酶有必要的激活条件,每皿加入的S-9量,以50—100微升为宜。过多或过少均影响活化能力。S-9M 配制成份见表1。

表1 每毫升 S-9M 内各种组分的浓度及其加入量

组 分	分子量	配成浓度(M)	加入量(微升)	S-9M内的浓度(μM)
S-9			300	
MgCl ₂	203.04	0.4	20	8
KCl	74.56	1.56	20	33
G6P-Na	340.0	1.0	5	5
NADP	743.0	0.1	40	4
磷酸缓冲液*		0.25	400	100
蒸馏水			215	

* A液NaH₂PO₄(27.8克/毫升)19毫升, B液Na₂HPO₄(53.65毫克/升)81毫升,两液相加,加水至200毫升, pH:7.4

七、诱变性测定方法

测定方法有两种,一种是点试法用于定性检查,一种是平皿掺入法,用于定量检查,前者用于初步试验,得出定量试验所需的浓度范围,以及看其是否需要代谢活化系统。

(一) 点试法

取0.1毫升菌液加到2毫升45℃熔化的上层琼脂内,若受试物需代谢活化者,再加入0.33毫升S-9M(15×90毫米平皿),混匀后,迅速倒入盛有底层培养基平皿内(上述操作应在20秒内完成,时间过长会影响酶的活性),轻轻转动平皿,使上层琼脂均匀分布在底层培养基上。待上层琼脂凝固后,将浸有受试物的滤纸片或受试物的结晶颗粒,放置其上,于37℃培养48小时,若滤纸片周围有

密集回变菌落,则可认为该化合物有诱变活性。

(二) 平皿掺入法

向熔化的上层琼脂 (2 毫升)加入 0.1 毫升受试物,0.1 毫升菌液,需要时再加入 0.33 毫升 S-9M (平皿大小为 15×90 毫米),混合均匀后,倒在底层培养基上,在 37℃ 培养 48 小时,每种受试物需用数个平皿作平行试验,以不加受试物只加受试物溶剂作空白对照,并用已知的诱变剂作阳性对照。对一些对光线敏感的化合物,待上层琼脂凝固后,应立即

用黑纸盖上,再放入温箱培养。阳性诱变物的选择可参考表 2。

培养 48 小时后,计算试验皿与对照皿的回变菌落数。

八、结果表达与解释

受试物经点试法定为阳性者,应选择适当浓度进行平皿掺入试验,并以一范围较窄的浓度作剂量与反应曲线。若试验结果的回变菌落数比空白对照皿高出 2 倍以上,并按加入受试物量计算每毫微克分子 (nM) 的菌落数,达 0.2 个以上时,可定为阳性。

九、使用举例

我们用本法对农药叶飞散 (又名混灭威)、螟蛉畏与敌敌畏 (DDVP) 进行了致癌性初步查査。先用浸有 0.05、0.5、5 与 50 毫克/毫升上述物质的滤纸片进行点试,结果表明:除敌敌畏为阳性外,其余为阴性。再用平皿掺入法进行检查,每种受试物用五种菌株,受试物加入量分别为 50、500、2500 与 5000 微克/皿,并同时作加 S-9 与不加 S-9 两种处理,结果见表 3。

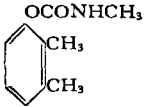
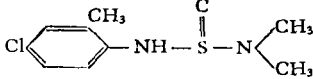
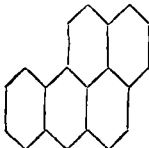
由表 3 结果可见,叶飞散与螟蛉畏均未

表 2 已知阳性诱变物对鼠伤寒沙门氏菌引起的回变

阳性诱变物	每皿加入量(微克)	S-9	TA				
			1535	100	1537	98	1538
甲基甲烷磺酸盐	2	—		+++			
4-硝基喹啉氧化物	10	—		+++		++	
亚硝基胍	2	—	+++	+++			
9-氨基吡啶*	10	—			++		
柔毛霉素	5	—				++	
2-氨基苄	10	+		+++		+++	+++
黄曲霉素B ₁	1	+		+++		+++	
3,4 苯并吡	5	+		+++		++	++

*溶于乙醇中,其余溶于 DMSO 中

表 3 几种农药诱变试验结果

受试物	结 构 式	回变菌落数最高的菌株	回 变 菌 落 数		
			个/微克	个/nM	诱变性
叶 飞 散		TA ₁₀₀	60/500	0.02	—
螟 蛉 畏		TA ₁₀₀	36/500	0.02	—
敌 敌 畏	(CH ₃ O) ₂ P(O)OCHCl ₂	TA ₁₀₀	3600/5000	1.60	+
3,4 苯并吡		TA ₁₀₀	3400/10	85.0	+++

见有诱变性,而敌敌畏则在高剂量组出现较多量回变菌落,可见它有诱变作用,并属碱基置换型诱变物与文献报告结果相符^[7]。阳性致癌物 3,4 苯并芘见有明显的诱变作用。

十、结 论

Ames 法是一种简易、快速,比较可靠的致癌物初筛方法,目前已受到广泛的重视与使用,当然,该法亦有局限性,例如有些已知致癌物,未能获得阳性结果,可能与活化系统使用不当有关。此法出现假阳性仍比较多,对此,应如何进一步判别,尚待作更进一步的研

究。Ames 正培育一些新的菌株,以图弥补现有方法的不足。

参 考 文 献

- [1] 中山医学院卫生系劳动卫生教研组等,广东微生物, 6,1,1977.
- [2] Ames, B. N. et al., Proc. Nat. Acad Sci USA 70: 2281, 1973.
- [3] Ames, B. N. et al., Ibid, 70:782, 1973.
- [4] Ames, B. N. et al., Mutation Res. 31:347, 1975.
- [5] 矢作多贵江:蛋白质核酸酵素 20: 1178, 1975.
- [6] Brusick, D. J., Clin. Toxicol. 10: 79, 1977.
- [7] Shiracu, Y. et al., Mutation Res. 40: 19, 1976.

(上接第 40 页)

在制作标准曲线的过程中,从对氯邻甲苯胺的标准溶液中吸取不同体积以配成一系列浓度不同的标准样品数个,并用 1N HCl 稀释至 2 毫升,分别进行碘化反应,用气相色谱仪进行测定。由测得的 4-氯-6-碘-邻甲苯胺的峰高与相应的对氯邻甲苯胺的量作图,制得标准曲线两者具有相应的线性关系。

在按上述提取方法和气相色谱测定条件,每一样品进样 5 微升时,杀虫脒测定值可从测得的峰高,由标准曲线求得对氯邻甲苯胺的量用下式进行计算:

杀虫脒测定值(微克)

$$= \frac{\text{对氯邻甲苯胺量(毫微克)}}{5(\text{微升})} \times 5 \times 10 \times 3 \times 1.65$$

(1.65 为杀虫脒与对氯邻甲苯胺之间的换算因子)

6. 方法回收率

取 100 克苹果浆(50 克未施药的苹果)加入 30 微克杀虫脒,以杀虫脒在苹果中残留量为 0.6ppm 计。按上述水解提取,碘化气谱测定条件等步骤进行测定,测得回收率为 90.4—108%,(见方法回收率表)。

方法回收率表

样品序号	加入杀虫脒的浓度(ppm)	杀虫脒的回收率%
7(3)	0.6	90.4
7(4)	0.6	97.5
8(3)	0.6	97.5
8(4)	0.6	104
5(3)	0.6	108
5(4)	0.6	103

五、讨 论

1. 此法是将杀虫脒及其代谢产物均水解成对氯邻甲苯胺后加以测定,并换算成杀虫脒。不能完全反映出杀虫脒及其代谢产物去甲基杀虫脒、N-甲酰基对氯邻甲苯胺,对氯邻甲苯胺的各个的残留量。但国际上(WHO/FAO)也是采用前面的计算方法。

2. 对氯邻甲苯胺直接碘化法,较之经重氮化后再进行碘化的方法,简便、灵敏度高、标准曲线的线性关系也较好。但碘化反应温度和时间的影响有待进一步试验。

参 考 资 料

- [1] Vos, G. et al., Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators, No. 7, 211—230 (1973).
- [2] 农药科学(日文), Vol. 1, No. 2 (1973).