



中华人民共和国国家标准

GB 15193.4—2014

食品安全国家标准 细菌回复突变试验

2014-12-24 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 15193.4—2003《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》。

本标准与 GB 15193.4—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 细菌回复突变试验”;
- 修改了范围;
- 增加了术语和定义;
- 修改了试验目的和原理;
- 修改了仪器;
- 修改了磷酸盐贮备液的配制方法;
- 修改了组氨酸-生物素溶液的配制方法;
- 修改了对 DMSO 的要求;
- 修改了辅酶-II 和葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液的配制要求;
- 修改了进行菌株基因型鉴定的条件;
- 修改了对增菌培养的要求;
- 修改了受试物的特殊处理;
- 修改了选择溶媒的要求;
- 修改了剂量设计的内容;
- 修改了试验菌株;
- 修改了试验方法中对观察结果所需时间的规定;
- 修改了对照组的设置;
- 增加了制备 S9 的方法、生物素缺陷型菌株的鉴定、结果判定的内容、试验报告的要求、试验的解释;
- 修改了附录。

食品安全国家标准

细菌回复突变试验

1 范围

细菌回复突变试验包括鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验和大肠杆菌细菌回复突变试验。本标准规定了鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验的基本技术要求,选择大肠杆菌进行细菌回复突变试验时应参阅有关文献。

本标准适用于评价受试物的致突变作用。

2 术语和定义

2.1 细菌回复突变试验

以营养缺陷型的突变体菌株为指示生物检测基因突变的体外试验。常用的菌株有组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌和色氨酸营养缺陷型的大肠杆菌。

2.2 碱基取代型基因突变

DNA 多核苷酸链上某个碱基为另一个碱基取代,引起 DNA 碱基序列异常。

2.3 移码型基因突变

在 DNA 碱基序列中插入或缺失了一个或几个(除了 3 和 3 的倍数)碱基,按三联密码连续阅读的规则,该部位以后的密码子组成全部改变,指导合成的多肽链也全部发生改变。

3 试验目的和原理

检测受试物对微生物(细菌)的基因突变作用,预测其遗传毒性和潜在的致癌作用。

细菌回复突变试验利用鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌来检测点突变,涉及 DNA 的一个或几个碱基对的置换、插入或缺失见附录 A。鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的试验菌株分别为组氨酸缺陷突变型和色氨酸缺陷突变型,在无组氨酸或色氨酸的培养基上不能生长,在有组氨酸或色氨酸的培养基上才能正常生长。致突变物存在时可以回复突变为原养型,在无组氨酸或色氨酸的培养基上也可以生长。故可根据菌落形成数量来衡量受试物是否为致突变物。

某些致突变物需要代谢活化后才能使上述细菌产生回复突变,受试物要同时在有和没有代谢活化系统的条件下进行试验。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

实验室常用设备、低温高速离心机、低温冰箱(—80℃)或液氮罐、生物安全柜、恒温培养箱、恒温水浴、灭菌设备、匀浆器等。

4.2 试剂

4.2.1 营养肉汤培养基

牛肉膏	2.5 g
胰蛋白胨	5.0 g
氯化钠	2.5 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.3 g

加蒸馏水至 500 mL,加热溶解,调 pH 至 7.4,分装后 0.103 MPa 灭菌 20 min,4 °C 保存备用,保存期不超过半年。

4.2.2 营养肉汤琼脂培养基

琼脂粉	1.5 g
-----	-------

加营养肉汤培养基至 100 mL,加热融化后调节 pH 为 7.4,0.103 MPa 灭菌 20 min。

4.2.3 底层培养基

4.2.3.1 配制方法

在 400 mL 灭菌的 1.5% 琼脂培养基(100 °C)中依次加入磷酸盐贮备液 8 mL,40% 葡萄糖溶液 20 mL,充分混匀,冷却至 80 °C 左右时按每平皿 25 mL(相对于 90 mm 平皿)制备平板,冷凝固化后倒置于 37 °C 培养箱中 24 h,备用。

4.2.3.2 磷酸盐贮备液(Vogel-Bonner minimal medium E, 50 倍)

磷酸氢钠铵($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	17.5 g
柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	10.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	50.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 g

加蒸馏水至 100 mL 溶解,0.103 MPa 灭菌 20 min。

注:待其他试剂完全溶解后再将硫酸镁缓慢放入其中继续溶解,否则容易析出沉淀。

4.2.3.3 40%葡萄糖溶液

葡萄糖 40.0 g 加蒸馏水至 100 mL,0.055 MPa 灭菌 20 min。

4.2.3.4 1.5%琼脂培养基

琼脂粉 6.0 g 加入 400 mL 锥形瓶,加蒸馏水至 400 mL,融化后,0.103 MPa 灭菌 20 min。

4.2.4 顶层培养基

加热融化顶层琼脂,每 100 mL 顶层琼脂中加 10 mL 组氨酸-生物素溶液(0.5 mmol/L)。混匀,分装在 4 个烧瓶中,0.103 MPa 灭菌 20 min。用时融化分装小试管,每管 2 mL,45 °C 水浴中保温。顶层琼脂和组氨酸-生物素溶液(0.5 mmol/L)配制如下。

4.2.4.1 顶层琼脂

琼脂粉 3.0 g,氯化钠 2.5 g 加蒸馏水至 500 mL,0.103 MPa 灭菌 20 min。

4.2.4.2 组氨酸-生物素溶液(0.5 mmol/L)(诱变试验用)

D-生物素(相对分子质量 244)30.5 mg 和 L-组氨酸(相对分子质量 155)19.4 mg 加蒸馏水至 250 mL, 0.103 MPa 灭菌 20 min。

4.2.5 特殊试剂及培养基

4.2.5.1 0.8%氨苄青霉素溶液(鉴定菌株用,无菌配制)

氨苄青霉素 40 mg 用氢氧化钠溶液(0.02 mol/L)稀释至 5 mL,保存 4 °C 冰箱备用。

4.2.5.2 0.1%结晶紫溶液(鉴定菌株用)

100 mg 结晶紫,溶于无菌水至 100 mL。

4.2.5.3 L-组氨酸溶液和 D-生物素溶液(0.5 mmol/L)(鉴定菌株用)

L-组氨酸 0.404 3 g 和 D-生物素 12.2 mg 分别溶于蒸馏水至 100 mL,0.103 MPa 灭菌 20 min,保存于 4 °C 冰箱备用。

4.2.5.4 0.8%四环素溶液(用于四环素抗性试验和氨苄青霉素-四环素平板)

40 mg 四环素用盐酸缓冲液(0.02 mol/L)稀释至 5 mL,保存于 4 °C 冰箱。

4.2.5.5 氨苄青霉素平板(用作 TA97、TA98、TA100 菌株的主平板)和氨苄青霉素-四环素平板(用作 TA102 菌株的主平板)

每 1 000 mL 由以下成分组成:

底层培养基	980 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g/100 mL)	10 mL
生物素(0.5 mmol/L)	6 mL
0.8%氨苄青霉素溶液	3.15 mL
0.8%四环素溶液	0.25 mL

四环素仅在使用对四环素有抗性的 TA102 时加入。各成分均已分别灭菌或无菌制备。

4.2.5.6 组氨酸-生物素平板(组氨酸需要试验用)

每 1 000 mL 中由以下成分组成:

底层培养基	984 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g/100 mL)	10 mL
生物素(0.5 mmol/L)	6 mL

各成分均已分别灭菌。

4.2.5.7 二甲亚砜(DMSO)

光谱纯,无菌。

4.2.6 阳性诱变剂的配制

根据所选择的诱变剂的种类和剂量用适当的溶媒配制阳性对照品(见附录 B、附录 C)。

注:培养基成分或试剂除特殊说明外至少应是化学纯,无诱变性。避免重复高温处理,选择适当保存温度和期限。

4.3 10%S9 混合液的制备

4.3.1 S9 辅助因子的配制

4.3.1.1 镁钾溶液

氯化镁 1.9 g 和氯化钾 6.15 g 加蒸馏水溶解至 100 mL。

4.3.1.2 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L)(pH7.4)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 28.4 g/L) 440 mL
 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 27.6 g/L) 60 mL
 调 pH 至 7.4, 0.103 MPa 灭菌 20 min 或滤菌。

4.3.1.3 辅酶-II(氧化型)溶液

无菌条件下称取辅酶-II, 用无菌蒸馏水溶解配制成溶液(0.025 mol/L), 现用现配。

4.3.1.4 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液

无菌条件下称取葡萄糖-6-磷酸钠盐, 用无菌蒸馏水溶解配制成溶液(0.05 mol/L), 现用现配。

4.3.2 大鼠肝 S9 组分的诱导和配制

选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠, 体重 150 g~200 g, 周龄约 5 周~6 周。将多氯联苯(Aroclor1254)溶于玉米油中, 浓度为 200 g/L, 按 500 mg/kg 体重无菌操作一次腹腔注射, 5 d 后处死动物, 处死前禁食 12 h。

也可采用苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导的方法进行制备, 经口灌胃给予大鼠苯巴比妥钠和 β -萘黄酮, 剂量均为 80 mg/kg, 连续 3 d, 禁食 16 h 后断头处死动物。其他操作同多氯联苯诱导。

处死动物后取出肝脏, 称重后用新鲜冰冷的氯化钾溶液(0.15 mol/L)连续冲洗肝脏数次, 以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加氯化钾溶液(0.1 mol/L)3 mL, 连同烧杯移入冰浴中, 用无菌剪刀剪碎肝脏, 在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min, 1 min~2 min)或组织匀浆器(低于 20 000 r/min, 1 min)中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将制成的肝匀浆在低温(0 °C~4 °C)高速离心机上以 9 000g 离心 10 min, 吸出上清液为 S9 组分, 分装于无菌冷冻管或安瓿中, 每安瓿 2 mL 左右, 用液氮或干冰速冻后置 80 °C 低温保存。

S9 组分制成后, 经无菌检查, 测定蛋白含量(Lowry 法), 每毫升蛋白含量不超过 40 mg 为宜, 并经间接致癌物(诱变剂)鉴定其生物活性合格后贮存于深低温或冰冻干燥, 保存期不超过 1 年。

4.3.3 10% S9 混合液的制备

10% S9 混合液一般由 S9 组分和辅助因子按 1:9 组成, 也可将浓度配制成 30%(不同受试物所需 S9 浓度不同), 临用时新鲜无菌配制, 或过滤除菌。10% S9 混合液 10 mL 配制如下:

磷酸盐缓冲液	6.0 mL
镁钾溶液	0.4 mL
葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液	1.0 mL
辅酶-II 溶液	1.6 mL
肝 S9 组分	1.0 mL

混匀, 置冰浴中待用。

用每平板 0.5 mL S9 混合液(含 20 μL ~50 μL S9)测定其对已知阳性致癌物(诱变剂)的生物活性, 确定最适用量。也可按一般用量, 即每平皿 0.5 mL S9 混合液。

5 菌株及其鉴定与保存

5.1 试验菌株

推荐采用下列的菌株组合:

- a) 鼠伤寒沙门氏菌 TA1535;
- b) 鼠伤寒沙门氏菌 TA97a 或 TA97 或 TA1537;
- c) 鼠伤寒沙门氏菌 TA98;
- d) 鼠伤寒沙门氏菌 TA100;
- e) 鼠伤寒沙门氏菌 TA102 或大肠杆菌 WP2uvrA 或大肠杆菌 WP2uvrA(PKM101)。

5.2 菌株的鉴定

5.2.1 总则

菌株特性应与回复突变试验标准相符。菌株的鉴定包括:基因型鉴定、自发回变数鉴定和对阳性致突变物敏感性的鉴定。

每3个月进行一次菌株鉴定,遇到下列情况也应进行菌株鉴定:

- a) 在收到培养菌株后;
- b) 当制备一套新的冷冻保存或冰冻干燥菌株时;
- c) 重新挑选菌株时;
- d) 使用主平板传代时。

5.2.2 鉴定方法

5.2.2.1 增菌培养

在5 mL 营养肉汤培养基中用接种环接种贮存菌培养物,37 °C振荡(100次/min)培养10 h或静置培养16 h,使活菌数不少于 1×10^9 /mL~ 2×10^9 /mL。

5.2.2.2 组氨酸缺陷型(his)的鉴定

5.2.2.2.1 底层培养皿的制备

加热融化底层培养基两瓶。一瓶不加组氨酸,每100 mL底层培养基中加0.5 mmol D-生物素0.6 mL;另一瓶加组氨酸,每100 mL底层培养基中加L-组氨酸1 mL和0.5 mmol D-生物素0.6 mL。冷却至50 °C左右,每种底层培养基各倒两个平板。

5.2.2.2.2 接种

取有组氨酸和无组氨酸培养基平板各一个,按菌株号顺序各取一接种环的菌液划直线于培养基表面,37 °C培养48 h。

5.2.2.2.3 结果判定

菌株在有组氨酸培养基平板表面各长出一条菌膜,在无组氨酸培养基平板上除自发回变菌落外无菌膜,说明受试菌株确为组氨酸缺陷型。

5.2.2.3 脂多糖屏障缺陷(rfa)的鉴定

5.2.2.3.1 接种

加热融化营养肉汤琼脂培养基。取菌液0.1 mL移入平板,迅速将营养肉汤琼脂培养基(冷却至50 °C左右)适量倒入平板,混匀,平放凝固。将无菌滤纸片一片放入已凝固的培养基平板中央,用移液器在滤纸片上滴加0.1%结晶紫溶液10 μL,37 °C培养24 h,每个菌株做一个平板。

5.2.2.3.2 结果判定

阳性者在纸片周围出现一个透明的抑制带,说明存在 *rfa* 突变。这种变化允许某些大分子物质进入细菌体内并抑制其生长。

5.2.2.4 R 因子(抗氨苄青霉素)的鉴定

5.2.2.4.1 接种

加热融化营养肉汤琼脂培养基,冷却到 50 °C 左右,适量倒入平板中,平放凝固,用移液器吸 0.8% 的氨苄青霉素 10 μ L,在凝固的培养基表面沿中线涂成一条带,待氨苄青霉素溶液干后,用接种环取各菌株菌液与氨苄青霉素带相交叉划线接种,并且接种一个不具有 R 因子的菌株作氨苄青霉素抗性的对照,37 °C 培养 24 h,一个平板可同时鉴定几个菌株。

5.2.2.4.2 结果判定

菌株在氨苄青霉素带的周围依然生长不受抑制,即有抗氨苄青霉素效应,证明它们都带有 R 因子。

5.2.2.5 四环素抗性的鉴定

5.2.2.5.1 接种

用移液器各吸取 5 μ L~10 μ L 0.8% 的四环素溶液和 0.8% 的氨苄青霉素溶液,在营养肉汤琼脂培养基平板表面沿中线涂成一条带,待四环素和氨苄青霉素溶液干后,用接种环取各菌株菌液与四环素和氨苄青霉素带相交叉划线接种 TA102 和一种有 R 因子的菌株(作四环素抗性的对照),37 °C 培养 24 h。

5.2.2.5.2 结果判定

TA102 菌株生长不受抑制,对照菌株有一段生长抑制区,表明 TA102 菌株有抗四环素效应。

5.2.2.6 *uvrB* 修复缺陷型的鉴定

5.2.2.6.1 接种

在营养肉汤琼脂培养基平板表面用接种环划线接种需要的菌株。接种后的平板一半用墨纸覆盖,在距 15 W 紫外线灭菌灯 33 cm 处照射 8 s,37 °C 培养 24 h。

5.2.2.6.2 结果判定

对紫外线敏感的三个菌株(TA97、TA98、TA100)仅在没有照射过的一半生长,具有野生型切除修复酶的菌株 TA102 仍能生长。

5.2.2.7 生物素缺陷型(*bio*)的鉴定

5.2.2.7.1 底层培养皿的制备

加热融化底层培养基两瓶。一瓶加生物素,每 100 mL 底层培养基中加 0.5 mmol D-生物素 0.6 mL 和 L-组氨酸 1 mL;另一瓶不加生物素,每 100 mL 底层培养基中加 L-组氨酸 1 mL,冷却至 50 °C 左右,每种底层培养基各倒两个平板。

5.2.2.7.2 接种

取有生物素和无生物素培养基平板各一个,按菌株号顺序各取一接种环的菌液划直线于培养基表

面,37℃培养48 h。

5.2.2.7.3 结果判定

菌株在有生物素培养基平板表面各长出一条菌膜,在无生物素培养基平板上除自发回变菌落外无菌膜,说明受试菌株确为生物素缺陷型。

5.2.2.8 自发回变率的测定

5.2.2.8.1 测定方法

准备底层培养基平板8个。融化顶层培养基8管,每管2 mL,在45℃水浴中保温。在每管顶层培养基中,分别加入待鉴定的测试菌株的菌液0.1 mL,一式两份,轻轻摇匀,迅速将此试管内容物倒入已固化的底层培养基平板中,转动平板,使顶层培养基均匀分布,平放固化,37℃培养48 h,计数菌落数。

5.2.2.8.2 结果判定

每一株的自发回变率应落在表A.3所列的正常范围内。

5.3 菌株的保存

鉴定合格的菌株应保存在深低温(如-80℃),或加入9%光谱级DMSO作为冷冻保护剂保存在液氮条件下(-196℃)。无上述条件者可冰冻干燥制成干粉,4℃保存。除液氮条件外,保存期一般不超过2年。主平板贮存于4℃,超过2个月后应丢弃(TA102除外,保存2周后丢弃)。

6 试验设计及受试物的处理

6.1 溶媒

溶媒应不与受试物发生反应,对所选菌株和S9没有毒性,没有诱变性。首选蒸馏水,对于不溶于水的受试物可选择其他溶媒,首选DMSO(每平板最高添加量不超过0.1 mL)。也可选择其他溶媒。

6.2 剂量设计

决定受试物最高剂量的原则是受试物对试验菌株的毒性和受试物的溶解度。进行预试验有助于了解受试物对菌株的毒性和受试物的溶解度。对于无细菌毒性的可溶性受试物推荐的最高剂量是5 mg/皿或5 μL/皿;对于溶解度差的受试物,可以采用悬浊液,但溶液浑浊的程度(沉淀的多少)不能影响菌落计数。由于溶解度或者毒性的限制最大剂量达不到5 mg/皿或5 μL/皿时,最高剂量应为出现沉淀或细菌毒性的剂量。评价含有潜在致突变杂质的受试物时,试验剂量可以高于5 mg/皿或5 μL/皿。对于需要前处理的受试物(如液体饮料、袋泡茶、口服液和辅料含量较大的样品等),其剂量设计应以处理后的样品计。

每种受试物在允许的最高剂量下设4个剂量组,包括加和不加S9两种情况。按等比组距的原则设定剂量间隔,推荐采用 $\sqrt{10}$ 倍组距。每个剂量应作3个平板。

一般受试物的最低剂量不低于0.2 μg/皿。

受试物应无菌,必要时以适当的方法灭菌或除菌。

6.3 对照组的设置

试验应同时设阳性对照组、溶媒对照组和未处理对照组,包括加和不加S9种情况。

阳性对照物要根据所采用的菌株进行选择,并选择合适的剂量以保证每次试验的有效性,可参考附

录 B、附录 C 或其他资料。

溶媒对照组的处理方法除不加入受试物外与处理组相同。

当阳性致突变物采用 DMSO 溶解,而受试物不用 DMSO 溶解时,应同时做 DMSO 溶媒对照。

6.4 含组氨酸受试物

对已知和经证实含有组氨酸并可能影响试验结果的受试物必要时进行预处理(如经 XAD-Ⅱ 树脂柱过滤)。

7 试验方法

7.1 总则

常用的试验方法有平板掺入法、预培养平板掺入法和点试法等。

7.2 平板掺入法

7.2.1 将主平板或冷冻保存的菌株培养物接种于营养肉汤培养基内,37℃振荡(100次/min)培养 10 h 或静置培养 16 h,使活菌数不少于 1×10^9 /mL~ 2×10^9 /mL。

7.2.2 底层培养基平板,每个剂量加 S9 和不加 S9 均做 3 个平板。

7.2.3 融化顶层培养基分装于无菌带帽小试管(试管数与平板数相同),每管 2 mL,在 45℃水浴中保温。

7.2.4 在保温的顶层培养基(试管)中依次加入测试菌株新鲜增菌液 0.1 mL,混匀;试验组加受试物 0.05 mL~0.2 mL(一般加入 0.1 mL,需活化时另加 10% S9 混合液 0.5 mL),再混匀,迅速倾入铺好底层培养基的平板上,转动平板使顶层培养基均匀分布在底层培养基上,平放固化;37℃培养 48 h 观察结果,必要时延长至 72 h 观察结果。

7.2.5 阳性对照组加入同体积标准诱变剂;溶媒对照组只加入同体积的溶媒;未处理对照组只在培养基上加菌液;其他方法同试验组。

7.3 预培养平板掺入法

预培养对于某些受试物可取得较好效果。因此可根据情况确定是否进行预培养。在加入顶层培养基前,先进行以下预培养步骤:

- a) 将受试物(需活化时另加 10% S9 混合液 0.5 mL)和菌液,在 37℃中培养 20 min,或在 30℃中培养 30 min;
- b) 再加入 2 mL 顶层琼脂;
其他同 7.2。

7.4 点试法

7.4.1 按 7.2.1 操作。

7.4.2 按 7.2.2 操作。

7.4.3 按 7.2.3 操作。

7.4.4 在水浴保温的顶层培养基中依次加入测试增菌液 0.1 mL(需活化时另加 10% S9 混合液 0.5 mL),混匀,迅速倾入底层培养基上,转动平板,使顶层培养基在底层分布均匀。平放固化后取无菌滤纸片(直径约为 6 mm),小心放在已固化的顶层培养基的适当位置上,用移液器取适量受试物(如 10 μ L),点在纸片上,或将少量固体受试物结晶加到纸片或琼脂表面;37℃培养 48 h 观察结果。

7.4.5 另作阳性对照组和溶媒对照组,分别在滤纸片上加入同体积标准诱变剂、溶媒,未处理对照组滤

纸片上不加物质,其他步骤同上。

8 数据处理与结果评价

8.1 回变菌落计数

直接计数培养基上的回变菌落数,计算各菌株各剂量 3 个平板回变菌落数的均数和标准差。

8.2 掺入法结果评价

在背景生长良好的条件下,测试菌株 TA1535、TA1537、TA98 和大肠杆菌的回变菌落数等于或大于未处理对照组的 2 倍,其他测试菌株的回变菌落数等于或大于未处理对照组的 2 倍,并具有以下 a)、b)两种情况之一的可判定为阳性结果:

- a) 有剂量-反应关系;
- b) 某一测试点有可重复的阳性结果。

8.3 点试法结果评价

如在受试物点样纸片周围长出较多密集的回变菌落,与未处理对照相比有明显区别者,可初步判定该受试物诱变试验阳性,但应该用掺入法试验来验证。

8.4 验证

明显的阳性结果不需要进行验证;可疑的结果要改用其他的方法进行验证;阴性结果需要验证(即重复一次),应改变试验的条件,如剂量间距(改为 5 倍间距)等。

8.5 对照组结果评价

阳性结果表明受试物对试验菌株的基因组诱发了点突变。阴性结果表明,在该试验条件下受试物对测试菌株不诱发基因突变。

9 报告

9.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。

9.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

9.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。

9.4 试验摘要。

9.5 受试物:名称、鉴定资料、CAS 编号(如已知)、纯度、与本试验有关的受试物的物理和化学性质及稳定性等。

9.6 溶媒:溶媒的选择依据,受试物在溶媒中的溶解性和稳定性。

9.7 菌株:来源、名称、浓度(细菌个数/皿)及菌株特性(包括菌株鉴定的时间和结果)。

9.8 试验条件:剂量、代谢活化系统、标准诱变剂、操作步骤等。

9.9 试验结果:受试物对菌株的毒性、背景菌苔生长情况、平板上是否有沉淀、每个平板的回变菌落数、各剂量各菌株加和不加 S9 每皿回变菌落数的均数和标准差、是否具有剂量-反应关系、统计结果,同时进行的溶媒对照和阳性对照的均数和标准差、以及溶媒对照和阳性对照的历史范围。

9.10 结论:本试验条件下受试物是否具有致突变作用。

10 试验的解释

本试验采用的是原核细胞,与哺乳动物细胞在摄取、代谢、染色体结构和 DNA 修复等方面都有所不同。体外试验一般需要外源性代谢活化,但体外代谢活化系统不能完全模拟哺乳动物体内代谢条件,因此,本试验结果不能直接外推到哺乳动物。

本试验通常用于遗传毒性的初步筛选,并特别适用于诱发点突变的筛选。已有的数据库证明在本试验为阳性结果的很多化学物在其他试验也显示致突变活性。也有一些致突变物在本试验不能检测,这可能是由于检测终点的特殊性质、代谢活化的差别,或生物利用度的差别。

本试验不适用于某些类别的化学物,如强杀菌剂和特异性干扰哺乳动物细胞复制系统的化学品。对这些受试样品可使用哺乳动物细胞基因突变试验。

对于各菌株的自发回变范围,各实验室在参考其他实验室数据的基础上应建立自己的历史对照数据库,形成适合本实验室条件的实用范围。

附录 A

试验菌株的突变基因、检测类型、生物学特性以及自发回变数

试验菌株的突变基因、检测类型、生物学特性以及自发回变数见表 A.1~表 A.3。

表 A.1 试验菌株的突变基因和检测类型

菌株	突变部位	突变类型	检测类型
TA97	hisD6610	CCC 区域+4	移码突变
TA98	hisD3052	CG 区域-1	移码突变
TA1535	hisG46	AT-GC	碱基置换,部分移码突变
TA1537	hisC3076	C...C 区域+1	移码突变
TA100	hisG46	AT-GC	碱基置换,部分移码突变
TA102(pAQ1)	hisG428	GC-AT	碱基置换,部分移码突变
WP2uvrA	try	—	碱基置换
WP2uvrA(pKM101)	try	—	碱基置换

表 A.2 试验菌株生物学特性鉴定标准

菌株	色氨酸缺陷	组氨酸缺陷 (his)	脂多糖屏障缺陷 (rfa)	R 因子 (抗氨基青霉素)	抗四环素	uvrB 修复 缺陷
TA97		+	+	+	-	+
TA97a		+	+	+	-	+
TA98		+	+	+	-	+
TA100		+	+	+	-	+
TA102		+	+	+	+	-
TA1535		+	+	-	-	+
TA1537		+	+	-	-	+
WP2uvrA	+			-	-	+
WP2uvrA (pKM101)	+			+	-	+

注：+表示阳性；-表示阴性；空格表示不需要进行此项鉴定。

表 A.3 试验菌株自发回变菌落数

菌株	Ames 实验室	Bridges 实验室	Errol & Zeiger 实验室	
	不加 S9	不加 S9	不加 S9	加 S9
TA97	90~180	—	100~200	75~200
TA97a	90~180	—	100~200	75~200
TA98	30~50	—	20~50	20~50
TA100	120~200	—	75~200	75~200
TA102	240~320	—	200~400	100~300
TA1535	10~35	—	5~20	5~20
TA1537	3~15	—	5~20	5~20
WP2uvrA	—	7~23	—	—
WP2uvrA(pKM101)	—	27~69	—	—

附录 B

标准诊断性诱变剂

B.1 标准诊断性诱变剂见表 B.1。

表 B.1 推荐用于掺入平板法和点试法的标准诱变剂

方法	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
平板掺入法	不加	敌克松	敌克松	叠氮钠	敌克松
	加	2-氨基苄	2-氨基苄	2-氨基苄	1,8-二羟基萘
点试法	不加	敌克松	敌克松	叠氮钠	敌克松
	加	2-氨基苄	2-氨基苄	2-氨基苄	1,8-二羟基萘

B.2 诊断性诱变剂测试结果见表 B.2 和表 B.3。

表 B.2 诊断性诱变剂在平板掺入中的测试结果

诱变剂	剂量/($\mu\text{g}/\text{皿}$)	S9	每皿回变菌落数			
			TA97a	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	6.0	—	124	3 123	47	592
叠氮钠	1.5	—	76	3	3 000	186
ICR-191	1.0	—	1 640	63	185	0
链黑霉素	0.25	—	inh ^a	inh	inh	2 230
丝裂霉素	0.5	—	inh	inh	inh	inh
2,4,7-三硝基苄铜	0.2	—	8 377	8 244	400	16
4-硝基-磷-苯撑二胺	20.0	—	2 160	1 599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	—	528	292	4 220	287
甲基磺酸甲酯	1.0(μL)	—	174	23	2 730	6 586
敌克松	50.0	—	2 688	1 198	183	895
2-氨基苄(2-AF)	10.0	+	1 742	6 194	3 026	261
苯并[a]芘	1.0	+	337	143	936	255

注：所列数值代表组氨酸回变菌落数值，取自剂量反应的线性部分，对照值已扣除，用 PCB 诱导的大鼠肝 S9 (20 $\mu\text{L}/\text{皿}$) 活化 2-AF、苯并[a]芘；
inh：指链黑霉素在无毒范围(小于 0.25 μg)内没有检出诱变性，每 0.005 μg 在 TA100 引起的回变菌落数小于 70；
丝裂霉素对 uvrB 菌株是致死的。

表 B.3 诊断性诱变剂在点试法中的测试结果

诱变剂	剂量	S9	每皿回变菌落数			
			TA97a	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	5.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	—	+	—	++
叠氮钠	1.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	±	—	++++	—
ICR-191	1.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	++++	+	++	+
丝裂霉素	2.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	inh	inh	inh	+++
2,4,7-三硝基苄铜	0.1 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	++	++++	++	++
4-硝基-磷-苯撑二胺	20.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	++	+++	+	+
4-硝基喹啉-N-氧化物	10.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	±	++	++++	+++
甲基磺酸甲酯	2.0 $\mu\text{L}/\text{皿}$	—	+	—	+++	++++
敌克松	50.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—	++++	+++	++	+++
2-氨基苄(2-AF)	20.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	+	++	++++	+++	+
黄曲霉毒素 B ₁	1.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	+		++	++	
甲基硝基亚硝基胍	2.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$	—		—	+++	

注：每皿回变菌落数(扣除自发回变)的符号—： <20 ；+： $20\sim 100$ ；++： $100\sim 200$ ；+++： $200\sim 500$ ；++++： >500 ；
柔毛霉素和叠氮钠溶解在水中，其他所有化合物溶解在 DMSO 中；
用 PCB 诱导的大鼠 S9(20 $\mu\text{g}/\text{皿}$)活化 2-AF；
柔毛霉素在点试中产生最低效应，应作平板掺入试验；
inh：因诱变剂毒性引起的生长抑制。

附录 C

OECD 和 USEPA 推荐的阳性诱变剂

C.1 使用代谢活化系统时所用阳性诱变剂

C.1.1 9,10-二甲基蒽(9,10-dimethylanthracene [CAS 781-43-1])。

C.1.2 7,12-二甲基苯蒽(7,12-dimethylbenzanthracene [CAS 57-97-6])。

C.1.3 刚果红(congo Red [CAS 573-58-0], for the reductive metabolic activation method)。

C.1.4 苯并[*a*]芘(benzo(a)pyrene [CAS 50-32-8])。

C.1.5 环磷酰胺(cyclophosphamide (monohydrate) [CAS no. 50-18-0 (CAS. 6055-19-2)])。

C.1.6 2-氨基蒽(2-AA, 2-Aminoanthracene [CAS 613-13-8])。

C.1.7 2-氨基蒽不能单独用作 S9 混合物有效的指示剂。如果使用 2-氨基蒽,每批 S9 还要用其他需要微粒体酶代谢活化的诱变剂(如苯并[*a*]芘、7,12-二甲基苯蒽)来对其特性进行测试。

C.2 不使用代谢活化系统时所用阳性诱变剂

不使用代谢活化系统时所用阳性诱变剂见表 C.1。

表 C.1 不使用代谢活化系统时所用阳性诱变剂

阳性诱变剂	菌株
叠氮钠(sodium azide [CAS 26628-22-8])	TA1535 和 TA100
2-硝基芴(2-nitrofluorene [CAS 607-57-8])	TA98
9-氨基吖啶(9-aminoacridine [CAS 90-45-9]) 或 ICR191 [CAS 17070-45-0]	TA1537、TA97 和 TA97a
过氧基异丙苯(cumene hydroperoxide [CAS 80-15-9])	TA102
丝裂霉素 C(mitomycin C [CAS 50-07-7])	WP2 uvrA 和 TA102
<i>N</i> -乙基- <i>N</i> -硝基- <i>N</i> -亚硝基胍 (<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine [CAS 70-25-7])或 4-硝基喹啉 1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide [CAS 56-57-5])	WP2, WP2 uvrA 和 WP2 uvrA(pKM101)
呋喃糖酰胺(furylfuramide (AF-2) [CAS 3688-53-7])	含有质粒的菌株