



中华人民共和国国家标准

GB 15193.4—2003
代替 GB 15193.4—1994

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物 微粒体酶试验

Salmonella typhimurium/mammals microsomal
enzyme test (Ames test)

2003-09-24 发布

2004-05-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准全文强制。

本标准代替 GB 15193.4—1994《鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验》。

本标准与 GB 15193.4—1994 相比主要修改如下：

- a) 在“范围”中增加了受试物的具体内容：食品生产、加工、保藏、运输和销售过程中所涉及的可能对健康造成危害的化学、生物和物理因素，检验对象包括食品添加剂（含营养强化剂）、食品新资源及其成分、新资源食品、辐照食品、食品容器与包装材料、食品工具、设备、洗涤剂、消毒剂、农药残留、兽药残留、食品工业用微生物等；增加本标准的不适用范围；
- b) 增加对照组的设置；
- c) 在“培养基制备及试剂的配制”中：将
 - 1.5%琼脂培养基的配制方法中将“加蒸馏水 400 mL”改为“加蒸馏水至 400 mL”；
 - 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液（诱变试验用）配制方法中的 L-组氨酸加入量由“17.4 mg”改为“19.5 mg”；
 - 顶层培养基制备方法中每 100 mL 顶层琼脂中“加 10 mL 10.5 mol/L”改为“加 10 mL 0.5 mmol/L”；
 - 将 L-组氨酸溶液和 0.5 mol/L D-生物素溶液（鉴定菌株用）中的“0.5 mol/L”改为“0.5 mmol/L”，其后面内容中的“0.5 mol/L 生物素”的浓度均改为“0.5 mmol/L”。
- d) 将原标准“7 受试物剂量、溶剂和特殊处理”标题改为“试验设计及受试物的特殊处理”，并增加对照组设置内容；
- e) 删除“Ames 试验报告”的内容。

本标准的附录 A 为规范性附录。

自本标准实施之日起，GB 15193.4—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、北京医科大学、浙江医科大学。

本标准主要起草人：戴寅、丁兰、金钟初、郭世萍。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验

1 范围

本标准规定了 Ames 试验的基本技术要求。

本标准适用于评价食品生产、加工、保藏、运输和销售过程中所涉及的可能对健康造成危害的化学、生物和物理因素的致突变作用,检验对象包括食品添加剂(含营养强化剂)、食品新资源及其成分、新资源食品、辐照食品、食品容器与包装材料、食品工具、设备、洗涤剂、消毒剂、农药残留、兽药残留、食品工业用微生物等。

本标准不适用于具有杀菌和/或抑菌作用的受试物,不适用于具有妨碍哺乳动物细胞复制系统的受试物。

2 原理

鼠伤寒沙门氏菌的突变型(即组氨酸缺陷型)菌株在无组氨酸的培养基上不能生长,在有组氨酸的培养基上可以正常生长。但如在没有组氨酸的培养基中有致突变物存在时,则沙门氏菌突变型可回复突变为野生型(表现型),因而在无组氨酸培养基上也能生长,故可根据菌落形成数量,检查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沙门氏菌突变型产生回复突变,代谢活化系统可以用多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆(S-9)制备的 S-9 混合液。

3 仪器

3.1 实验室常用设备。

3.2 低温高速离心机,低温冰箱(-80°C)或液氮罐,洁净工作台,恒温培养箱,恒温水浴,蒸气压力锅,匀浆器等。

4 试剂

培养基成分或试剂除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,如肉汤保存于 4°C 不超过六个月,其他详见下述各培养基及溶液说明。

4.1 营养肉汤培养基

牛肉膏	2.5 g
胰胨(或混合蛋白胨)	5.0 g
氯化钠	2.5 g
磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.3 g
蒸馏水	500 mL

加热溶解,调 pH 至 7.4,分装后 0.103 MPa 20 min 灭菌,普通冰箱保存备用,保存期不超过半年。

4.2 营养肉汤琼脂培养基

用作

a) 基因型鉴定的结晶紫敏感试验,抗氨苄青霉素和四环素试验,紫外线敏感性试验。

b) 细菌活力鉴定。

琼脂粉	1.5 g
营养肉汤培养基	100 mL

加热融化后调 pH 为 7.4, 0.103 MPa 20 min 灭菌。

4.3 底层培养基所需试剂及配制

4.3.1 磷酸盐贮备液

磷酸氢钠铵($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	17.5 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	50.0 g
硫酸镁 ¹⁾ ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0 g

加蒸馏水至 100 mL, 0.103 MPa 20 min 灭菌。

4.3.2 40%葡萄糖溶液

葡萄糖	40.0 g
-----	--------

加蒸馏水至 100 mL, 0.055 MPa 20 min 灭菌。

4.3.3 1.5%琼脂培养基

琼脂粉	6.0 g
加蒸馏水至	400 mL

融化后 0.103 MPa 20 min 灭菌。

4.3.4 底层培养基(无菌操作)

趁热(80℃), 在灭菌琼脂培养基中(400 mL)依次加入:

磷酸盐贮备液	8 mL
40%葡萄糖溶液	20 mL

充分混匀, 待凉至 80℃左右时倒平皿, 每皿(ϕ 90 mm)25 mL, 37℃培养过夜以除去水分及检查有无污染。

4.4 顶层培养基的成分及制备

4.4.1 顶层琼脂

琼脂粉	3.0 g
氯化钠	2.5 g
加蒸馏水至	500 mL

4.4.2 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液(诱变试验用)

D-生物素(分子量 244)	30.5 mg
L-组氨酸(分子量 155)	19.5 mg

加蒸馏水至 250 mL。

4.4.3 顶层培养基制备

加热融化顶层琼脂, 每 100 mL 顶层琼脂中加 10 mL 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液。混匀, 分装在 100 mL 三角瓶中, 0.103 MPa 20 min 灭菌。用时融化分装小试管, 每管 2 mL, 在 45℃水浴中保温。

4.5 特殊试剂和培养基的配制

4.5.1 0.8%氨苄青霉素溶液(鉴定菌株用, 无菌配制): 称取氨苄青霉素 40 mg, 用 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至 5 mL, 保存于冰箱。

4.5.2 0.1%结晶紫溶液(鉴定菌株用): 称取 100 mg 结晶紫, 溶于 100 mL 无菌水。

4.5.3 L-组氨酸溶液和 0.5 mmol/L D-生物素溶液(鉴定菌株用): 称取 L-组氨酸 0.404 3 g 和 D-生物素 12.2 mg, 分别溶于 100 mL 蒸馏水, 0.103 MPa 20 min 灭菌, 保存于 4℃冰箱。

4.5.4 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): 称取 40 mg 四环素, 用 0.02 mol/L 盐酸缓冲液稀释至 5 mL, 保存于 4℃冰箱。

1) 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, 否则易析出沉淀。

4.5.5 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 中由以下成分组成:

底层培养基	910 mL
磷酸盐储备液	20 mL
40% 葡萄糖溶液	50 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g/100 mL)	10 mL
0.5 mmol/L 生物素	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。以上成分均已分别灭菌或无菌制备。

4.5.6 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	914 mL
磷酸盐储备液	20 mL
40% 葡萄糖溶液	50 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g/100 mL)	10 mL
0.5 mmol/L 生物素	6 mL

以上成分均已分别灭菌。

4.5.7 二甲基亚砜:光谱纯,0.103 MPa 20 min 灭菌。

4.6 S-9 辅助因子(混合液试剂)的配制

4.6.1 0.4 mol/L 氯化镁($MgCl_2$)溶液:称取 3.8 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。

4.6.2 1.65 mol/L 氯化钾(KCl)溶液:称取 12.3 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。

4.6.3 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),每 500 mL 由以下成分组成:

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)(14.2 g/500 mL)	440 mL
磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)(13.8 g/500 mL)	60 mL

调 pH 至 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。

4.6.4 辅酶-II(氧化型)溶液:准确称取辅酶-II,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.025 mol/L 溶液,低温保存($-20^\circ C$ 以下)。

4.6.5 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液:称取葡萄糖-6-磷酸钠盐,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.05 mol/L,低温保存($-20^\circ C$ 以下)。

4.7 10% S-9 混合液的配制

每 10 mL 由以下成分组成,临用时配制。

磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4)	6.0 mL
氯化钾溶液(1.65 mol/L)	0.2 mL
氯化镁溶液(0.4 mol/L)	0.2 mL
葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液(0.05 mol/L)	1.0 mL
辅酶-II 溶液(0.025 mol/L)	1.6 mL
肝 S-9 液	1.0 mL

混匀,置冰浴中待用。

4.8 活化系统(S-9 和 S-9 混合液)的制备

用哺乳动物如大鼠,经诱导剂处理,取肝组织制备匀浆,9 000g 离心,上清液为 S-9 组分,与辅助成分以适当比例组成 S-9 混合液,用作试验中的代谢活化系统。

4.8.1 大鼠肝 S-9 的诱导和制备

4.8.1.1 选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠,体重 150 g 左右,周龄约 5 周~6 周。将多氯联苯(Aro-

chlor1254 或国产 PCB-五氯)溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL,按 500 mg/kg 体重无菌操作一次腹腔注射,5 天后断头处死动物,取出肝脏称重后,用新鲜冰冷的 0.15 mol/L 氯化钾溶液连续冲洗肝脏数次,以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 3 mL,连同烧杯移入冰浴中,用消毒剪刀剪碎肝脏,在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min,往复 1 min~2 min),或组织匀浆器(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。

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

4.8.1.3 S-9 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,保存期不超过一年。

4.8.2 S-9 混合液配制

由 S-9 液和辅助因子(S-9 混合液试剂)组成,辅助因子按 Ames(1983)配方,低温(-20℃以下)贮存。混合液临时新鲜无菌配制,或滤过除菌。一般按 1:9 配成 10% 混合液。用每皿 0.5 mL S-9 混合液(含 20 μL~50 μL S-9)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,或者按一般用量,即每皿 0.5 mL S-9 混合液(含 S-9 50 μL)。S-9 活性和用量应在报告中予以说明。

5 菌株及其鉴定与保存

5.1 试验菌株

采用四株鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株 TA97、TA98、TA100、TA102。TA97 和 TA98 可以检测各种移码型诱变剂;TA100 可检测引起碱基对置换的诱变剂;TA102 能检测出其他测试菌株不能检出或极少检出的某些诱变剂,如甲醛、各种过氧化氢化合物和丝裂霉素 C 等交联剂。一般用来测试受试物诱变性时,必须通过其中四个菌株的检测。必要时可增加 TA1535,TA1537 或 TA104 任一菌株。

5.2 菌株的鉴定

菌株特性应与 Ames 试验标准相符(见表 A.1)。突变型菌的某些特性易丢失或变异,遇到下列情况应鉴定菌株的基因型:

- a) 在收到培养菌株后;
- b) 当制备一套新的冷冻保存株或冰冻干燥菌株时;
- c) 当每皿自发回变数不在正常范围时;
- d) 当对标准诱变剂丧失敏感性时;
- e) 使用主平板传代时;
- f) 投入使用前。

鉴定方法如下:

5.2.1 增菌培养

在 5 mL 营养肉汤培养基中接种贮存菌培养物,于 37℃ 振荡(100 次/min)培养 10 h 或静置培养 16 h 备用。

5.2.2 组氨酸缺陷型的鉴定

5.2.2.1 加热融化底层培养基两瓶(一瓶不加组氨酸,一瓶加组氨酸),不加组氨酸者每 100 mL 底层培养基中加 0.5 mmol 分子 D-生物素 0.6 mL;加组氨酸者每 100 mL 底层培养基中加 L-组氨酸(每 100 mL 中含 0.404 3 g)1 mL 和 0.5 mmol 分子 D-生物素 0.6 mL,冷却至 50℃ 左右,各倒两个平皿。

5.2.2.2 接种:取有组氨酸和无组氨酸培养基平皿各一个,按菌株号顺序各取一白金耳菌液划线(直线)接种在培养基表面,37℃ 培养 48 h。

5.2.2.3 结果判定:四株菌在有组氨酸培养基平皿表面各长出一条菌膜,无组氨酸培养基平皿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。

5.2.3 脂多糖屏障缺陷的鉴定

5.2.3.1 加热融化营养肉汤琼脂培养基。

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

5.2.3.3 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(深粗型)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。TA97、TA98、TA100 和 TA102 均有抑制带,野生型鼠伤寒沙门氏菌没有抑制带。

5.2.4 R 因子的鉴定

5.2.4.1 加热融化营养肉汤琼脂培养基,冷却到 50℃左右,适量倒入平皿中,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依中线涂成一条带,待氨苄青霉素溶液干后,用接种环与氨苄青霉素带相交叉划线接种要鉴定的菌株,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(一个平皿可同时鉴定几个菌株),37℃培养 24 h。

5.2.4.2 结果判定:4 个菌株经过 24 h 培养,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。

5.2.5 四环素抗性的鉴定

5.2.5.1 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皿表面依中线涂成一条带,待四环素和氨苄青霉素液干后,用接种环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℃培养 24 h。

5.2.5.2 结果判定:TA 102 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。

5.2.6 uvrB 修复缺陷型的鉴定

5.2.6.1 在营养肉汤琼脂培养基平皿表面用接种环划线接种需要的菌株。

5.2.6.2 接种后的平皿一半用黑纸覆盖,在距 15 W 紫外线灭菌灯 33 cm 处照射 8 s,37℃培养 24 h。

5.2.6.3 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。

5.2.7 自发回变率的测定

5.2.7.1 准备底层培养基平皿 8 个。

5.2.7.2 融化顶层培养基 8 管,每管 2 mL,在 45℃水浴中保温。

5.2.7.3 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,一式二份,轻轻摇匀,迅速将此试管内容物倾入已固化的底层培养基平皿中,转动平皿,使顶层培养基均匀分布,平放固化,37℃培养 48 h 计数菌落数。

5.2.7.4 结果判定:每一株的自发回变率应落在表 A.1 所列正常范围内。

5.3 菌株的保存

鉴定合格的菌种应保存在深低温(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℃),或者冰冻干燥制成干粉,4℃保存。除液氮条件外,保存期一般不超过 2 年,主平板贮存在 4℃,超过二个月后应丢弃,TA102 主平板保存两周后应该丢弃。

6 试验设计及受试物的特殊处理

6.1 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。对于纯的化学物质,一般最低剂量为每平皿 0.2 μ g,最高剂量为 5 mg,或溶解度允许,或饱和浓度,或对细菌产生最小毒性浓度。对于毒性很低、摄入量很大的定型产品,可根据其溶解度和对细菌的毒性采用可能的最大剂量。每种受试物在允许最高剂量下设 4 个(含 4 个)以上剂量,每剂量间隔不超过 5 倍,每个剂量应做三个平

皿。未按上述原则者,应说明选定剂量的理由。

6.2 溶剂

溶剂可选用水、二甲基亚砷(每皿不超过 0.4 mL),或其他溶剂(毒性剂量以下)。无论选用什么溶剂均应无诱变性。

6.3 对照组的设置

试验应同时设有阳性物对照组、溶剂对照组和未处理对照,均包括加 S-9 和不加 S-9 两种情况。阳性对照物应根据菌株的类型选择,可参考附录 A 或其他有关资料。

6.4 受试物的特殊处理

若遇特殊受试物作非常规处理时应在报告中说明。对以下几种情况可作如下处理:

6.4.1 含组氨酸受试物:根据食品中测得的组氨酸含量若能诱发回复突变率的增高可加设组氨酸平行对照组;或将检品经 XAD- II 树脂柱过滤洗脱预处理。

6.4.2 食品包装材料及其制品成分:根据材料或制品的组成成分,可分别采取过筛抽提、蒸发残渣等技术处理。

6.4.3 挥发性受试物:可采用真空干燥器处理等方法。

6.4.4 天然植物材料:可按植物化学方法制备粗制品或纯制品。

7 试验方法

可分为平板掺入法、预培养平板掺入法及点试法等,分别叙述如下:

7.1 平板掺入法

7.1.1 增菌培养:取营养肉汤培养基 5 mL,加入无菌小三角瓶或无菌试管中,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 至对数增长后期,每毫升不少于 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ 个活菌数,培养瓶可用黑纸包裹,以防光线照射细菌。

7.1.2 底层培养基平皿若干个。

7.1.3 融化顶层培养基分装于无菌小试管,每管 2 mL,在 45℃ 水浴中保温。

7.1.4 在保温的顶层培养基中依次加入测试菌株新鲜增菌液 0.1 mL,混匀;加受试物 0.05 mL~0.2 mL(一般加入 0.1 mL。需活化时另加入 10% S-9 混合液 0.5 mL),再混匀,迅速倾入底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,37℃ 培养 48 h 观察结果。

7.1.5 另做一阳性对照、溶剂对照和未处理对照。阳性对照不加受试物,只加标准诱变剂(见附录 A 中 A.2.2, A.2.3);溶剂对照加除受试物和标准诱变剂以外的所有试剂,如溶剂二甲基亚砷等(光谱纯或分析纯);未处理对照只在培养基上加菌液;其他方法同上。

7.2 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。在加入顶层琼脂前,先进行以下预培养步骤:在试验中,将受试物(需活化时另加入 10% S-9 混合液)和菌液,在 37℃ 中培养 20 min,或在 30℃ 中培养 30 min,然后再加 2 mL 顶层琼脂,其他同上述平板掺入法。

7.3 点试法

7.3.1 与掺入法 7.1.1 相同。

7.3.2 与掺入法 7.1.2 相同。

7.3.3 与掺入法 7.1.3 相同。

7.3.4 在水浴中保温的顶层培养基中依次加入测试菌株增菌液 0.1 mL(需要时加 10% S-9 混合液 0.5 mL),混匀,迅速倾入底层培养基上,转动平皿,使顶层培养基在底层上均匀分布。平放固化后取无菌滤纸圆片(直径为 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。

7.3.5 另做阳性对照、溶剂对照和未处理对照。将加受试物改为加标准致突变物(见附录 A 中 A.2.1,

A. 2. 3)或溶剂(如二甲基亚砩),其他步骤同上。

8 结果的判定

8.1 掺入法的结果判定

以直接计数培养基上长出回变菌落数的多少而定,如在背景生长良好条件下,受试物组回变菌落数增加一倍以上(即回变菌落数等于或大于2乘以未处理对照数),并有剂量反应关系或至少某一测试点有可重复的并有统计学意义的阳性反应,即可认为该受试物诱变试验阳性。

8.2 点试法的判定

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确证。

9 结果报告

出报告时,阳性结果至少应做三次测试,阴性结果至少进行二次测试,才能对受试物做出判定。受试物的诱变性要用平板掺入试验来确证。报告中应注明试验条件,并附上全部结果资料,对结果有疑义者需经统计分析,同一受试物必须包括活化和非活化的结果,剂量单位为每平板微克,特殊例外。

附录 A
(规范性附录)

菌株生物学特性鉴定标准、标准诊断性诱变剂、试验记录及报告格式

A.1 菌株生物学特性鉴定标准、标准诊断性诱变剂、试验记录及报告格式

菌株生物学特性鉴定标准结果见表 A.1。

表 A.1

菌株	基因型					自发回变 菌落数 (S-9)
	组氨酸 缺陷	脂多糖 屏障缺陷	R 因子 (抗氨基青霉素)	抗四环素	uvrB 修复缺陷	
TA97	+	+	+	-	+	90~180
TA98	+	+	+	-	+	30~50
TA100	+	+	+	-	+	120~200
TA102	+	+	+	+	-	240~320
注	“+”表示需要 组氨酸	“+”表示抑 制带	“+”表示具有 R 因子	“+”表示有四 环素抗性	“+”表示无修 复能力	

A.2 标准诱变剂的测试结果及表示方法

A.2.1 标准诱变剂在点试中的试验结果见表 A.2。

表 A.2

诱 变 剂	剂量/(μg /片)	S-9	TA97a	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	5.0	-	-	+	-	++
叠氮钠	1.0	-	±	-	++++	-
ICR-191	1.0	-	++++	+	++	+
丝裂霉素 C	2.5	-	inh	inh	inh	+++
2,4,7-三硝基苊铜	0.1	-	++	++++	++	++
4-硝基-磷-苯撑二胺	20.0	-	++	+++	+	+
4-硝基喹啉-N-氧化物	10.0	-	±	++	++++	+++
甲基磺酸甲酯	2.0(μL)	-	+	-	+++	++++
敌克松	50.0	-	++++	+++	++	+++
2-乙酰氨基苊	20.0	+	++	++++	+++	+
黄曲霉毒素 B ₁	1.0	+		++	++	
甲基硝基亚硝基胍	2.0	-		-	+++	

注：每皿回变菌落数(扣除自发回变)的符号：-——<20；+——20~100；++——100~200；+++——200~500；++++——>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 S-9(20 μL /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(见表 A.3)。ICR-191——2-甲基基-6 氯代-9-[3-(2-氯乙基)氨基丙胺]吡啶·2 盐酸；inh——因诱变剂毒性引起的生长抑制。

A.2.2 诊断性诱变剂在平板掺入中的测试结果见表 A.3。

表 A.3

诱变剂	剂量 μg/皿	S-9	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	inh	inh	2 230
丝裂霉素 C	0.5	—	inh	inh	inh	inh
2,4,7-三硝基芬铜	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-乙酰氨基芬	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 his⁺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 S-9 (20 μL/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 菌株是致命的。

A.2.3 推荐用于点试和掺入平板的标准诱变剂见表 A.4。

表 A.4

方法	S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
点试	—	敌克松	敌克松	叠氮钠	敌克松
	+	2-氨基芬	2-氨基芬	2-氨基芬	
掺入	—	敌克松	敌克松	叠氮钠	敌克松
	+	2-氨基芬	2-氨基芬	2-氨基芬	