

螺旋涂布法评价联合诱导制备大鼠肝 S9 的活性大小

单纯, 张凤兰, 崔生辉

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立螺旋涂布法, 评价本实验室用联合诱导法制备大鼠肝匀浆 S9 活性优劣, 以期大大降低实验成本, 并用 Ames 实验法评价所建立的 S9 低温保存方法的可行性, 提高 S9 利用率。**方法** 采用螺旋涂布法和 Ames 试验方法对市售和自制两种来源 S9 活化的阳性结果进行比较, 并加入甘油保护剂, 建立 S9 酶系统低温储存方法, 使其以液态保存于 -20°C 冰箱中。**结果** Ames 实验中市售和自制两种 S9 在阳性组中都显示出明显活化作用, 同一条件下, Ames 试验中使用两种 S9 所得阳性结果并无较大差异, 变率间差异无统计学意义。螺旋涂布法中, 同一条件下, 使用两种 S9 所得阳性结果也无较大差异, 突变率间差异无统计学意义, S9 (浓度为 38%) 加入量在 $1.48 \sim 6.62 \mu\text{L}/\mu\text{L}$ 菌液剂量下, 对 TA100 菌有明显诱导作用, 回复突变率均为对照组的 3 倍以上。**结论** 可以用螺旋涂布法成功评价大鼠肝 S9 活性大小, 联合诱导法可以替代多氯联苯诱导法制备肝匀浆 S9。

【关键词】 螺旋涂布; Ames; 联合诱导; S9; 酶保护剂

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.09

Using spiral coating technique to evaluate the activity of rat liver S9 prepared by combination inducing method

SHAN Chun, ZHANG Feng-lan, CUI Sheng-hui

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To reduce experimental costs and improve the utilization of S9, we use spiral coating technique to evaluate the activity of rat liver S9 prepared by combination inducing method as well as to establish cryopreservation method. **Methods** Using spiral coating technique and Ames test to evaluate the activity of self-made rat liver S9 and commercially available S9 separately. We use glycerinum as protective agent to establish cryogenic storage method, so that S9 can be in liquid form stored at -20°C in the refrigerator. **Results** In the Ames assay as well as using spiral coating technique, the number of revertant colonies had dose-response relationship among the dose of S9. When conditions were the same, the number of revertant colonies in positive control was at the approximate level in presense of self-made rat liver S9 and commercially available S9 respectively. When S9 (concentration of 38%) was added to the amount at $1.48 \sim 6.62 \mu\text{L} / \mu\text{L}$ broth dose of bacteria, it can significantly induced *Salmonella typhimurium* histidine strains TA100, reverse mutation rates were three times more than the control group. **Conclusions** Spiral coating technique can successfully evaluate the activity of rat liver S9. The inducing method of combination of PB and BF can take the place of the unducing method of PCB_s in the preparation of Liver homogenate S9.

【Key words】 Spiral coating; Ames; Combination inducing; S9; Enzyme protecting agent

[基金项目] 中国食品药品检定研究院中青年基金(1010030112110)。

[作者简介] 单纯(1986-), 女, 硕士生, 研究方向: 毒理学。

[通讯作者] 崔生辉(1972-), 男, 博士, 研究方向: 食品微生物。Email: shengchj112@163.com。

沙门氏菌致突变 (Ames) 试验现广泛应用于检测食品添加剂、化妆品等的致突变性,在其标准操作中,需将细菌测试菌株与受试物以及可选外源性代谢活化系统 (S9) 三者混合进行融化琼脂覆盖培养。但实验周期较长、需用仪器设备多、方法要求严格、操作步骤复杂、实验成本高,在筛选、抽检大量样品时有一定难度。沙门氏菌螺旋涂布致突变检测技术是新开发、低成本、自动化高、试验周期短的一种微生物检测技术,目前国内外实验室认知并使用该技术较少^[1]。本实验室建立该法目的主要是以期最终替代经典回复突变试验对大量未知样品的快速筛选和食品化妆品大量抽检工作改善 Ames 试验梯度稀释的低效率问题。体外代谢活化剂 (S9) 常使用“多氯联苯”(PCBs) 作为诱导剂。PCBs 已被国际上定为致癌剂、长久不宜消除的有机污染物,已禁止生产使用。目前常采用的如 3-甲基胆蒎等单独诱导制备诱导剂,存在活化程度不稳定、敏感性低、无指标进行有效控制等缺陷,试验结果出现几十到上百倍的误差^[2]。故本实验室采用苯巴比妥和 β -苯黄酮 (BF) 联合诱导大鼠肝 S9 以替代 PCBs,并比较不同来源 S9 活性优劣^[3]。目前国内外保存 S9 均保存于液氮或 -80°C 冰箱中,反复冻融造成酶活大大降低,故本实验室在酶保护剂作用下将 S9 呈液态长期置 -20°C 冰箱中,替代传统酶保存方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物及饲养条件

SPF 级 SD 大鼠 24 只,雄性,体重 $180 \sim 200 \text{ g}$,由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供【SCXK(京)2009-0017】,实验在中国食品药品检定研究院三级实验动物室进行【SYXK(京)2011-0008】,温度 $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 45\%$,日光灯 12 h 照明。大鼠繁殖颗粒饲料和去离子水,自由饮水。

1.2 主要试剂及仪器

β -苯黄酮,苯巴比妥钠,2-氨基苄,冷冻离心机,比浊仪, CO_2 培养箱,螺旋涂布仪,市售 S9(多氯联苯诱导制得)。

1.3 分组和剂量设定

联合诱导组为苯巴比妥钠 + 苯黄酮 $80 \text{ mg} + 100 \text{ mg/kg}$,另设溶剂对照组(玉米油)每组大鼠 12 只。

1.4 动物处理及 S9 制备

联合诱导:给药组于处理 1、2、3 d 大鼠灌胃给予苯巴比妥钠 + 苯黄酮,每天 1 次,剂量为 $80 \text{ mg} + 100 \text{ mg/kg}$,给药体积为 2 mL/kg 。大鼠在首次注射后 4 d 处死,处死前 12 h 禁食不禁水;对照组给予玉米油 2 mL/kg ,余下步骤同一般肝 S9 制备方法。S9 分装于冻存管中,速冻后,部分保存于超低温冰箱中用于实验验证活性^[4-5]。

1.5 Ames 试验

增菌:将来自 MH 主板的单个菌落接种至 TSB 营养肉汤的 20 mL 无菌锥形瓶中。接种后的锥形瓶在 37°C 、 125 r/min 的旋转培养箱中孵育 16 h。将培养物于 5080 r/min 、 4°C ,离心 10 min,弃去上清,用 0.15 mol/L PBS 洗涤,连续离心 3 次。后将培养物用比浊仪测浊度值在 $0.8 \sim 1$ 之间,即约每毫升 1×10^9 至 2×10^9 个细胞的密度,存放于冰箱直到需要进行生物检验^[6]。采用平板掺入法,选阳性对照物为 2-氨基苄 (2-AF, $100 \mu\text{g/mL}$),阳性组每皿加 2-AF 溶液 0.1 mL ,每组 3 个平行平板,三种 S9(联合诱导、对照、市售)分别设加 S9 混合液(浓度 10%) 0.5 mL 的阳性组,菌株 TA98、TA100 通过鉴定都符合试验要求。经其余同一般 Ames 试验。试验重复 1 次^[7-9]。

1.6 螺旋涂布评价 S9 活性方法的建立

TA100 比浊浓度为 10^9 数量级后用于实验(比浊值: $0.8 \sim 1$)。

螺旋涂布仪每皿匀速涂布 TA100 原菌液 $20 \mu\text{L}$ (Unif, $20 \mu\text{L}$),待干后 ($<1 \text{ min}$) 均速涂布 $20 \mu\text{L}$ 阳性剂 2-AF ($100 \mu\text{g/mL}$),静置 $<1 \text{ min}$,最后以对数递减 ($\log$, $50 \mu\text{L}$) 分别涂布 $50 \mu\text{L}$ 三种肝 S9(市售、联合诱导、对照)。实验保证每次涂布平皿起点相同,依次覆盖从而形成一个阿基米德螺旋。涂布完毕待干后倒扣于 37°C 培养箱培养 48 h 后,接种受试物的营养最低需求培养板上将选择性地生长突变菌种。突变体菌落采用细菌菌落计数仪计数^[1, 10-11]。

1.7 肝 S9 低温保存法的建立

20 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} = 7.4$)、 1 mmol/L CaCl_2 、50% 丙三醇、47% S9 原液制备低温储存液。制备后的低温储存液将呈液态保存于 -20°C 冰箱中。用 Ames 实验方法,选择菌株 TA98、TA100,分别于配制后 1 周、1 个月、3 个月验证该储存液活性^[12-13]。

2 结果

2.1 Ames 试验菌株回变数结果

TA98、TA100 两种菌株分别采用联合诱导法制备和市售 S9 活化的阳性组回变数无较大差异,采用联合诱导法制备、市售 S9 阳性组的回变数均超过相同条件下对照组大鼠制备 S9 回变数的 2 倍以上,出现阳性结果。两种 S9 活性间无显著性差异,且均高于对照组大鼠 S9 活性($P < 0.05$,表 1)。

2.2 螺旋涂布实验结果

涂布用 S9 浓度选择较合理(38%),能做出比较好的浓度梯度,线性关系明显。涂布平皿阿基米德螺旋清晰可见,菌落回变数随螺旋由内向外依次递减。回变数 S9 涂布量在 1.48 ~ 6.62 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ 菌液浓度下,有较好的致突变活性,检测组菌落数均达到自发回变组及阳性对照组相应菌落数的 2 倍以上,可以判定结果阳性($P < 0.05$,表 2,图 1)。

2.3 Ames 实验验证肝 S9 低温保存法的可行性

Ames 验证活性结果表明:在 3 个月内,S9 储存液活性与原液活性相当,加入的离子及甘油保护剂

不会对其活性造成影响($P < 0.05$,表 3,4)。

3 讨论

在体外致突变试验中体外代谢活化剂是实验中必不可少的重要环节。目前国内实验室多使用市售 S9 上清液,一般 300 元/2mL/支,价格昂贵,使实验成本大大增加;实验结果表明,实验室自制 S9 活性与市售 S9 活性相当,无显著性差异。选择联合诱导制备大鼠肝匀浆 S9,不仅试剂方便够得,减少污染,且可以大大降低实验成本,在某些条件下可以替代市售 S9 用于实验。沙门氏菌螺旋涂布法的原理与 Ames 及其同事发明的标准平板插入法的原理一致;即,在存在或不存在外源性代谢活化系统的情况下,暴露于一定剂量范围的受试物后突变细菌受试菌株出现选择性生长。不同的是,在螺旋涂布法中,这些步骤是自动化的,使用特定机器依次将细菌、受试物和 S9 混合物加入到旋转琼脂培养板上,依次覆盖从而形成一个阿基米德螺旋,最终密度均匀的细菌将暴露于一系列连续浓度梯度的受试物中。在 37 物加孵育 48 ~ 72h 后,接种受试物

表 1 两种诱导方法制备的 S9 阳性诱变剂 Ames 试验回变数结果($\bar{x} \pm \text{SD}$)

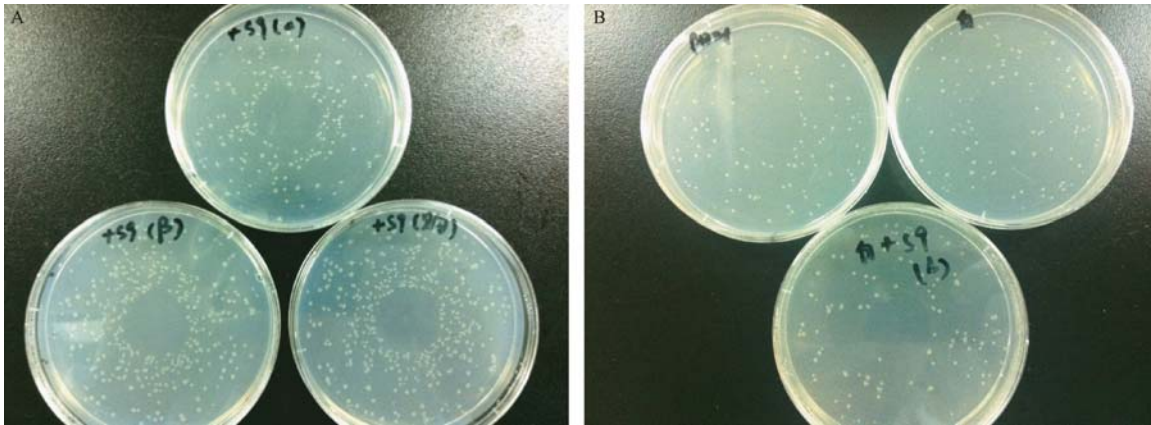
Tab.1 Results of the Ames assay using S9 from 2 sources

组别 Group	S9 混合液(mL) S9 mixture (mL)	菌落回复突变数 The number of revertant colonies	
		TA98	TA100
自发回变 Spontaneous revertant colonies	0	62 ± 11	144 ± 7
+ S9(市售) + S9(Commercially available)	0.5	1199 ± 211	1378 ± 185
+ S9(联合诱导) + S9(Induction combined with PB and BF)	0.5	1327 ± 148	1662 ± 124
+ S9(对照组) + S9(Control group)	0.5	812 ± 102	951 ± 68

表 2 螺旋涂布法验证 S9 致突变活性

Tab.2 Results of the activation of S9 using spiral coating technique

自发回变 Spontaneous revertant - S9					检测组 Test groups		
					+ S9(市售) (Commercially available)	+ S9(联合诱导) (Induction combined with PB and BF)	+ S9(对照组) (Control group)
螺旋 Spiral	加菌量(μL) Bacteria Count	平均菌落数 Colony count	+ S9 量(μL) Volume of S9	S9 量/ μL 菌液 Volume of S9/Bacterium solution(μL)	平均菌落数 Colony count	平均菌落数 Colony count	平均菌落数 Colony count
4a	2.9	17 ± 2	19.2	6.62	95 ± 8	108 ± 9	61 ± 5
4b	2.5	18 ± 2	11.72	4.69	90 ± 5	88 ± 7	40 ± 5
4c	2.96	15 ± 3	7.72	2.61	60 ± 3	81 ± 7	37 ± 4
3a	3.44	23 ± 3	5.08	1.48	59 ± 6	62 ± 5	33 ± 5
3b	3.88	27 ± 3	3.32	0.86	48 ± 4	47 ± 6	26 ± 4
3c	4.36	40 ± 6	2.16	0.50	34 ± 4	33 ± 4	21 ± 3
菌落总数 Total bacterial count		140 ± 9			385 ± 25	419 ± 30	218 ± 25



注：A:螺旋涂布法对三种 S9 活性验证;B:用螺旋涂布验证细菌自发回变。

图 1 螺旋涂布法验证 S9 致突变活性 TA100 菌回复突变数情况

Note: A:Results of the activation of S9 using using spiral coating technique;B:Results of the Spontaneous revertant.

Fig. 1 The reverse mutation number of Salmonellatyphimurium histidine strains TA100 using spiral coating technique

表 3 Ames 法验证 S9 低温储存液致突变活性(TA98、TA100, $\bar{x} \pm SD$)

Tab. 3 Results of the activation of S9 stored in -20℃ refrigerator using the Ames assay

组别 Group		1 周 1 week	1 个月 1 month		3 个月 3 month		
		自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)	自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)	自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)
TA98	S9(市售) S9(Commercially available)	53 ± 12	973 ± 50	54 ± 8	873 ± 50	53 ± 4	860 ± 61
	S9(储存液) S9(Stored in -20℃ as liquid form)	1001 ± 18		955 ± 49		947 ± 52	
TA100	S9(市售) S9(Commercially available)	149 ± 14	1055 ± 62	158 ± 4	1108 ± 91	126 ± 10	1039 ± 54
	S9(储存液) S9(Stored in -20℃ as liquid form)		1106 ± 102		1116 ± 95		1090 ± 104

的营养最低需求培养板上将选择性地生长突变菌种。突变体菌落采用细菌菌落计数仪计数,该计数仪可对螺旋路径上的菌落进行计数。计数仪与装有特别设计的用于螺旋涂布培养板分析程序的个体计算机相连。经分析可得出突变体的数目、大小和位置,通过这些信息,可得出每块螺旋涂布培养板的剂量-反应曲线^[14-15]。

螺旋涂布法可将一系列浓度梯度的受试物涂布在单个琼脂板上,促进了其在致突变性研究领域的使用。沙门氏菌螺旋涂布致突变检测技术自 Houk^[16]发明此法自今,已成为国外实验室致突变检测技术中多项研究的选择。其被国际公职分析化学工作者协会(AOAC)批准,是 APHA 推荐的致突变检测替代方法。国内实验室建立和应用该实验方法十分罕见,查阅国内、外文献报导,各实验室还没有一整套规范的操作方法及结果评价体系。本

实验室已对涂布用培养基的配制、受试物的前处理及平皿涂布方式、细菌接种数量及操作顺序、稳定自发回变数范围、确定细菌回复突变数等逐一成功建立。研究结果表明,在进行与标准法相同剂量范围的检测时,螺旋涂布法仅需要约 1/10 的纯化合物样本量以及 1/40 ~ 1/80 的复杂混合物样本量,剂量-反应分析数据来源于单个琼脂培养板而非一系列培养板。证实了其方法的突出特点“敏感”、“广谱”、“快速”、“低廉”。

国内外实验室 S9 肝匀浆系统多保存在液氮罐或 -80℃ 冰箱中,每次使用前需室温融化,大大降低酶的活性和利用率。本实验室将制成品 S9 经酶保护剂作用,在液态下长期于 -20℃ 冰箱储存。结果表明,通过 3 个月时间的验证,加入甘油保护剂不会对 S9 活性造成影响,避免了反复冻融使酶活性降低。最终确定一套实验室制备规范,达到诱导剂易

购买、对环境、人类危害轻微、成本低廉、制得的代谢活化剂酶生物活性高且稳定的目的。为本实验室今后大量、快速、准确筛检食品、保健食品和化妆品打下物质基础。

参考文献:

- [1] Claxton, L. D., V. S. Houk, S. Warren. Methods for the spiral Salmonella mutagenicity assay including specialized applications [J]. *Mutat Res*, 2001. 488(3): 241–257.
- [2] 王亚其, 肖凯, 刘玉清, 等. 两种诱导方法制备大鼠肝 S9 在两种遗传毒性试验中活性比较. *现代预防医学* [J], 2006. 33(4): 4.
- [3] Garcia Franco, S., G. Dominguez, J. C. Pico. Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles [M]. *Mutagenesis*, 1999. 14(3): 323–326.
- [4] Woodall, G. M., Jr., W. C. Dauterman, D. M. DeMarini. Effect of dietary casein levels on activation of promutagens in the spiral Salmonella mutagenicity assay. II. Studies with induced rat liver S9 [J]. *Mutat Res*, 1996. 360(2): 127–143.
- [5] Atsushi Hakura, S. S., Shigeki Sawada, *et al.* An improvement of the Ames test using a modified human liver S9 preparation [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2002. 169: 4.
- [6] Maron, D. M. and B. N. Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983. 113(3–4): 173–215.
- [7] Aubrecht. Bioluminescent Salmonella reverse mutation assay: a screen for detecting mutagenicity with high throughput attributes [J]. *Mutagenesis*, 2007. 22(5): 335–342.
- [8] Jemnitz, K. Comparative study in the Ames test of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene metabolic activation using rat hepatic S9 and hepatocytes following in vivo or in vitro induction [J]. *Mutagenesis*, 2004. 19(3): 245–250.
- [9] Claxton, L. D., A. Umbuzeiro Gde, D. M. DeMarini. The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century [J]. *Environ Health Perspect*, 2010. 118(11): 1515–1522.
- [10] Houk, V. S., S. Schalkowsky, L. D. Claxton. Development and validation of the spiral Salmonella assay: an automated approach to bacterial mutagenicity testing [J]. *Mutat Res*, 1989. 223(1): p. 49–64.
- [11] Claxton, L. D. Evaluating the relationship of metabolic activation system concentrations and chemical dose concentrations for the Salmonella spiral and plate assays [J]. *Mutat Res*, 1991. 253(2): 127–136.
- [12] Yang, Z. Rapid purification of truncated Taq DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008. 50(Pt 2): 71–75.
- [13] Youngblom, J. Extended stability of Taq DNA polymerase and T4 DNA ligase at various temperatures [J]. *Biotechniques*, 2003. 34(2): 264–266, 268.
- [14] B. N. Ames, J. M., E. Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test [J]. *Mutat* 1975. 31: 17.
- [15] Ames, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer [J]. *Science*, 1979. : p. 6.
- [16] Association of Official Analytical Chemists. General referee reports [S]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1989. 72(1): 62–137.

[修回日期]2015-01-26