

菌株传代及葡萄糖浓度对回复突变实验的影响

童琳¹, 曹红亭², 张爽¹, 叶红¹, 李舜³, 蔡标^{3*}

(1. 安徽省医学科学研究所, 预防医学研究所, 合肥 230061; 2. 宁夏医科大学 公共卫生与管理学院, 银川市 750004; 3. 安徽省医学科学研究所, 微生物研究所, 合肥 230061)

摘要: 目的 探讨菌株传代培养、不同葡萄糖浓度对回复突变实验的影响。**方法** 实验菌株选择鼠伤寒沙门氏菌 TA 型菌株, 分别为 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株, 分别使用原代、传代一次、传代二次菌株进行自发回变实验检测。选取 TA97 菌株分别在标准底层培养基和低糖顶层培养基进行突变的检测。

结果 4 种菌原代组、F1 组、F2 组的自发回变菌落数差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 TA97 和 TA98 的 F1 组、F2 组, TA100 的 F2 组不符合国标 GB 15193.4-2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》对回变菌落数的要求; 标准底层培养基与低糖培养基 TA97 回复突变数有统计学差异($P < 0.05$), 但均达到国家标准要求。

结论 菌株的传代及葡萄糖浓度对回复突变实验均有影响。

关键词: 传代; 葡萄糖浓度; 回复突变

Effect of strain passage and glucose concentration on bacterial reverse mutation test

TONG Lin¹, CAO Hong-Ting², ZHANG Shuang¹, YE Hong¹, LI Shun³, CAI Biao^{3*}

(1. Anhui Academy of Medical Sciences, Institute of Preventive Medicine, Hefei 230061, China;
2. Ningxia Medical University Public Health and Management College, Yinchuan 750004, China;
3. Institute of Microbiology, Medical Science Institute of Anhui Province, Hefei 230061, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of the culture of strain passage and different glucose concentrations on the bacterial reverse reversion mutation test. **Methods** The *Salmonella typhimurium* TA were selected for strains, which were TA97, TA98, TA100 and TA102 strains, respectively, using the original, sub-generation, and second-generation strains for spontaneous reversal experiments. TA97 strains were selected for mutation detection in standard bottom medium and low-sugar top medium respectively. **Results** There were significant differences in the number of spontaneously reverting colonies between the 4 strains of origin group, F1 group and F2 group ($P < 0.05$). F1 group, F2 group of TA97 and TA98, F2 group of TA100 did not meet the national standard GB 15193.4-2014 National food safety standard-Bacterial reverse mutation assay requirements for the number of reverting colonies. There was a statistically significant difference in the number of reverse mutation between the normal glucose concentration bottom medium and the low concentration medium ($P < 0.05$), but all met the national standards. **Conclusion** Subculture of the strain and glucose concentration have an effect on the mutation test.

基金项目: 安徽省“十三五”医疗卫生重点专科(皖卫科教[2017]30号)、安徽省卫生计生委2018年委课题(2018YK005)

Fund: Supported by Anhui Provincial “Thirteen Five-Year” Medical and Health Key Specialties ([2017] No. 30), Anhui Provincial Health and Family Planning Commission 2018 Committee (2018YK005)

*通讯作者: 蔡标, 副研究员, 主要研究方向为病原微生物和流行病学与卫生统计学。E-mail: caib81@163.com

*Corresponding author: CAI Biao, Associate Professor, Medical Science Institute of Anhui Province, No.15, Yonghong Road, Luyang District, Hefei 230061, China. E-mail: caib81@163.com

KEY WORDS: subculture; glucose concentration; Ames

1 引言

食品安全性毒理学评价在食品行业的各个领域都有涉及, 包括新资源食品、保健食品等^[1]。保健食品中各种成分的种类及相互作用方式愈发复杂, 对人体的毒性损害机制等并不十分的明确, 因此对保健食品的毒理学安全性评价是十分重要的^[2]。细菌回复突变试验(bacterial reverse mutation test, Ames), 已被世界各国广泛用于环境污染^[3]、化妆检测^[4], 也是我国功能性食品批准上市前必检项目, 该方法具有快速、灵敏、经济等特点^[5,6]。Ames 实验在实际操作过程中, 常因受多种因素影响而导致实验结果不理想, 不同实验室检测结果差异较大, 使得其有效性很大程度上被限制, 实验过程变得复杂且结果不可预测与控制, 容易出现不可预测的假阳性或假阴性结果^[7], 从而使实验周期变长。因此需要对 Ames 实验的最优实验条件进行探讨优化, 以确定最佳的实验条件, 大大减少实验时间, 提高实验效率^[8]。有研究提示在平板掺入法试验中, TA97 菌株对于葡萄糖的浓度比较敏感, 但对其无深入研究。对于菌株活化后, 是否需要传代培养也无统一说法^[9]。

本研究通过细菌回复性试验, 探讨菌株的传代培养及不同葡萄糖浓度对 Ames 实验的影响, 并以牡丹籽油的致突变性实验对研究结果进行验证, 为提高 Ames 实验效率提供指导依据。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

材料: 组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102(美国 MOLTOX 公司)。

BSC-1604IIA2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); 5804R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); DW-HL388 超低温冰箱(-80 °C, 合肥美菱电冰箱公司); SHP-100 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); DC-0560 恒温水浴锅(南京先欧仪器制造有限公司); LX-B50L 压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备厂)。

叠氮钠(分析纯, 上海化学试剂有限公司); 2-氨基苄(分析纯, 美国 Sigma 公司); 敌克松(分析纯, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 二甲基亚砜(分析纯, 美国 Aladdin 工业公司); D-生物素(分析纯, 生工生物工程股份有限公司); L-组氨酸(分析纯, 上海源聚生物科技有限公司); 大鼠肝液 10%S-9Mix(分析纯, 美国 MOLTOX 公司); 琼脂粉(北京索莱宝科技有限公司); 营养肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司); 牡丹籽油(食用级, 瑞璞牡丹产业发展有

限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 增菌培养

取无菌试管 4 支, 加入灭菌肉汤培养基各 10 mL。取 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株的菌种药片各 1 粒分别加入 4 支试管中, 置于 37 °C 震荡培养 12~14 h, 至每 1 mL 不少于 1×10^9 个活菌数。培养管避光保存。

2.2.2 传代培养对菌株自发回变影响的检测

将菌株分为原代组、F1 组、F2 组。原代组取活化菌液各 0.1 mL, 加入含有顶层琼脂培养基的试管内(45 °C 保温), 将其混匀后平铺于底层琼脂平板上, 将琼脂平放固化。待琼脂固化后, 置于 37 °C 培养箱中, 孵育 48 h 后记录每皿回变菌落数。F1 组、F2 组用接种环取 TA97、TA98、TA100 划线接种于组氨酸-生物素平板上, 取 TA102 接种于氨苄四环素平板上, 于 37 °C 环境下培养 48 h, 记录回变菌落数。用接种环从主平板上分别勾取菌株, 分别重复增菌过程 1 次和 2 次, 进行自发回变检测。

2.2.3 顶层培养基平板掺入法

制备底层培养基平皿, 在灭菌琼脂培养基中(400 mL)依次加入磷酸盐贮备液 8 mL, 葡萄糖溶液, 分别制备 2.0%(m:V, 标准底层培养基)和 0.4%(m:V)2 个浓度葡萄糖平皿。取无菌试管, 加入 2 mL 顶层培养基(45 °C 水浴), 后加入增菌液 0.1 mL 混匀, 加样品溶液 0.1 mL[活化时加入 10%(m:V)大鼠肝液 10% S9 混合液 0.5 mL], 混匀。将混合液迅速倒入底层培养基上, 转动平皿, 使顶层培养基均匀分布在底层培养基上, 将其平放固化。根据不同组别自发回变检测结果, 选取最适组菌株。每种菌株的每个测试浓度设 3 皿平行(TA97 菌株额外设置葡萄糖浓度为 0.4%的培养基对照组)。分别在加 S9 活化系统和不加 S9 活化系统 2 种情况下进行实验, 在 37 °C 的环境下培养 48 h 后, 观察结果。

2.2.4 以牡丹籽油致突变性检测为例验证实验结果

受试物根据查询文献结果, 设 5.0、1.0、0.2、0.04 mg/皿 4 个剂量组, 同时设置对照组, 包括阳性对照组(叠氮钠、2-氨基苄、敌克松), 溶剂对照组(二甲基亚砜、蒸馏水), 未处理对照组(实验时只在培养基上加菌液, 不加其它任何试剂), 所有对照组均包括加 S9 和不加 S9 2 种情况, 每剂量做 3 个平行皿, 37 °C 培养 48 h 后计数每皿回变菌落数。

2.2.5 统计学方法

数据采用 SPSS23.0 进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2.2.6 结果判定

根据国标 GB 15193.4-2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[5], 直接计数培养基上生长出的回变菌落数。如在背景生长良好条件下, 牡丹籽油胶囊组回变菌落数增加超过未处理对照组回变菌落数一倍以上, 且有不符合国家标准的情况, 即可认为牡丹籽油诱变试验阳性。

3 结果与分析

3.1 传代培养对菌株自发回变的影响

如表 1, TA97 各组间回变菌落数有统计学差异 ($P<0.01$), 且传代后的回变菌落数未达到国标规定数量; TA98 原代组与 F1 组、F2 组的回变菌落数有统计学差异 ($P<0.01$), F1 与 F2 组之间无统计学差异 ($P>0.05$), 且传代后的回变菌落数未达到国标规定数量; TA100 各组间回变菌落数有统计学差异 ($P<0.01$), 原代组与 F1 组回变菌落数符合国标规定数量, F2 组未达到国标规定数量, 且呈逐渐减少的趋势; TA102 原代组与 F1 组回变菌落数无差异 ($P>0.05$), F2 组与原代组、F1 组回变菌落数有统计学差异

($P<0.01$), 各组回变菌落数均符合国标规定数量, 且呈逐渐减少趋势。本实验表明, TA97、TA98 传代后的菌株不适用于 Ames 实验; TA100 F1 代菌株活性减弱, 但仍适用于 Ames 实验, F2 代菌株不适用于 Ames 实验; TA102 可传代使用, 其中 F1 活性较好, F2 代虽活性减弱但仍不影响使用。

3.2 葡萄糖浓度对 TA97 生长的影响

如表 2, 4 个样品组中, 不加 S9 标准底层培养基与低糖培养基回变菌落数均有显著差异 ($P<0.05$); 2.0 mg/皿、0.2 mg/皿和 0.04 mg/皿样品组, 加 S9 低糖底层培养基与标准培养基回变菌落数有显著性差异 ($P<0.05$), 5.0 mg/皿则无差异 ($P>0.05$)。各组均达到国家标准, 这表明低浓度葡萄糖与标准浓度葡萄糖均可适用于 Ames 实验, 但低浓度葡萄糖更有利于 TA97 生长。

3.3 牡丹籽油胶囊对伤寒沙门氏菌的致突变作用

按改良后的实验条件, 在加和不加 S9 条件下, 菌株的回变菌落数均符合国家标准, 表明在经改良的实验条件, 符合 Ames 实验要求^[5], 如表 3 所示。

表 1 传代培养对菌株自发回变菌落数的影响 ($n=3$)
Table 1 Effect of subculture on the number of spontaneous reversion of strains ($n=3$)

组别	TA97	TA98	TA100	TA102
原代组	52.00±2.65	32.33±1.53	78.67±0.58	311.00±4.58
F1 组	35.67±0.58**	5.33±2.52**	54.0±1.73**	304.00±3.61
F2 组	24.67±3.79**△△	4.00±2.00**	48.3±3.06**△	232.67±4.73**△△
F 值	78.569	181.605	184.816	293.544
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注: *表示与原代组相比 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$; △表示 F1 组与 F2 组相比 $P<0.05$, △△表示 $P<0.01$ 。

表 2 葡萄糖浓度对 TA97 生长的影响 ($n=3$)
Table 2 Effect of glucose concentration on the growth of TA97 ($n=3$)

组别	5.0 mg/皿		2.0 mg/皿		0.2 mg/皿		0.04 mg/皿	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
低浓度	90.00±4.00	103.67±2.08	88.33±2.08	90.67±1.15	89.67±2.52	98.67±1.15	93.00±3.61	113.33±4.93
标准浓度	75.67±2.08	97.67±3.51	80.33±1.15	84.67±1.53	78.33±0.58	82.33±2.08	71.33±4.04	90.67±5.13
t 值	5.506	2.546	5.821	5.427	7.603	11.884	6.929	5.516
P	0.005	0.064	0.004	0.006	0.002	<0.001	0.002	0.005

表 3 牡丹籽油对伤寒沙门氏菌的致突变性 ($n=3$)
Table 3 Mutagenicity of peony seed oil against Salmonella typhi ($n=3$)

组别	TA97		TA98		TA100		TA102		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
受试物剂量组	5 mg/皿	86±13.3	96±10.0	26±4.0	24±2.5	112±12.2	119±10.7	333±22.0	352±35.5
	2 mg/皿	84±13.0	82±3.8	25±7.4	25±4.5	120±5.9	105±11.6	320±43.1	353±55.1
	0.2 mg/皿	85±8.2	85±6.1	26±4.0	28±7.1	112±2.5	124±8.7	310±23.8	348±31.2
	0.04 mg/皿	88±10.9	87±10.5	24±3.5	26±2.5	121±7.4	119±8.1	348±41.5	334±23.3

续表 3

组别	TA97		TA98		TA100		TA102		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
阳性对照组	敌克松	1361±105.9	/	1094±118.0	/	/	/	1295±300.5	/
	叠氮钠	/	/	/	/	1386±139.8	/	/	/
	2-氨基苄	/	1009±128.3	/	684±100.3	/	943±112.9	/	/
未处理对照组	99±9.4	93±16.6	29±3.3	25±4.7	135±8.3	136±11.6	374±43.4	335±55.7	
溶剂对照组	蒸馏水	102±3.1	94±8.9	29±4.4	25±4.5	130±11.0	125±15.3	365±14.9	362±46.4
	二甲基亚砷	95±8.8	94±9.0	28±6.5	25±5.3	114±16.8	103±7.8	339±33.4	323±42.8

4 结论与讨论

Ames 实验是目前国内外应用较为广泛的检测样品致突变性的动物体外实验^[10]。其原理是利用鼠伤寒沙门氏菌缺陷型菌株在无组氨酸的培养基中不能生长, 只有少数自发回变菌落生长, 在有组氨酸的培养基中可以正常生长, 但当无组氨酸的培养基中有可致缺陷型菌株发生突变的致突变剂存在, 则缺陷型会发生回复突变, 回变成组氨酸非缺陷型野生型, 使该缺陷型菌株也可在无组氨酸的培养基中正常生长^[11]。

Ames 实验过程中, 一般将菌株活化后传代保存于甘油中, 使用时取冻干菌复苏培养使用。本次实验结果表明, 传代后的部分鼠伤寒沙门氏菌菌株不适用于 Ames 实验, 这可能有以下几种原因: (1) 可能与菌株自身活性有关, 如马洪波等^[12]认为保存微生物时间较短的传代培养保存法, 会使微生物发生变异, 在反复传代和适应的过程中尤为明显。(2) 可能是传代保存过程中, 菌株发生抗原和生化反应变异, 如王瑶等^[13]用胎牛血清和全血传代培养, 对比前后抗原性和生化反应性的变化, 结果表明保存时间过长的沙门菌, 其菌体抗原和生化反应都有可能发生变异。(3) 可能是保存过程中, 受到外界条件的影响, 导致菌株血清型和致病力发生改变。李能章等^[14]通过选择紫外线对沙门氏菌 SW1 和 SW4 菌株进行诱变, 连续传 60 代后做其毒力、质粒图谱分析以及血清型检测, 结果发现在外界条件的作用下, 病原菌的血清型和致病力会发生一定程度的改变。

平板渗入法实验结果表明, 将琼脂培养基中葡萄糖含量由 2%(w/v)变为 0.4%(w/v), TA97 生长的更好, 与张爽等^[15]的研究结果一致。TA97 对葡萄糖浓度较为敏感, TA97 在含葡萄糖的培养基上生长缓慢, 可通过振荡培养使葡萄糖更好的被利用, 而不是增加葡萄糖的浓度, 因为葡萄糖浓度越高越容易导致琼脂脱水, 影响 TA97 的生长^[16]。

本研究通过对牡丹籽油致突变性检测的验证, 表明通过对 Ames 实验条件的调整, 可以有效节省菌株制备的时间, 从而提高实验的效率。

参考文献

- [1] 吕晶, 张群. 食品安全法律法规在食品安全实施中的现状及解决措施[J]. 现代食品, 2016, (5): 48-49.
Lv J, Zhang Q. Food safety laws and regulations in the implementation of food safety situation and the solution measures [J]. Mod Food, 2016, (5): 48-49.
- [2] Shannon E, Majowicz, Samantha B, et al. Food, health, and complexing: towards a conceptual understanding to guide collaborative public health action [J]. J Univ Waterl, 2016, 16(1): 3142-3148.
- [3] Okunola AA, Babatunde EE, Chinwe D, et al. Mutagenicity of automobile workshop soil leachate and tobacco industry wastewater using the Ames *Salmonella* fluctuation and the SOS chromotests [J]. Toxicol Ind Health, 2016, 32(6): 1086-1096.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范: 2015 年版[Z]. 2015.
State Food and Drug Administration. Safety and technical standards for cosmetics: 2015 edition [Z]. 2015.
- [5] GB 15193.4-2014 食品安全国家标准 细菌回复突变试验[S].
GB 15193.4-2014 National food safety standard-Bacterial reverse mutation assay [S].
- [6] 韩丽, 胡海, 刘平, 等. 艾烟中可吸入颗粒物致鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验[J]. 中华中医药杂志, 2013, (6): 1860-1863.
Han L, Hu H, Liu B, et al. Reversion mutation of *Salmonella typhimurium* caused by inhalable particulate matter in Moxa smoke [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2013, (6): 1860-1863.
- [7] 陈丽芬, 陈颖, 周莉, 等. Ames 试验中微菌落出现的原因初步分析[C] 第五届药物毒理学年会, 海口, 2015
Chen LF, Chen Y, Zhou L, et al. Preliminary analysis of the causes of microcolony occurrence in Ames test [C]. The 5th Annual Meeting of Drug Toxicology, Haikou, 2015.
- [8] Yasin E, Ahmet O. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT test [J]. Rev Bras Farm, 2014, 24(13): 51-59.
- [9] 瞿淳. 寿胎丸对 TA 系菌株基因回复突变实验的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.
Qu C. Effect of Shoutai pill on gene reversion mutation of TA Line strains [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2009.
- [10] 王晓萌, 张萍, 钟儒刚, 等. Ames 试验的剂量效应关系及统计学方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, (15): 3151-3154.
Wang XM, Zhang P, Zhong RG, et al. Study on dose-effect relationship

- and statistical methods of Ames test [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, (15): 3151–3154.
- [11] 高立文, 许春花, 张航, 等. 组氨酸对细菌回复突变数的影响[C]. 第六届全国药物毒理学会论文集, 2016.
Gao LW, Xu CH, Zhang H, *et al.* Effect of histidine on the number of bacterial back mutations [C]. *Proceedings of the 6th National Conference on Drug Toxicology*, 2016.
- [12] 马洪波, 冯子力, 谭华. 菌(毒)种保存及复苏技术[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2006, 29(4): 243–247.
Ma HB, Feng ZL, Tan H. Bacterial (poisonous) species preservation and resuscitation techniques [J]. *Chin J Front Health Quarant*, 2006, 29(4): 243–247.
- [13] 王瑶, 邵荣标, 刘伟. 沙门菌及志贺菌生物学特性回复变异现象研究[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(11): 2070–2071.
Wang Y, Shao RB, Liu W. Studies on the phenomena of return variation of the biological characteristics of *Salmonella* and *Shigella* [J]. *Mod Prev Med*, 2014, 41(11): 2070–2071.
- [14] 李能章, 彭远义, 马磊, 等. 紫外线诱变传代对致病性沙门氏菌的影响[J]. *中国奶牛*, 2009, (11): 15–17.
Li NZ, Peng YY, Ma L, *et al.* Influence of ultraviolet mutation and passage culture on the pathogenic *Salmonella* [J]. *Chin Dairy Cattl*, 2009, (11): 15–17.
- [15] 张爽, 童琳, 许勇, 等. 籽油软胶囊回复突变试验的研究[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(33): 79–80.
Zhang S, Tong L, Xu Y, *et al.* Study on reversion mutation test of peony seed oil soft capsule [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2017, 45(33): 79–80.
- [16] 卢纯惠. Ames 测试系统中 TA-(97a), TA-(102)菌株的新信息[J]. *环境与健康杂志*, 1991, (3): 41.
Lu CH. New information on TA-(97a) and TA-(102) strains in Ames test system [J]. *J Environ Health*, 1991, (3): 41.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



童琳, 硕士, 研究实习员, 主要研究方向为公共卫生与预防医学、卫生管理。
E-mail: toly10000@163.com



蔡标, 硕士研究生, 副研究员, 主要研究方向为病原微生物和流行病学与卫生统计学。
E-mail: caib81@163.com