

实验技术与方法

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 即用型
标准菌株的研制

余文, 安琳, 陈怡文, 任秀, 李景云, 崔生辉
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 研制鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 即用型标准菌株。方法 对高、低浓度鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的冻干菌株进行计数, 测定了增菌 3、5、7、18 h 后冻干菌的自发回变率, 依据 CNAS-GL003 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》(CNAS-GL003) 和 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》(GB 15193.4—2014), 测定即用型标准菌株的均匀性、储藏和运输稳定性、自发回变率和诱变剂突变率。比较 20 株即用型标准菌株和新鲜菌株的自发回变率和诱变剂突变率测试结果的标准偏差。结果 高浓度冻干样品浓度为 $10^7\sim 10^8$ CFU/样品, 低浓度样品浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/样品; 增菌 18 h 后自发回变率的结果基本符合 GB 15193.4—2014 要求; 4 株即用型标准菌株的均匀性结果的 F 值分别为 1.12、1.05、1.68、1.38, $F < F_{0.05}(19, 20)$, 符合 CNAS-GL003 要求。4 株冻干菌株在 25 °C 5 d、4 °C 14 d、-20 °C 6 个月的储存条件, 检测结果符合储存和运输稳定性要求。20 株即用型冻干标准菌株的自发回变率较新鲜菌株标准偏差小。结论 本研究研制出适用于 Ames 试验的即用型标准菌株, 其均匀性、储存和运输稳定性良好, 自发回变的稳定性优于新鲜菌株。

关键词:鼠伤寒沙门菌; 标准菌株; 即用型; 冻干

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)08-1140-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.08.002

Development of ready-to-use standard strains of *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, and TA102

YU Wen, AN Lin, CHEN Yiwen, REN Xiu, LI Jingyun, CUI Shenghui
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective This study aimed to develop ready-to-use standard strains of *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA97, TA98, TA100, and TA102 for mutagenicity testing. **Methods** Freeze-dried strains of *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, and TA102 at both high and low concentrations were quantified. The spontaneous reversion rate of the freeze-dried strains after 3, 5, 7, and 18 h was measured. Homogeneity, storage and transportation stability, spontaneous revertant frequency, and mutagenic agent mutation rate of the ready-to-use standard strains were evaluated following the CNAS-GL003 2018 “Guidelines for the Evaluation of Homogeneity and Stability of Proficiency Testing Samples” and GB 15193.4—2014 “National Food Safety Standard - Bacterial Reverse Mutation Test.” Standard deviations of spontaneous revertant frequency and mutagenic agent mutation rate test results between 20 ready-to-use standard strains and fresh strains were compared. **Results** High-concentration lyophilized samples had concentrations ranging from $10^7\sim 10^8$ CFU/sample, while low-concentration samples had concentrations ranging from $10^5\sim 10^6$ CFU/sample. The spontaneous reversion rate results after 18 h of incubation met the requirements of GB 15193.4—2014. Homogeneity results for the four ready-to-use standard strains showed F -values of 1.12, 1.05, 1.68, and 1.38, with $F < F_{0.05}(19, 20)$, meeting CNAS-GL003 requirements. The detection results for the four freeze-dried strains stored at 25 °C for 5 d, 4 °C for 14 d, and -20 °C for 6 months met storage and transportation stability requirements. The standard deviation of spontaneous revertant frequency in the 20 ready-to-use freeze-dried standard strains was smaller than that of fresh strains. **Conclusion** The ready-to-use standard strains developed in this study exhibit excellent homogeneity, storage, and

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100704)

作者简介: 余文 女 副研究员 研究方向为生物与食品安全 E-mail: 6646227@qq.com

通信作者: 崔生辉 男 研究员 研究方向为生物与食品安全 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

transportation stability. Moreover, the stability of spontaneous revertant frequency in the ready-to-use freeze-dried standard strains surpasses that of fresh strains.

Key words: *Salmonella typhimurium*; standard strains; ready-to-use; freeze-dried

Ames 试验又称鼠伤寒沙门菌回复突变试验,是一种短期细菌反向突变实验,该实验是利用鼠伤寒沙门菌的组氨酸营养缺陷型突变株(his-)发生回复突变的性质,对化学物质致突变性进行初步筛选的短期体外试验方法^[1]。Ames 试验是目前国际公认的检测新药、食品添加剂、食品包装材料及化妆品等致突变性、致癌性的首选试验,多年来,它的价值得到了科学界和政府机构的认可,是多个国际组织认可的检测致突变性的标准方法^[2-5]。GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[6]和《化妆品安全技术规范》(2015 版)^[7]均使用此方法检测食品和化妆品的致突变性。

Ames 试验最常用的菌株有鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102,这些菌株是鼠伤寒沙门菌 LT2 的基因改造菌株^[8-9]。这类菌株是组氨酸缺陷型菌株,它们无法合成生长所需的组氨酸,因此在组氨酸不存在时不能生长并形成菌落^[10-11]。有极少数组氨酸营养缺陷型菌株在组氨酸缺乏情况下,突变位点或基因附近发生新突变使其恢复组氨酸合成基因功能,生长并形成菌落,称为自发回变。这些细胞可以在没有组氨酸的情况下生长并形成菌落,称为自发回变^[12]。进行 Ames 试验时,菌株的自发回变率必须符合标准规定范围,试验才能成立,而每次独立试验菌株的自发回变是随机的,因此控制菌株自发回变率是该实验的重点和难点。

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的重要特点是它们存在修复系统缺失,在传代的过程中容易被诱变,其中 TA102 的关键元件在质粒上,质粒在多次传代中容易丢失。实验菌株对 Ames 试验至关重要,但是因为这类菌株易被诱变且关键质粒易丢失的特性,实验前需要确认菌株的生物学特性,操作繁琐,试验周期长,且实验菌量未定量控制,因此每次独立实验中测试菌株的自发回变率波动大,实验失败率高。目前未发现国内外文献中有研究解决此类问题,为解决以上问题,本研究研制了鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的标准菌株,旨在规范实验菌株,通过控制实验菌液浓度来减少独立实验中自发回变率的波动,使其符合标准规定范围,从而提高实验成功率。

本研究通过比较两个冻干浓度(高浓度和低浓度)和 4 个增菌时间(3、5、7、18 h),确定了鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 标准物质的冻干浓

度和增菌时间。随机抽取鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 各 20 瓶冻干样品进行计数、测定自发回变率及阳性诱变剂的致突变率,评价即用型冻干菌株的均一性;比较了 20 株即用型冻干标准菌株和新鲜菌株的自发回变率及阳性诱变剂的致突变率;将冻干标准菌株放置于 25 °C、37 °C、4 °C 和 -20 °C 条件下,随机抽取各 3 瓶冻干样品进行计数、自发回变率和阳性诱变剂的致突变率来评价其运输和储存稳定性。

1 材料与方法

1.1 测试菌株

Ames 试验用鼠伤寒沙门菌 TA97(CMCC (B) 50942)、TA98(CMCC (B) 50943)、TA100(CMCC (B) 50944)、TA102(CMCC (B) 50945)均由中国医学细菌保藏管理中心提供。

1.2 主要仪器与试剂

PL2002 电子天平(梅特勒-托利多公司);MLS-3780 高压灭菌器(日本三洋公司);Thermo 1389 生物安全柜、PR 205050 GCN 生化培养箱(美国 THERMO 公司);EDDY JET1 F2ASH AN 全自动微生物螺旋加样系统(西班牙 IUL 公司);冷冻干燥机(HETO POWER DRYLL1500);BrukerAutoflex II 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS, 德国 Bruker 公司)。

L-组氨酸、D-生物素、辅酶-II、6-磷酸葡萄糖、2-氨基苄(纯度 98%)、甲基磺酸甲酯(纯度 99%)购自 Sigma 公司;大鼠肝匀浆(肝 S9)购自汇智泰康生物技术(北京)有限公司;磷酸氢二钠(分析纯, 99.0%)、磷酸二氢钠(分析纯, 99.0%)购自国药集团化学试剂有限公司;琼脂培养基购自美国 BD 公司;底层培养基、营养肉汤购自北京三药科技开发公司;生化鉴定试剂盒 API20E 购自生物梅里埃公司;DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。依据国标 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[6]方法配制 S9 混合液(磷酸盐缓冲液、镁钾溶液、葡萄糖 6 磷酸钠盐溶液、辅酶 II 溶液、肝 S9 组分)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株确认

依据操作说明,用生化鉴定试剂盒 API20E、

MALDI-TOF MS 对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 进行确认。依据 GB 15193.4—2014 进行组氨酸缺陷型(his-)、脂多糖屏障缺陷(raf)、R 因子(抗氨基青霉素)、四环素抗性、uvrB 修复缺陷特异性鉴定。

1.3.2 菌株冻干浓度

用无菌棉签取鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 平板新鲜二代培养物,使用 5% 蔗糖、-5% 脱脂乳粉冻干保护剂配置高浓度和低浓度菌悬液,高浓度菌液稀释 100 倍后,测定麦氏浊度为 1.0~1.5;低浓度菌液的麦氏浊度为 1.0~1.5,分别分装于高浓度菌悬液 200 μ L/瓶、低浓度菌液 20 μ L/瓶于西林瓶中,将高、低浓度菌液各取出 1 瓶用无菌生理盐水进行梯度稀释,采用 E50 模式螺旋涂布于 TSA 琼脂平板上,培养 24 h 后进行冻干前计数,其余置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻 2 h 后再置于冷冻干燥机中进行冻干,冻干时间约 16 h。高浓度和低浓度冻干菌各选取 3 瓶,用无菌生理盐水将冻干后样品溶解,梯度稀释后用采用 E50 模式螺旋涂布于 TSA 琼脂平板上,培养 24 h 后进行计数。

1.3.3 增菌时间的摸索

取低浓度的鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 冻干菌株各 5 瓶,加入 5 mL/管营养肉汤中,37 $^{\circ}$ C 培养 3、5、7、18 h,增菌后参照 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》进行自发回变率测定。根据检测结果,进一步取 4 株冻干菌株各 20 瓶,37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后进行自发回变率测定。

1.3.4 新鲜菌株及冻干菌株自发回变和阳性物测试比对

将鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 冻干菌株和平板新鲜二代培养物分别加入 5 mL/管营养肉汤中 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h,增菌后参照 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》进行自发回变率和阳性物测定,其中鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100 使用的阳性物为 2-氨基苄,鼠伤寒沙门菌 TA102 使用的阳性物为甲基磺酸甲酯。4 种菌平行检测冻干菌和新鲜菌各 20 份。使用 Excel 软件对分别计算 20 份冻干菌和新鲜菌

的自发回变率结果的标准偏差。

1.3.5 冻干菌株均匀性及稳定性测试

1.3.5.1 均匀性测定

从制备的冻干样品中随机抽取 20 瓶进行计数。用无菌生理盐水将冻干样品梯度稀释到合适浓度,充分振荡混匀后,E50 螺旋涂布于 TSA 琼脂平板,于 36 $^{\circ}$ C 培养 24 h 计数。参照 CNAS-GL003 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中“4.2”节下单因子方差分析(One Way ANOVA)的方法对样品的均匀性结果进行分析。

1.3.5.2 稳定性测定

将冻干菌株放置在 25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 条件下,分别于 3、5 d 后取出 3 个样品进行计数、自发回变率和诱变剂测定来评价样品的运输稳定性。将冻干菌株置于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存 14 d,-20 $^{\circ}$ C 条件保存 6 个月取出 3 个样品进行计数、自发回变率和诱变剂测定来评价样品的储存稳定性。根据 CNAS-GL003 中“5.3”节下 $|\bar{x}-\bar{y}| \leq 0.3\sigma$ 准则进行判定。式中 \bar{x} 为均匀性检验的总平均值; \bar{y} 为稳定性检验时对随机抽出样品的测量平均值; σ 为标准偏差目标值,根据以往的经验和本次样品中菌的含量将 σ 确定为 0.25,0.3 σ 值为 0.075。

2 结果

2.1 菌株确认结果

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 生化鉴定试剂盒 API20E、MALDI-TOF MS 鉴定结果与菌株种属一致,均为鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*)。5 种生物学特性鉴定结果见表 2。

2.2 冻干菌株浓度计数

高浓度冻干样品和低浓度冻干样品计数结果见表 2,高浓度样品计数结果 10^7 ~ 10^8 CFU/瓶,低浓度样品计数结果 10^5 ~ 10^6 CFU/瓶。高浓度和低浓度冻干菌株存活率见表 3,4 种高浓度冻干菌株的存活率为 6.85%~11.20%;4 种低浓度冻干菌存活率为 55.10%~64.30%。高浓度冻干菌株存在菌液贴壁现象,高浓度冻干存活率低于低浓度样品冻干存活率。

表 1 菌株生物学特性鉴定结果

Table 1 Identification results of biological characteristics of strain

菌株编号	菌株名称	组氨酸缺陷型(his-)	脂多糖屏障缺陷(raf)	R 因子(抗氨基青霉素)	uvrB 修复缺陷	抗四环素
CMCC (B) 50942	TA97	+	+	+	+	-
CMCC (B) 50943	TA98	+	+	+	+	-
CMCC (B) 50944	TA100	+	+	+	+	-
CMCC (B) 50945	TA102	+	+	+	-	+

注:+:阳性;-:阴性

表 2 高浓度和低浓度冻干菌株计数结果

Table 2 Count results of high concentration and low concentration lyophilized strain

序号	TA97/(CFU/瓶)		TA98/(CFU/瓶)		TA100/(CFU/瓶)		TA102/(CFU/瓶)	
1	3.30×10 ⁸	3.30×10 ⁸	1.05×10 ⁸	1.02×10 ⁸	4.10×10 ⁷	4.03×10 ⁷	2.53×10 ⁸	2.35×10 ⁸
2	3.80×10 ⁸	3.72×10 ⁸	6.43×10 ⁷	6.39×10 ⁷	4.11×10 ⁷	4.09×10 ⁷	2.15×10 ⁸	2.35×10 ⁸
3	1.85×10 ⁸	1.55×10 ⁸	7.01×10 ⁷	7.35×10 ⁷	3.32×10 ⁷	3.02×10 ⁷	2.53×10 ⁸	2.35×10 ⁸
4	6.52×10 ⁵	6.21×10 ⁵	7.36×10 ⁵	7.33×10 ⁵	1.20×10 ⁶	1.01×10 ⁶	5.33×10 ⁶	5.35×10 ⁶
5	6.43×10 ⁵	6.55×10 ⁵	6.99×10 ⁵	7.01×10 ⁵	1.04×10 ⁶	1.00×10 ⁶	5.20×10 ⁶	5.19×10 ⁶
6	6.76×10 ⁵	6.67×10 ⁵	7.20×10 ⁵	7.23×10 ⁵	1.03×10 ⁶	1.02×10 ⁶	5.35×10 ⁶	5.24×10 ⁶

注:序号 1-3 为高浓度冻干样品计数结果,序号 4-6 为低浓度冻干样品计数结果

表 3 高浓度和低浓度冻干菌株存活率

Table 3 Survival rate of lyophilized strains with high concentration and low concentration

菌株名称	高浓度冻干菌			低浓度冻干菌		
	冻干前计数/(CFU/瓶)	冻干后计数/(CFU/瓶)	存活率/%	冻干前计数(CFU/瓶)	冻干后计数(CFU/瓶)	存活率/%
TA97	3.85×10 ⁹	3.30×10 ⁸	8.57	9.90×10 ⁵	6.37×10 ⁵	64.30
TA98	1.51×10 ⁹	1.04×10 ⁸	6.85	1.30×10 ⁶	7.35×10 ⁵	56.30
TA100	4.00×10 ⁸	4.07×10 ⁷	10.20	2.01×10 ⁶	1.11×10 ⁶	55.10
TA102	2.19×10 ⁹	2.44×10 ⁸	11.20	8.65×10 ⁶	5.34×10 ⁶	61.70

2.3 增菌时间

增菌 3、5、7 h 后测定 4 个菌的自发回变率结果部分或全部低于标准范围(表 4),增菌 18 h 后自发回变率结果基本符合标准范围(表 5)。

表 4 4 种即用型冻干菌增菌 3、5、7 h 自发突变结果($n=10$)Table 4 Spontaneous mutation results of 4 kinds of ready-to-use freeze-dried bacteria increased at 3, 5 and 7 h ($n=10$)

增菌时间	自发回变均值±标准偏差(CFU)			
	TA97	TA98	TA100	TA102
3 h	91.2±16	21.1±7	56.5±3	206.5±14
5 h	114.0±26	35.5±8	78.2±8	210.2±16
7 h	149.5±19	32.0±5	92.0±34	293.9±14
Ames 实验室范围	90~180	30~50	120~200	240~320
Errol&Zeige 实验室范围	100~200	20~50	75~200	200~400

注:自发回变结果符合两个实验室中任意一个判定为符合

表 5 4 种即用型冻干菌增菌 18 h 自发突变结果($n=40$)Table 5 Spontaneous mutation results of 4 kinds of ready-to-use freeze-dried bacteria increased in 18 h ($n=40$)

	TA97	TA98	TA100	TA102
最小值	92	14	86	300
最大值	166	43	135	395
均值	136.85	24.10	114.30	344.08
标准偏差	19.68	5.40	10.83	26.70
Ames 实验室范围	90~180	30~50	120~200	240~320
Errol&Zeige 实验室范围	100~200	20~50	75~200	200~400

注:自发回变结果符合两个实验室中任意一个判定为符合

2.4 新鲜菌株与冻干菌株自发回变和阳性物诱变

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 冻干菌株和新鲜菌株的自发回变率测试结果见表 6。4 种冻干菌株的自发回变率均符合 GB 15193.4—2014 标准规定。新鲜菌株的自发回变率部分符合 GB 15193.4—2014 标准规定,20 份独立传代的新鲜菌,同时做两份平行,分加 S9 和不加 S9 两种情况,共计 80 个结果,其中在标准范围内的 TA97 有

86.25%(69/80)、TA98 有 72.50%(58/80)、TA100 有 61.25%(49/80)、TA102 有 100%(80/80)。4 株冻干菌株在加 S9 和不加 S9 两种情况下,自发回变率测定结果($n=40$,20 株菌×2 个平行)的标准偏差均小于新鲜菌株,冻干菌株的自发回变的结果更加稳定。

20 株冻干菌株和新鲜菌株阳性诱变剂(2-氨基芬和甲基磺酸甲酯)结果为阳性。

2.5 冻干菌株均匀性及稳定性测试计数结果

鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 即用型冻干菌均匀性计数结果见表 7,TA97、TA98、TA100、TA102 的均匀性计数结果对数值的均值 \bar{x} 分别为 5.841、5.835、6.037、6.726。 $F_{0.05}(19,20)$ 临界值为 2.14,根据 Excel 软件计算的结果,鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的 F 值分别为 1.12、1.05、1.68、1.38, $F < F_{0.05}(19,20)$,表明 4 个样品均符合均匀性的要求。

4 株冻干菌株运输及储存稳定性计数结果对数值均值(\bar{y})结果见表 8, $|\bar{x}-\bar{y}|$ 结果见表 9,式中 \bar{x} 为均匀性检验的总平均值; \bar{y} 为稳定性检验时对随机抽出样品的测量平均值;根据 CNAS-GL003 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南中“5.3”节下 $|\bar{x}-\bar{y}| \leq 0.3\sigma$ 准则进行判定, σ 为本次样品标准偏差的目标值,根据以往的能力验证经验和本次样品中的菌的含量将 σ 确定为 0.25,0.3 σ 值为 0.075。表 9 结果可见,TA97、TA98、TA100、TA102 即用型冻干标准菌株在 25 °C 放置 5 d、4 °C 放置 14 d、-20 °C 放置 6 个月条件下, $|\bar{x}-\bar{y}|$ 的值均小于 0.3 σ ,符合稳定性要求。4 株即用型冻干菌运输温度需低于 25 °C,建议 4 °C 运输,如长期保存,样品建议储存在 -20 °C 条件。

表6 即用型冻干菌和新鲜菌的自发回变测试及阳性物结果

Table 6 Spontaneous regression test and positive material results of ready-to-use freeze-dried bacteria and fresh bacteria

菌株		自发回变				Ames	Errol&Zeige	阳性物	
		最大值(n=40) ^a	最小值(n=40)	均值(n=40)	标准偏差(n=40)	实验室	实验室	均值(n=40)	标准偏差(n=40)
TA97	冻干菌(-S9)	161	108	138.2	10.54	90~180	100~200	—	—
	冻干菌(+S9)	199	154	178.5	10.31	—	75~200	1 372	87.5
	新鲜菌(-S9)	195	66	130.5	35.90	90~180	100~200	—	—
	新鲜菌(+S9)	178	66	116.1	33.93	—	75~200	1 314.8	140.1
TA98	冻干菌(-S9)	43	20	25.0	5.73	30~50	20~50	—	—
	冻干菌(+S9)	31	20	22.5	2.71	—	20~50	1 336.7	95.4
	新鲜菌(-S9)	47	8	31.5	8.98	30~50	20~50	—	—
	新鲜菌(+S9)	38	6	20.0	7.35	—	20~50	1 285.3	116.5
TA100	冻干菌(-S9)	126	78	97.6	14.04	120~200	75~200	—	—
	冻干菌(+S9)	128	80	99.2	11.81	—	75~200	1 440.8	134.5
	新鲜菌(-S9)	129	50	82.5	20.54	120~200	75~200	—	—
	新鲜菌(+S9)	108	28	73.4	22.10	—	75~200	1 357.3	143.7
TA102	冻干菌(-S9)	286	205	227.4	18.01	240~320	200~400	3 822.4	320.7
	新鲜菌(-S9)	421	278	357.4	43.18	240~320	200~400	3 114.5	835.5

注:^a:n=20株菌×2个平行=40;Ames实验室没有规定加S9的自发回变范围;自发回变结果符合两个实验室中任意一个判定为符合;“—”表示标准中没有规定,或是无须

四株菌运输及储存稳定性自发回变和诱变剂测试在 37 °C 5 d、25 °C 5 d、4 °C 14 d 和 -20 °C 6 个月储存条件下,自发回变率测定结果均符合 GB 15193. 4—2014 标准规定,诱变剂突变结果均为阳性。

表7 即用型冻干菌均匀性计数结果

Table 7 Uniformity count results of ready-to-use freeze-dried bacteria

	TA97	TA98	TA100	TA102
最大值(n=40) ^a	7.12×10 ⁵	7.50×10 ⁵	1.26×10 ⁶	5.44×10 ⁶
最小值(n=40)	6.00×10 ⁵	6.98×10 ⁵	9.92×10 ⁵	5.19×10 ⁶
均值 \bar{x} (n=40)	6.55×10 ⁵	7.06×10 ⁵	1.10×10 ⁶	5.30×10 ⁶
对数均值(n=40)	5.82	5.83	6.04	6.73
F值	1.12	1.05	1.68	1.38

注:^a:n=20株菌×2个平行=40

表8 即用型冻干菌运输及储存稳定性计数结果对数值均值(\bar{y}^*)

Table 8 Mean value of transport and storage stability of ready-to-use freeze-dried bacteria (\bar{y}^*)

标准菌株	运输稳定性测试结果对数值				储存稳定性测试结果对数值	
	37 °C 3 d	37 °C 5 d	25 °C 3 d	25 °C 5 d	4 °C 14 d	-20 °C 6月
TA97	5.759	5.786	6.721	6.729	5.860	5.848
TA98	5.619	5.276	5.823	5.829	6.013	6.080
TA100	5.578	4.828	5.989	5.994	6.673	6.696
TA102	5.759	5.786	6.721	6.729	5.860	5.848

注:*, \bar{y} 为3个菌球计数结果的均值

表9 四株菌 | $\bar{x}-\bar{y}$ | *结果

Table 9 Four strains of bacteria | $\bar{x}-\bar{y}$ | results

储存条件	TA97	TA98	TA100	TA102
37 °C 3 d	0.316	0.216	0.457	0.966
37 °C 5 d	0.591	0.559	1.207	1.356
25 °C 3 d	0.067	0.015	0.048	0.005
25 °C 5 d	0.064	0.005	0.043	0.003
4 °C 14 d	0.071	0.005	0.017	0.066
-20 °C 6月	0.021	0.005	0.033	0.036

注:*,均匀性测定结果的均值为 \bar{x} ,稳定性测定结果的均值为 \bar{y}

表10 协作标定自发回变结果

Table 10 Spontaneous regression results of collaborative calibration

协作标定单位	菌株	加S9	不加S9
单位A	TA97	134~179	105~143
	TA98	17~27	16~24
	TA100	114~164	126~192
	TA102	317~390	367~392
单位B	TA97	160~180	140~170
	TA98	10~60	10~40
	TA100	90~110	110~130
	TA102	—	390~420
单位C	TA97	159~169	140~143
	TA98	21~29	20~24
	TA100	137~138	122~156
	TA102	267~284	241~248

2.5 冻干菌株协作标定结果

3家实验室测定的结果,自发回变数测定结果符合 GB 15193. 4—2014 标准及《化妆品安全技术规范》(2015 版)要求,自发回变结果见表 10,诱变剂结果均为阳性结果。

3 结论

本研究尝试冻干高浓度标准物质和低浓度标准物质,结果显示高浓度标准样品浓度为 $10^7\sim 10^8$ CFU/样品,低浓度标准样品浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/样品。高浓度冻干样品浓度未达到 GB 15193.4—2014 中要求的试验浓度 (5×10^9 CFU/瓶),不能直接用于 Ames 测试,且冻干体积较大,冻干后存在菌液贴壁现象,冻干存活率较低浓度样品冻干存活率低,故选择冻干标准样品浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/样品,增菌后进行实验。比较了 3、5、7、18 h 4 个增菌时间,结果显示增菌 3、5、7 h 后自发回变率结果偏低,增菌 18 h 后自发回变率结果基本符合标准要求。综上,确定了鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 标准物质的冻干浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/样品、增菌时间为 18 h。

本研究对 20 株即用型冻干菌株和 20 株新鲜菌株自发回变率结果进行了比较,发现使用冻干菌株测定的自发回变率结果标准偏差小,自发回变率波动小。4 种鼠伤寒沙门菌即用型冻干标准菌株自发回变率的稳定性明显优于新鲜菌株。使用新鲜菌株进行 Ames 试验时,常出现自发回变没有控制在标准规定范围而导致实验失败的情况,查阅国内外文献,未发现有解决此类问题的研究。GB 15193.4—2014 和《化妆品安全技术规范》(2015 版)中要求将测试菌株在平板上传代后,取一环进行增菌后使用,未对实验菌定量控制。在 Ames 实验中,控制自发回变率波动的关键在于控制实验过程中自发回变菌株的数量,本研究通过冻干定量的标准菌株,控制增菌时间,减少实验中自发回变率波动。

即用型冻干菌株的均匀性、稳定性验证结果可见,四个样品的均匀性符合 CNAS-GL003 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中的要求。4 种菌株的冻干样品在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 5 d、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 14 d、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 6 个月的条件下,稳定性良好。鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 即用型冻干菌株均一性良好,该样品的运输温度需要低于 $25\text{ }^\circ\text{C}$,该样品如需长期保存,应放置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下。选择了三家有 Ames 试验检验资质的机构进行协作标定,结果符合要求。

本研究研制的鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 即用型冻干标准物质,菌株易于获取,存放方便。该标准物质为即用型冻干菌株,实验时无须传代复苏,无须进行生物学特征确认,自发回变波动小,均一性、运输稳定性和储存稳定性

良好。使用即用型冻干样品进行 Ames 试验,可以简化且规范实验操作,降低实验难度,缩短实验周期,提高实验成功率。

参考文献

- [1] MORTELMANS K, ZEIGER E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay [J]. Mutation Research, 2000, 455 (1-2): 29-60.
- [2] MCCANN J, CHOI E, YAMASAKI E, et al. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72 (12): 5135-5139.
- [3] SUGIMURA T, SATO S, NAGAO M, et al. Overlapping of carcinogens and mutagens [J]. Fundamentals in Cancer Prevention, 1976: 191-215.
- [4] ZEIGER E. The *Salmonella* mutagenicity assay for identification of presumptive carcinogens [J]. Handbook of Carcinogen Testing, 1985: 83-99.
- [5] ZEIGER E, HASEMAN J K, SHELBY M D, et al. Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals [J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1990, 16(S18): 1-14.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard- Ames test: GB 15193.4—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [7] 国家药品监督管理局.《化妆品安全技术规范》(2015 版)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
National Medical Products Administration. Safety Technical Specifications for Cosmetics (2015 Edition)[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [8] ME C P. The evaluation of the mutagenic activity of public drinking water by the Ames test [J]. Revista Espanola de Salud Publica, 1995, 69(5): 393-408.
- [9] BLECVINS R D, LEE M, REGAN J D. Mutagenicity screening of five methyl carbamate insecticides and their nitroso derivatives using mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 [J]. Mutation Research, 1977, 56(1): 1-6.
- [10] ZEIGER E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals [J]. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2019, 841: 43-48.
- [11] KAMBER M, FLÜCKIGER-ISLER S, ENGELHARDT G, et al. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. Mutagenesis, 2009, 24(4): 359-366.
- [12] VIJAY U, GUPTA S, MATHUR P, et al. Microbial mutagenicity assay: Ames test [J]. Bio-protocol, 2018, 8(6): e2763.