

微型细菌回复突变试验方法的建立及验证

任 萌^{1,2}, 张建军^{1,2}, 王春雨^{1,2}, 张海娇^{1,2}, 刘 妍^{1,2*}, 申秀萍^{1,2*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: **目的** 建立高通量评价药物遗传毒性的微型细菌回复突变(Ames)试验。**方法** 采用平皿掺入法进行标准 Ames 试验, 采用 6 孔板掺入法进行微型 Ames 试验, 两试验均设置阴性对照组和阳性对照组, 2 组又分别分为代谢活化和非活化 2 个亚组, 各组培养基中分别加入菌液(鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型菌株: TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535), 活化组加大鼠肝微粒体酶(S9)混合液, 阳性对照组再加入阳性诱变剂: Dexon (-S9), 应用于 TA97、TA98 和 TA102; NaN₃ (-S9), 应用于 TA100 和 TA1535; 2-AA (+S9), 应用于 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535。凝固后 37 °C 温箱培养约 48 h, 计数各组回变菌落数。**结果** 在标准 Ames 试验中, 阴性对照组各个菌株回变菌落数均在本实验室自发回变菌落数正常值范围内。在两试验中, 阳性对照组所诱导的回变菌落数均是阴性对照组的 2 倍以上, 标准试验细菌回变菌落数约为微型试验的 5 倍。**结论** 在 6 孔板上进行微型细菌回复突变试验, 大大减少了受试物的用量, 提高了筛选速度。本实验室建立的微型细菌回复突变试验背景数据, 用于遗传毒理的检测是高效可靠的。

关键词: 微型细菌回复突变试验; 高通量筛选; 遗传毒性; 建立; 验证

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)08-1395-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.006

Establishment and verification on mini-Ames test

REN Meng, ZHANG Jianjun, WANG Chunyu, ZHANG Haijiao, LIU Yan, SHEN Xiuping

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co., Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To establish the method of bacterial reverse-mutation test for high throughput evaluation of drug genotoxicity. **Methods** The standard Ames test was carried out by the method of plate with incorporation, and the mini-Ames test was performed using 6-well micro plates with incorporation. We established the negative control group and positive control group with metabolic activation or not. The bacteria solution (TA97, TA98, TA100, TA102, and TA1535) was added to the medium respectively. Rat liver microsomal enzyme (S9) mixture was added to the activation group, and the positive control group was added with the positive mutagens: Dexon (-S9) applied to TA97, TA98, and TA102, NaN₃ (-S9) applied to TA100 and TA1535, and 2-AA (+S9) applied to TA97, TA98, TA100, TA102, and TA1535. After incubated, culture plates incubated at 37 °C for about 48 h, counting the number of colonies in each group. **Results** In the standard Ames test, the number of bacterial colonies in the negative control group was all within the normal range of spontaneous colonies in the laboratory. The number of colonies induced by the positive control group was over two times than that of the negative control group. And the number of colonies in classical test was about five times than that of the mini-Ames. **Conclusion** The mini-Ames test on 6-well micro plates greatly reduced the dosage of the subject matter and improved the screening speed. The background data of mini-Ames test had been established in our laboratory and this test was highly effective and reliable for the detection of genetic toxicology.

Key words: mini-Ames test; high throughput screening; inherent toxicity; establishment; validation

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 任 萌(1991—), 主要从事药理毒理学研究 E-mail: renm@tjipr.com

*通信作者: 刘 妍, 主要从事药理毒理学研究 E-mail: liuy8@tjipr.com

申秀萍, 主要从事临床前安全性评价研究 E-mail: shenxp@tjipr.com

细菌回复突变试验(Ames)是国际人用药品注册技术协调会(ICH)推荐的标准遗传毒性试验组合中必不可少的一项体外试验^[1],可以灵敏的检测出由DNA损伤引起的基因突变,在新药研发的早期阶段占有重要的地位^[2]。

因为新药研发初期需要合成多种先导化合物且每种化合物的产量往往很低,所以需要改缩小Ames试验规模以适应高通量低耗费的研发需求^[3]。目前在药物筛选初期常用的微型Ames试验主要有Mini-Ames试验、Micro-Ames试验和Ames II试验^[4]。Mini-Ames试验通常使用6孔板,所用试剂的量约是Ames试验的1/5^[5];Micro-Ames试验通常使用24孔板,所用试剂的量约是Ames试验的1/20^[6];Ames II试验采用384孔板,所用试剂的量约是Ames试验的1/160^[7]。本研究旨在建立6孔板中的微型Ames试验,获得可靠的背景数据,为本实验室高通量筛选新药奠定数据和技术基础。

1 材料

1.1 耗材

6孔板(Nest);玻璃培养皿(北京玻璃仪器厂);玻璃试管(北京玻璃仪器厂)。

1.2 菌株

鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型菌株:TA97、TA98、TA100、TA102(天津市疾病预防控制中心馈赠)、TA1535(ATCC),-80℃冰箱保存。

1.3 主要试剂

琼脂粉、营养肉汤培养基(北京三药科技开发公司);葡萄糖(天津风帆化学试剂有限公司);L-组氨酸盐酸盐(Sigma);D-生物素(Amresco);氧化性辅酶II(NADP, Amresco);D-葡萄糖-6-磷酸钠盐(G-6-P, Sigma);磷酸氢钠胺(Sigma);氨苄青霉素(Amresco);四环素(Amresco)。

阳性诱变剂:敌克松(Dexon,南开大学馈赠);2-氨基蒽(2-AA, TCI);叠氮钠(NaN_3 , Amresco)。

1.4 代谢活化系统

大鼠肝微粒体酶(S9):雄性SD大鼠经苯巴比妥和 β -萘黄酮联合诱导的肝匀浆,无菌检测和代谢活化特性检测符合实验要求。

1.5 主要仪器

恒温培养箱(SANYO);恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司);全温振荡培养箱(金坛市精达仪器制造有限公司);高压蒸汽灭菌器(ALP);电子天平(Mettler Toledo);超净工作台(无锡易统

净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 菌株复苏和主板制备

配制含组氨酸-生物素、氨苄青霉素和四环素的3种底层培养基,分别倾倒入平皿中,约25 mL/皿。凝固后倒置放于37℃培养箱过夜以检查平板无菌。将5种菌株(TA97、TA98、TA100、TA102和TA1535)室温融化,根据不同菌株的特点划线接种于不同主板上(TA97、TA98、和TA100接种于氨苄青霉素平板,TA102接种于四环素平板,TA1535接种于组氨酸-生物素平板)。37℃培养主板48 h后于2~8℃冰箱保存备用。

从主板上分别选取3~5个单菌落接种于10 mL营养肉汤培养基增菌液中,于37℃恒温培养箱中振荡培养约10 h(120 r/min)。试验前对以上各菌株进行如下鉴定:组氨酸缺陷鉴定(His-)、四环素抗性鉴定(PAQ1)、氨苄青霉素抗性鉴定(pKM101)、脂多糖屏障缺陷鉴定(rfa)、紫外线修复缺陷鉴定(uvrB)、自发回变数鉴定,经鉴定各菌株均符合相关要求。

2.2 组别设置

标准Ames试验:设置阴性对照组和阳性对照组,2组又分别分为活化(+S9)和非活化(-S9)2个亚组。阳性对照组诱变剂分别为Dexon(-S9):50 $\mu\text{g}/\text{皿}$,应用于TA97、TA98和TA102; NaN_3 (-S9):1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$,应用于TA100和TA1535;2-AA(+S9):5 $\mu\text{g}/\text{皿}$,应用于TA97、TA98、TA100、TA102和TA1535。

微型Ames试验:组别设置同“标准Ames试验”。阳性诱变剂剂量分别为Dexon(-S9):10 $\mu\text{g}/\text{孔}$,应用于TA97、TA98和TA102; NaN_3 (-S9):0.3 $\mu\text{g}/\text{孔}$,应用于TA100和TA1535;2-AA(+S9):1 $\mu\text{g}/\text{孔}$,应用于TA97、TA98、TA100、TA102和TA1535。

2.3 试验方法

同时进行标准Ames试验和微型Ames试验2次,将两个试验过程和数据进行对比。再重复微型Ames试验8次,建立稳定的背景数据。

标准Ames试验:采用平皿掺入法,各亚组均平行做3个平皿,底层培养基约25 mL/皿。在含有2 mL顶层培养基的试管中,加入菌液0.1 mL,活化组加0.5 mL S9混合液,阳性对照组再加入阳性诱变剂0.1 mL,以上混匀后,倒入底层培养基中,

凝固后于 37 °C 温箱培养约 48 h, 计数各组回变菌落数。

微型 Ames 试验: 采用 6 孔板掺入法, 各亚组均做 3 个平行复孔。底层培养基为 5 mL/孔, 在含有 1.6 mL 顶层培养基的试管中, 加入菌液 80 μ L, 代谢活化组加入 0.4 mL S9 混合液, 阳性对照组再加入阳性诱变剂 80 μ L, 以上混匀后, 每孔加入 540 μ L 混合液, 凝固后于 37 °C 温箱培养约 48 h, 计数各组的回变菌落数。

2.4 数据处理

回复突变菌落数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 当阳性对照组回变菌落数是阴性对照组回变菌落数的 2 倍或 2 倍以上时, 且实验数据在本实验室背景数据范围内, 判定为实验结果有效。

3 结果

如果受试菌株的自发回变菌落数在本实验室自发回变菌落数正常值范围 (表 1) 内, 或偏离较小 ($\leq 10\%$), 可认为数据有效; 如果回变菌落数与上述范围偏离较大 ($> 10\%$), 需进行重复试验, 直至符合数据有效性要求。

如表 2 所示, 在标准 Ames 试验中, 阴性对照组各个菌株回变菌落数均在本实验室自发回变菌落数正常值范围内, 与阴性对照组比较, 阳性对照组各个菌株回变菌落数均超过 2 倍, 数据有效。如表 3 所示, 在微型 Ames 试验中, 与阴性对照组比较, 阳性对照组各个菌株回变菌落数均超过 2 倍, 试验检测方法成立, 标准 Ames 试验细菌回变菌落数约为微型试验细菌回变菌落数的 5 倍, 在本实验室建立了微型细菌回复突变试验背景数据。

表 1 本实验室自发回变菌落数正常值范围*

Table 1 Normal value range of revertant colonies in our laboratory

菌株	自发回变菌落数	
	-S9	+S9
TA97	97~188	113~199
TA98	15~39	20~48
TA100	95~193	99~195
TA102	202~282	213~325
TA1535	5~26	6~34

*: 正常值范围=均数 $\pm 1.96 \times$ 标准差

*: Normal range = mean number $\pm 1.96 \times$ standard deviation

表 2 标准 Ames 试验的回变菌落数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Revertant colonies of classical Ames test ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
阴性对照	144 $\pm$ 15	131 $\pm$ 20	37 $\pm$ 6	40 $\pm$ 6	156 $\pm$ 16	174 $\pm$ 9	200 $\pm$ 8	231 $\pm$ 15	11 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3
阳性对照	4 645 $\pm$ 365	4 975 $\pm$ 301	1 192 $\pm$ 92	4 840 $\pm$ 356	532 $\pm$ 67	4 721 $\pm$ 388	879 $\pm$ 203	718 $\pm$ 106	266 $\pm$ 34	272 $\pm$ 32

表 3 微型 Ames 试验的回变菌落数 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 3 Revertant colonies of mini-Ames test ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
阴性对照	25 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4	33 $\pm$ 4	36 $\pm$ 6	43 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
阳性对照	945 $\pm$ 89	996 $\pm$ 77	239 $\pm$ 61	973 $\pm$ 53	122 $\pm$ 34	921 $\pm$ 82	185 $\pm$ 38	163 $\pm$ 41	57 $\pm$ 11	61 $\pm$ 19

4 讨论

随着国际医药领域市场需求增加, 新药研发如火如荼^[8]。标准 Ames 试验在临床前新药安全评价中有重要意义, 但用在评价种类繁多的先导化合物时, 则产生巨大的工作量^[3]。因此需要毒理研究者开发出一种可用于筛选稳定致突变性的微型 Ames 试验, 既需要少量受试物又允许在同一个试验中评价多种类的受试物。为了与 Ames 试验保持一致, 6 孔板中的微型 Ames 试验使用相同的菌株和试验方

法, 但所有试剂的量都减少了 80%^[5]。该试验方法只需要 300 μ g 受试物即可评估其潜在的诱变性, 并且一批次试验可以评估 3 种受试物^[9]。但有报道, 微型 Ames 试验正因为所用试剂量和菌量都比 Ames 试验低, 相当于把 Ames 试验结果局部放大来评判^[10], 评估遗传毒性灵敏度要低于 Ames 试验^[11], Ames 试验仍是标准遗传毒性试验组合中必不可少的一项体外试验^[12]。综上, 对于药物早期研发阶段的高通量筛选工作, 建立微型 Ames 试验背景数据

是很有必要的。

参考文献

- [1] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use [S]. 2011.
- [2] 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
- [3] Flamand N, Meunier J R, Meunier P A, et al. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(2): 105.
- [4] Doolittle D J, Lee D A, Rahn C A. The use of rat urine extracted on XAD-2 resin and assayed in a microsuspension-modified Ames test as an *in vivo* indicator of genotoxic exposure [J]. *Mutat Res*, 1988, 206(2):141-148.
- [5] Jger I, Hafner C. Miniaturized standard Ames test for the evaluation of textile dyes [J]. *Melliand China*, 2011, (5): 44-47.
- [6] Proudlock R, Evans K. The micro-Ames test: A direct comparison of the performance and sensitivities of the standard and 24-well plate versions of the bacterial mutation test: Micro-Ames Test [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(9): 687-705.
- [7] Tchounwou P B, Ishaque A B, Schneider J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222(1/2): 21-28.
- [8] 王永健. 我国医药企业处方药营销研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [9] Tanifuji H, Nagasaki S, Hisada S. Genotoxicity screening on an early phase of drug development using Ames miniscreen assay and *in vitro* micronucleus test (MUTAGENICITY) (GENERAL SESSION BY POSTER PRESENTATION) (Proceedings of the 30th Annual Meeting) [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 254-255.
- [10] Reid J E S J, Sullivan N, Swift L, et al. Assessing the mutagenicity of protic ionic liquids using the mini Ames test [J]. *Sustainable Chem Processes*, 2015, 3(1): 17.
- [11] Miyata N, Aoki T, Shimada C, et al. Comparison of sensitivity between the miniscreen and standard Ames assays using Ames-positive compounds from in-house data(Mutagenicity, Proceedings of the 32nd Annual Meeting) [J]. *J Toxicological Sci*, 2005, 30: S154.
- [12] 周长慧, 常 艳, 林海霞, 等. 遗传毒性标准试验组合结果分析的最新进展 [J]. *中国新药杂志*, 2010, (17): 1512-1516.