

## 遗传毒性评价 Ames 试验方法的比较分析

高梅<sup>1,2</sup>, 曹冲<sup>1</sup>, 王功霞<sup>1</sup>, 马会<sup>1</sup>, 英永<sup>1\*</sup>

1. 山东省药科学院 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101

2. 山东师范大学 生命科学学院 山东省动物抗性生物学重点实验室, 山东 济南 250014

**摘要:** Ames 试验是一项体外致突变性试验, 被广泛用于药物、食品、化学品和农药的遗传毒性检测, 以评价受试物致突变的可能性。药物、食品、化学品和农药的指导原则和国家标准中 Ames 试验方法不尽相同, 就这几者 Ames 试验方法的主要异同点进行比较分析, 以期能熟练掌握 Ames 试验实施要点, 更加规范实施检测工作, 不断提高试验质量。

**关键词:** Ames 试验; 药物; 食品; 化学品; 农药

**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 03-0672-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.031

## Comparison and analysis of Ames test for genotoxicity evaluation

GAO Mei<sup>1,2</sup>, CAO Chong<sup>1</sup>, WANG Gongxia<sup>1</sup>, MA Hui<sup>1</sup>, YING Yong<sup>1</sup>

1. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China

2. Shandong Normal University, College of Life Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Resistance Biology, Jinan 250014, China

**Abstract:** Ames test is a mutagenicity test *in vitro*, which is widely used in the detection of genotoxicity of drugs, food, chemicals and pesticides to evaluate the possibility of mutagenicity of test substance. The guiding principles and national standards of Ames test on drugs, food, chemicals and pesticides are different. In this paper, the main similarities and differences were compared and analyzed in order to master the key points of Ames test implementation, so we can implement the testing work standardly and improve the test quality constantly.

**Key words:** Ames test; drugs; food; chemicals; pesticides

细菌回复突变试验又称 Ames 试验, 是一项检测基因突变的体外致突变性试验, 以评价受试物致突变的可能性。Ames 试验周期短、方法相对简单、结果直观明了, 被广泛用于药物、食品、化学品和农药的遗传毒性检测。《药物遗传毒性研究技术指导原则》(2018 年)<sup>[1]</sup>、GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》<sup>[2]</sup>、GB/T 21786—2008《化学品 细菌回复突变试验方法》<sup>[3]</sup>、GBZ/T 240.8—2011《化学品毒理学评价程序和试验方法 第 8 部分: 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验》<sup>[4]</sup>、GB/T 15670.14—2017《农药登记毒理学试验方法 第 14 部分: 细菌回复突变试验》<sup>[5]</sup>(以下简称食品、化学品、农药 Ames 试验标准)中, 都有对 Ames 试验的介

绍, 但试验方法不尽相同, 本文根据现行的指导原则和国家标准, 对 Ames 试验方法的主要异同点进行比较分析, 以便研究人员熟练掌握 Ames 试验实施要点, 制定出在实际工作中可行的标准操作规程或作业指导书等, 更加规范地实施检测工作, 提高试验质量。

### 1 试验菌株

《药物遗传毒性研究技术指导原则》和食品、化学品 Ames 试验标准推荐的菌株组合均为 5 种: (1) 鼠伤寒沙门氏菌 TA98; (2) 鼠伤寒沙门氏菌 TA100; (3) 鼠伤寒沙门氏菌 TA1535; (4) 鼠伤寒沙门氏菌 TA1537 或 TA97 或 TA97a; (5) 鼠伤寒沙门氏菌 TA102 或大肠埃希杆菌 WP2 *uvrA* 或大肠埃希杆

收稿日期: 2020-06-02

基金项目: 山东省创新公共服务平台项目(2015CXPT00001)

第一作者: 高梅(1983—), 女, 副主任药师, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: gaomei729@163.com

\*通信作者: 英永(1980—), 男, 副主任药师, 研究方向为药物安全性评价。

菌 WP2 uvrA(pKM101)。农药 Ames 试验标准推荐使用鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 作为 4 株标准测试菌株,必要时可增加 TA1535、TA1537、TA97a、大肠杆菌 WP2 uvrA 或大肠杆菌 WP2 uvrA(pKM101)任一菌株,也可采用上述的菌株组合。

## 2 菌株鉴定

### 2.1 鉴定项目

《药物遗传毒性研究技术指导原则》(2018 年)规定菌株特性鉴定需符合要求,对鉴定项目未详细规定。食品、化学品、农药细菌回复突变试验方法则规定需对菌株进行组氨酸缺陷型(his<sup>-</sup>)的鉴定、脂多糖屏障缺陷(rfa)的鉴定、uvrB 修复缺陷型的鉴定、R 因子(抗氨基青霉素)的鉴定、四环素抗性的鉴定、生物素缺陷型(bio<sup>-</sup>)的鉴定、自发回变率的测定,并且对鉴定频次、鉴定方法也有详细介绍。此外,食品、化学品还规定对菌株进行阳性致突变物敏感性的鉴定,农药则未规定。

### 2.2 鉴定频次

《药物遗传毒性研究技术指导原则》(2018 年)未提及菌株鉴定的频次。食品 Ames 试验标准规定每 3 个月进行一次菌株鉴定,遇到下列情况也应进行菌株鉴定:在收到培养菌株后;当制备一套新的冷冻保存或冰冻干燥菌株时;重新挑选菌株时;使用主平板传代时。化学品规定新获得的或长期保存的菌种,在试验前必须进行菌株鉴定。农药 Ames 试验标准则规定,下列情况应进行菌株鉴定:在收到培养菌株后;当制备一套新的冷冻保存或冰冻干燥菌株时;当每皿自发回变数不在正常范围时;当对标准诱变剂丧失敏感性时;初次投入使用前。

虽然食品、化学品、农药对菌株的鉴定频次不尽相同,但目的都是为保证试验时菌株特性符合要求。

### 2.3 鉴定方法

食品、化学品、农药菌株鉴定项目试验方法大致相同,在以下 2 个项目存在差别。

**2.3.1 his<sup>-</sup>的鉴定** 食品、化学品、农药 Ames 试验标准对菌株 his<sup>-</sup>的鉴定方法及判定标准相同,均是取菌液分别划线接种于含组氨酸和不含组氨酸的培养基平皿上,菌株在含组氨酸培养基平板表面上生长,可长出一条菌膜,而在无组氨酸培养基平皿上则不能生长或仅有少量增长,除自发回变菌落外无菌膜。不同的是,食品、农药要求 37 °C 培养 48 h,

化学品则 37 °C 培养 24 h。

**2.3.2 rfa 的鉴定** 食品、农药对 rfa 的鉴定方法是,加热融化营养肉汤琼脂培养基。取菌液 0.1 mL 移入平板,迅速将营养肉汤琼脂培养基(50 °C 左右)适量倒入平皿,混匀,平放凝固。将无菌滤纸片 1 片放入已凝固的培养基平皿中央,在滤纸片上滴加 0.1% 结晶紫溶液 10 μL,37 °C 培养 24 h。

化学品对菌株 rfa 的鉴定方法是,取 0.1 mL 增菌液加到 2 mL 45 °C 已融化的顶层琼脂中,摇匀后倒在营养肉汤的底层琼脂培养基上,待琼脂凝固后,在平皿中央放一直径为 6 mm 的圆滤纸,然后将 1 mg/mL 结晶紫溶液 10 μL 滴在滤纸上,37 °C 培养 24 h。

三者虽然鉴定方法不同,但是判定标准相同,都是观察待测菌株在滤纸片周围能否出现 1 个透明的抑制圈,若有则说明该菌株具有 rfa 突变。

## 3 活化系统

药物、化学品 Ames 试验标准中,S9 在 S9 混合液中的浓度一般为 5%~30%;食品 Ames 试验标准中,S9 可在 4%~30% 中确定最适用量;农药 Ames 试验标准则直接规定 S9 浓度为 10%。

## 4 培养基和试剂

《药物遗传毒性研究技术指导原则》中未说明 Ames 试验中各种试剂的配制方法。食品、化学品、农药 Ames 试验标准中对营养肉汤培养基、营养肉汤琼脂培养基、底层培养基、顶层培养基、S9 混合液、菌株鉴定所需试剂等配制方法均进行了详细介绍。其中,食品和农药中各种试剂配制方法、各成分的最终浓度或含量基本相同,不同的是食品中辅酶-II(氧化型)溶液和葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液要求现用现配,农药中则可-20 °C 以下低温保存。

## 5 剂量设计

药物、食品、化学品、农药 Ames 试验标准中对最高测试浓度和剂量的选择上是一致的,均规定至少应选用 5 个可用于结果分析的浓度,最高测试浓度为 5 mg/皿或 5 μL/皿,分别在加和不加 S9 的条件下进行试验,每个剂量 3 个平皿。对于最高剂量下的其他剂量的设定,《药物遗传毒性研究技术指导原则》中未提及;食品中规定按等比组距的原则设立剂量间隔,推荐采用  $\sqrt{10}$  倍组距;化学品中剂量间隔一般为半对数(如  $\sqrt{10}$ ),也可采用更小的剂量间隔;农药中则规定剂量可按 0.5~5 000.0 μg/皿设定,也可根据预试验结果按等比组距设定。《药物遗传毒性研究技术指导原则》中,中药、天然物试验

时,可根据具体情况进行合理设计;食品、化学品、农药 Ames 试验标准中,评价含有潜在致突变杂质的受试物时,试验剂量可高于 5 mg/皿或 5  $\mu$ L/皿,食品最低剂量不低于 0.2  $\mu$ g/皿,农药最低剂量可考虑为 0.1  $\mu$ g/皿。

## 6 溶媒

《药物遗传毒性研究技术指导原则》(2018年)未提及溶媒的选择原则。食品、化学品、农药对溶媒的选择原则是一样的,溶媒应不与受试物发生反应,对所选菌株和 S9 没有毒性,没有诱变性。首选蒸馏水,对于不溶于水的受试物可选择其他溶媒,首选 DMSO。但对 DMSO 的用量,食品规定每皿最高添加量不超过 0.1 mL,农药则规定不得超过 0.4 mL,化学品未规定。

## 7 对照组设定

药物、食品、化学品、农药 Ames 试验标准中,都规定溶媒对照和阳性对照是必须设立的。食品还规定,未处理对照组(空白对照组)也必须设定,化学品、农药中,如果历史资料证实所选择的溶剂无毒性或无致突变作用,空白对照组非必须设立。

## 8 试验方法

《药物遗传毒性研究技术指导原则》规定试验可采用标准平板掺入法或预培养法,受试物处理后 48~72 h 观察结果;食品 Ames 试验标准中,试验方法有平板掺入法、预培养平板掺入法(培养 48~72 h 观察结果)、点试法(培养 48 h 观察结果);化学品可采用平板掺入法或预孵育法,培养 48~72 h;农药试验方法有平板掺入法、预培养平板掺入法、点试法,均培养 48 h 观察结果。

## 9 重复试验

2007 版的《药物遗传毒性研究技术指导原则》规定试验需重复 1 次,2018 版的指导原则未提及。GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》、GB/T 15670.14—2017《农药登记毒理学试验方法 第 14 部分:细菌回复突变试验》、GB/T 21786—2008《化学品 细菌回复突变试验方法》规定,明显的阳性结果不需要进行验证,可疑的结果要改用其他的方法进行验证,阴性结果需要验证。《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》中,阴性结果验证应改变试验的条件;《农药登记毒理学试验方法 第 14 部分:细菌回复突变试验》《化学品 细菌回复突变试验方法》中,如阴性结果无需进行验证,应说明理由;GBZ/T 240.8—2011《化学品毒理学评价程序和试验方法 第 8 部分:鼠伤寒沙门氏菌回复

突变试验》则规定,试验至少重复 1 次。

## 10 结果判定

《药物遗传毒性研究技术指导原则》(2018年)、《化学品 细菌回复突变试验方法》中,受试样品经 5 个试验菌株检测后,至少在 1 个菌株上,在有或无代谢活化的情况下,受试物所诱发的回复突变菌落数出现浓度相关性的增加和(或)在一个或多个浓度组上出现可重复性的增加,可判定为阳性结果。结果判定时应首先考虑试验结果的生物学意义,统计方法有助于结果的评价。《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》中,对掺入法结果的评价是,测试菌株 TA1535、TA1537、TA98 和大肠杆菌的回变菌落数等于或大于未处理对照组的 2 倍,其他测试菌株的回变菌落数等于或大于未处理对照组的 2 倍并具有以下两种情况之一的可判定为阳性结果:有剂量-反应关系;某一测试点有可重复的阳性结果。《农药登记毒理学试验方法 第 14 部分:细菌回复突变试验》中,测试菌株 TA1535、TA1537 及大肠杆菌的受试物组回变菌落数等于或大于阴性对照组的平均数值的 3 倍,其他测试菌株的受试物组回变菌落数等于或大于 2 倍阴性对照组回变菌落数,并有剂量-反应关系,可判定为阳性结果;若某一测试点菌落数增加是可重复的并有统计学意义的结果,也可判定为阳性。《化学品毒理学评价程序和试验方法 第 8 部分:鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验》中,受试样品诱发的回变菌落数超过自发回变菌落数 2 倍以上,并呈剂量-反应关系;受试样品经 4 个试验菌株检测后,只要有 1 个试验菌株,无论在加 S9 或不加 S9 条件下为阳性时,均可判定为阳性。

## 11 结语及讨论

2018 年颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》,是进行药物遗传毒性研究的基本原则,必须执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP),在试验设计上,应在对受试物认知的基础上,遵循“具体问题具体分析”原则,作为一个指导性文件,未对 Ames 试验方法细节进行详细的规定,试验时可根据受试物已有信息选择合理的试验方法及设计适宜的试验方案。《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》、《化学品毒理学评价程序和试验方法 第 8 部分:鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验》、《农药登记毒理学试验方法 第 14 部分:细菌回复突变试验》则对试验方法有详细的说明和规定,尽管方法不尽相同,但最终都是确保试验质量及对受试物的客观评价。



综上, Ames 试验影响因素很多, 要想获得好的试验结果, 可从以下几个方面进行质量控制:

(1) 试验菌株: 在对不同受试物进行评价时, 菌株组合也各不相同, 如 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 组合<sup>[6-8]</sup>, TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 组合<sup>[9-10]</sup>, TA98、TA100、TA1535、TA1537、WP2 uvrA 组合<sup>[11-13]</sup>, TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 组合<sup>[14-15]</sup>, TA97a、TA98、TA100、TA1535、WP2 uvrA 组合<sup>[16]</sup>等, 因菌株易变异及生物学特性容易丢失, 不论选用何种菌株组合, 均应确保菌株特性符合要求, 同时, 还应建立自己实验室的回变菌落数历史背景值, 以便在受试物的计数结果有统计学意义时, 可结合阴性对照历史范围综合分析。

(2) S9 代谢活化系统: S9 常用诱导剂为 Aroclor 1254, 因 Aroclor 1254 严重污染环境, 现已停产, 目前可采用苯巴比妥和  $\beta$ -萘黄酮联合诱导大鼠 S9 肝微粒体酶, 活化效果与 Aroclor 1254 比较并无差异<sup>[17-18]</sup>, 制备后需对其蛋白含量和活性进行检测。因自制方法较繁琐, 大多试验室一般购买商品化 S9, 尽管所购买 S9 有质检报告, 已检测其含量和活性, 但笔者建议, 如果条件允许, 还是需要对 S9 进行活化效果考察。

(3) 试剂配制: Ames 试验中所需单个化学试剂 20 余种, 不同培养基又需要不同试剂的组合配制, 例如底层培养基需要 6 种试剂才能制得, 氨苄青霉素平板则在底层培养基的基础上又加入 4 种试剂, 配制方法琐碎, 且试剂配制后均需高压灭菌或过滤除菌, 因此, 试验过程需要耐心和细心, 保证所配制试剂的准确性及按要求进行储存, 短期内使用。此外, 不同生产厂家的试剂品质也各不相同, 若实验室已有较常用品牌试剂, 尽量避免频繁更换。

(4) 细菌培养: 食品、化学品、农药 Ames 试验标准中还规定试验时菌株活菌数不少于  $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$  个/mL, OECE 指导原则中也明确细菌数约  $10^9$  个/mL<sup>[19]</sup>, 因此, 每个实验室均应建立菌株复苏、冻存、培养等相关标准操作规程(SOP)及作业指导书, 以确认培养基、培养时间、震荡速率等条件因素对细菌生长的影响。同时, 在细菌培养、染毒过程中, 需小心操作, 防止微生物污染, 一旦污染, 该组数据将无法参与统计, 严重者, 试验需重新开展。

(5) 染毒: 1 个 Ames 试验, 在加和不加 S9 代谢活化系统条件下, 每个菌株均至少设 7 个组别, 每组平行 3 皿, 共至少需要 210 管顶层培养基和 210 个底

层培养基平皿, 共计需加样 525 次, 若还有原研对照、阴性对照等组别, 则相应的需更多顶层、底层和加样。染毒时, 需在顶层培养基中分别加入增菌液 0.1 mL、受试物 0.1 mL, 需活化时再加 S9 混合液 0.5 mL, 混匀后倒入底层培养基平皿内, 所以每个底层培养基平皿均需标识清楚, 染毒过程中需注意力集中, 不要漏加或多加, 避免因加样失误导致结果不准确。

细菌培养、试剂配制、加药染毒等试验过程, 均能影响 Ames 试验的质量。各实验室应在试验过程中, 不断总结经验, 只有熟练掌握 Ames 试验实施过程中各项要点, 细心、科学地进行试验, 才能提高 Ames 试验的成功率及试验质量, 为客观评价受试物的毒性提供可靠数据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.  
China Food and Drug Administration. Technical Guidelines for Drug Genotoxicity Research [S]. 2018
- [2] 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.  
China National Health and Family Planning Commission. National food safety standard: Bacterial reverse mutation test: GB 15193.4—2014 [S]. Beijing: China Standards Press, 2015.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会. 化学品 细菌回复突变试验方法: GB/T 21786—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine, Standardization Administration of the People's Republic of China. Chemicals: Method of Bacterial Reverse Mutation Test: GB/T 21786—2008 [S]. Beijing: China Standards Press, 2008.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 8 部分: 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验: GBZ/T 240.8—2011 [S]. 2011.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—Part 8: salmonella typhimurium reverse mutation assay: GBZ/T 240.8—2011 [S]. 2011.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 农药登记毒理学试验方法 第 14

- 部分: 细菌回复突变试验: GB/T 15670.14—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine, Standardization Administration of the People's Republic of China. Toxicological Test Methods for Pesticides Registration - Part 14: Bacterial reverse mutation test: GB/T 15670.14—2017 [S]. Beijing: China Standards Press, 2017.
- [6] 耿雪, 张晓鹏, 李永宁, 等. 脱氢乙酸钠遗传毒性研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(2): 118-123.
- Geng X, Zhang X P, Li Y N, et al. Genotoxicity evaluation of sodium dehydroacetate [J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(2): 118-123.
- [7] 陈劲松, 谭传波, 杨耀学, 等. 鲜榨山茶油食用安全性毒理学评价 [J]. 中国油脂, 2020, 45(3): 68-73, 97.
- Chen J S, Tan C B, Yang Y X, et al. Toxicological assessment of fresh pressed oil - tea camellia seed oil [J]. China Oils and Fats, 2020, 45(3): 68-73, 97.
- [8] 曲见松, 祝清芬, 赵岩, 等. 小儿牛黄清心散遗传毒性研究 [J]. 食品与药品, 2019, 21(4): 289-293.
- Qu J S, Zhu Q F, Zhao Y, et al. Study on genetic toxicity of Xiaer Niu Huang Qingxin Powder [J]. Food Drug, 2019, 21(4): 289-293.
- [9] 张成香, 朱雪峰. 关山樱急性经口毒性和遗传毒性研究 [J]. 现代食品, 2019(17): 141-146.
- Zhang C X, Zhu X F. Study on acute oral toxicity and genetic toxicity of *Cerasus lannesiana* albo-rosea [J]. Mod Food, 2019(17): 141-146.
- [10] Zhang Q Q, Li Q, Dong L, et al. Genotoxicity and embryotoxicity study of bicyclol methyl ether, main impurity in bicyclol [J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(10): 743-749.
- [11] Dziwenka M, Coppock R, Alexander M, et al. Safety assessment of a hemp extract using genotoxicity and oral repeat-dose toxicity studies in sprague-dawley rats [J]. Toxicol Rep, 2020, 7: 376-385.
- [12] Yoshino S, Awa R, Ohto N, et al. Toxicological evaluation of standardized Kaempferia parviflora extract: Sub-chronic and mutagenicity studies [J]. Toxicol Rep, 2019, 6: 544-549.
- [13] Pitchford L M, Fuller J C Jr, Rathmacher J A Jr. Genotoxicity assessment of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 100: 68-71.
- [14] Kang K Y, Kim M S, Lee M S, et al. Genotoxicity and acute toxicity evaluation of the three amino acid additives with *Corynebacterium glutamicum* biomass [J]. Toxicol Rep, 2020, 7: 241-253.
- [15] Yun J W, Kim Y S, Kwon E, et al. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of Angelica acutiloba in a standard battery of assays [J]. Lab Animal Res, 2017, 33(3): 231-236.
- [16] Md Zin S R, Mohamed Z, Alshawsh M A, et al. Mutagenicity evaluation of *Anastatica hierochuntica* L. aqueous extract *in vitro* and *in vivo* [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(4): 375-385.
- [17] 高梅, 曹冲, 英永, 等. 不同诱导方法制备大鼠肝微粒体酶及其活性的比较 [J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(4): 269-272.
- Gao M, Cao C, Ying Y, et al. Comparison of different induction methods on activity of rat liver microsomal enzymes [J]. Carcinog Teratog Mutag, 2016, 28(4): 269-272.
- [18] 王亚其, 李宏霞, 肖凯, 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 [J]. 现代预防医学, 2006, 33(4): 457-459, 463.
- Wang Y Q, Li H X, Xiao K, et al. Comparison of activation of two kinds of live homogenate S9 in two genotoxic test [J]. Mod Prev Med, 2006, 33(4): 457-459, 463.
- [19] OECD. Guideline for testing of chemicals No. 471: Bacterial reverse mutation test [S]. 1997.

[责任编辑 兰新新]