

## 微孔板与标准平皿 Ames 试验比较研究

文海若<sup>1</sup>, 宋捷<sup>1</sup>, 鄂蕊<sup>1</sup>, 王亚楠<sup>1</sup>, 胡燕平<sup>1\*</sup>, 汪祺<sup>2\*</sup>

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 中国食品药品检定研究院中药民族药检定所, 北京 100050

**摘要:** **目的** 使用鼠伤寒沙门菌和大肠埃希菌及阳性剂开展基于6孔板、24孔板和标准10 cm平皿的Ames试验, 为确立标准化微孔板Ames试验奠定研究基础。**方法** 6种不同鼠伤寒沙门菌(TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537)和1种大肠埃希菌(WP2 *uvrA*)经鉴定及扩增后, 分别使用标准平皿、6孔板和24孔板在有无S9代谢活化条件下使用不同浓度的阳性剂开展平板掺入法Ames试验。所有样本置37 °C培养约48 h后进行菌落计数。**结果** 所有试验条件下均出现浓度相关性的回复菌落形成率增加, 且最高浓度条件下的菌落数高于对照组3倍。然而微孔板中可出现阴性背景菌落数过少的情况, 阳性剂的用量也不能照搬标准平皿中的浓度设置。**结论** 本研究所用条件可成功开展基于6孔板和24孔板的Ames试验, 其试验条件和背景数据需要经过摸索与积累。

**关键词:** 遗传毒性; 安全性评价; 细菌回复突变试验; mini-Ames; micro-Ames; 阳性剂

**中图分类号:** R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 05-0884-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.013

## Comparative study on microplate and standard plate Ames Tests

WEN Hairuo<sup>1</sup>, SONG Jie<sup>1</sup>, AO Rui<sup>1</sup>, WANG Yanan<sup>1</sup>, HU Yanping<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>2</sup>

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China

2. Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract: Objectives** To compare the Ames tests based on 6-well/24-well plates and standard 10cm plates using *Salmonella typhimurium*/*Escherichia coli* and positive agents, and lay a research foundation for the standardized microplate based Ames tests.

**Methods** 6 *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537) and a *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) were identified and amplified, and subsequently used to perform standard plate, 6-well plate and 24-well plate based Ames tests with a range of different concentrations of positive agents in the presence or absence of S9 metabolic activation. The colonies were counted 48 hours after cultured at 37 °C. **Results** The concentration relevant colony formation rates increasing were observed in all test conditions. Under the highest concentrations, the colony counts were 3 times higher than the solvent control. However, too few background colony counts might be found in the solvent controls of microplates, and the amount of positive agents might not be set in accord with the concentrations used in standard plate test. **Conclusions** 6-well and 24-well plate based Ames tests were performed successfully following the current protocol, whereas the experimental conditions and background data shall be further explored and accumulated.

**Key words:** genotoxicity; safety evaluation; bacterial reverse mutation test; mini-Ames; micro-Ames; positive agent

细菌回复突变试验(bacterial reverse mutation test), 又称为Ames试验, 最初由Bruce. N. Ames于1970年代使用紫外线照射筛选出的不同组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门菌株 *Salmonella typhimurium*

而建立<sup>[1]</sup>。缺乏合成组氨酸能力的细菌, 在不含组氨酸的选择性培养基中除极少自发回复突变菌落外, 仅形成显微镜下可见的微菌落; 而在诱变剂作用下可发生回复突变并通过自行合成组氨酸来形

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017); 国家自然科学基金(81503347)

第一作者: 文海若, 副研究员, 从事遗传毒理学研究。

\*通信作者: 汪祺, 副研究员, 从事药物毒理学研究。

胡燕平, 副主任药师, 从事遗传毒性研究。

成肉眼可见的菌落。Ames 试验方法即根据上述原理而建立,用于检测环境污染物、食品添加剂、化妆品及药品成分中是否存在致突变剂。因该方法试验周期短且操作简便,其灵敏性和特异性较好,已成为国际公认的化学诱变剂常规检测的首选初筛试验。大鼠致癌试验和恒河猴试验中检出的致癌物,在 Ames 试验中的检出率分别为 69.0% 和 87.5%<sup>[2]</sup>,是当前所有遗传毒性评价方法中对致癌物预测度最高的试验,也是化合物定量构效关系(QSAR)建立的遗传毒性筛选数据库的重要基础<sup>[3]</sup>。当前 Ames 试验已列入国际和国内药品、保健食品、化妆品和医疗器械安全性评价指导原则或评价标准中遗传毒性试验组合的必选<sup>[4-7]</sup>。

然而,在进行毒理学初筛时,往往难以合成或提取大量的受试物,且大量初筛样本也带来了较大工作量。随着近 30 年来分子生物技术的突飞猛进,Ames 试验技术也历经了一系列有助于改进检测效力和效率的改良。如通过引入含抗性因子质粒来提高试验体系的敏感度,除沙门菌外也将有色氨酸营养缺陷型大肠杆菌(*E.coli*)纳为备选菌株,使用微孔板(如 6 孔板、24 孔板、96 孔板,甚至 384 孔板)或构建含荧光报告基因的质粒来实现高通量化<sup>[8-10]</sup>。其中基于 6 孔板(mini-Ames)和 24 孔板(micro-Ames)的 Ames 试验,因不涉及特殊试剂盒的购买和质粒构建的技术壁垒,又具有受试物用量少的优势,在环境毒理学监测和“三品一械”安评工作中最为实用。

试验方法的标准化和背景数据积累对于 Ames 试验非常重要,菌液在培养基中的比例,以及阳性剂浓度之间的平衡等因素对背景值有明显影响。作为化合物致突变性初筛的首选,当前微孔板

Ames 试验缺乏标准化以及背景数据的积累。此外,保健食品、化妆品、医疗器械和药物安全性评价常规使用的菌株有所差异<sup>[11]</sup>,且不同菌株的特性不同。故本研究使用 6 种不同鼠伤寒沙门菌(TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537)和 1 种大肠埃希菌(WP2 *uvrA*)及不同浓度的阳性剂开展基于 6 孔板、24 孔板和标准 10 cm 平皿的 Ames 试验,为确立微孔板 Ames 试验奠定研究基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株

本研究使用菌株为鼠伤寒沙门菌组氨酸营养缺陷型(*his*<sup>-</sup>)菌株 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 和大肠杆菌色氨酸营养缺陷型(*trp*<sup>-</sup>)菌株 WP2 *uvrA*。上述菌株引自日本(株)生物科学中心(JBS INC.),经分离筛选后鉴定对其是否存在氨基酸及生物素合成缺陷、细胞壁脂多糖缺失(*rfa*)、紫外线(*uvrA* 或  $\Delta$  *uvrB*)修复缺陷、抗氨基青霉素及抗四环素(含 pKM101 或 pAQ1 质粒)等特性进行鉴定,鉴定结果符合要求后用于试验<sup>[12]</sup>。菌株特性与适用领域<sup>[13]</sup>见表 1。

### 1.2 试剂与培养基

阴性对照二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、阳性对照 2-(2-呋喃基)-3-(5-硝基-2-呋喃基)丙烯酰胺(2-(2-Furyl-3-5-Nitro-2-Furylacrylamide, AF-2, Sigma)、2-氨基蒽(2-Aminoanthracene, 2-AA)购自 Sigma,阳性对照叠氮钠(sodium azide, NaN<sub>3</sub>)购自 Merck、9-氨基吖啶(9-aminoacridine, 9-AA)购自 Acros Organics。其他试剂包括营养肉汤(CM0067 nutrient broth No.2)购自 OXOID;琼脂粉(agar powder)、氨基青霉素、葡萄

表 1 研究用菌株及适用领域

Table 1 Strains for research and their application areas

菌株	氨基酸合成缺陷	膜缺陷 <sup>1</sup>	DNA 修复系统缺陷	抗性因子质粒 <sup>2</sup>	回复突变类型	保健食品 <sup>3</sup>	化妆品	医疗器械或药物 <sup>4</sup>
TA97	<i>hisD</i> 6610	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101	GC 移码	✓	✓	✓
TA98	<i>hisD</i> 3502	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101	GC 移码	✓	✓	✓
TA100	<i>hisG</i> 46	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101	GC 碱基置换	✓	✓	✓
TA102	<i>hisG</i> 428	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101, pAQ1	AT 碱基置换	✓	✓	✓
TA1535	<i>hisG</i> 46	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-	GC 碱基置换			✓
TA1537	<i>hisC</i> 3076	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	-	GC 移码			✓
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i> 65	-	<i>uvrA</i>	-	AT 碱基置换			✓

1. *rfa* 指含有细胞壁脂多糖缺失突变; 2. pKM101 质粒有抗氨基青霉素特性, 而 pAQ1 质粒有抗四环素特性; 3. 必要时可增加 TA1535 或 TA1537; 4. 5 种菌株分别为: TA97/TA1537、TA102/WP2 *uvrA*、TA98、TA100 和 TA1535; TA102 可检测交联剂。本研究不涉及其他 Ames 试验可能涉及的菌株, 如 TA97a、TA104、WP2 *uvrA* (pKM101) 等, 故不具体列出。

糖、组氨酸、色氨酸、生物素、MgSO<sub>4</sub>·(7H<sub>2</sub>O)、柠檬酸钠·(2H<sub>2</sub>O)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·(3H<sub>2</sub>O)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NADP、G-6-P、KCl、MgCl<sub>2</sub>均购自Sigma;大鼠肝S9混合液(由苯巴比妥钠和β-萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成)购自北京康瑞杰科技有限公司。

### 1.3 细菌回复突变试验

试验流程简述如下,底层琼脂、磷酸盐缓冲液、SEM顶层琼脂及S9混合液等配制方法此略<sup>[14]</sup>。细菌冻融液与营养肉汤混合后置于水浴摇床在37℃、120 r/min条件下扩增10 h,扩增后使用酶标仪对光密度进行检测,估算活菌浓度达到1×10<sup>9</sup>个/mL后用于试验。根据不同菌株的标准平皿(10 cm<sup>2</sup>)Ames试验历史背景数据,设置3个不同阳性剂浓度组(标准平皿仅设置1个阳性剂浓度组,按加样体积折算相当于微孔板法的浓度组2),分别使用标准平皿(条件A)、6孔板(条件B)和24孔板(条件C)开展平板掺入法Ames试验,加样比例见表2,菌株所对应阳性剂及浓度见表3。试验平行设置DMSO溶媒

对照组,分别在有和无S9代谢活化条件下开展,标准平皿和6孔板每组平行3皿/孔,24孔板每组平行6孔。所有样本置37℃培养约48 h后进行菌落计数。上述试验共重复3~5次。

### 1.4 菌落计数及结果判定

计数每皿/孔中的回复菌落数量,每个浓度组分别求得均值,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当试验组平均每皿/孔中的回复菌落数大于或等于溶媒对照组数值2倍,且存在量效关系时判断结果为阳性;反之为阴性。

## 2 结果与讨论

本试验根据标准平皿法来对6孔板和24孔板Ames试验进行设计,三者均为平板掺入法,且所用试剂相同,唯一的差异为后两者铺制的琼脂表面积少。本研究条件下顶层琼脂中每孔加样量分别为标准平皿法用量的1/3和1/10,有文献报道mini-Ames试验和micro-Ames试验的加样量可减少约为标准平皿的1/5和1/20<sup>[15-16]</sup>。本研究所用阳性剂浓度2为标准平皿法中常用阳性剂浓度,并以

表2 标准平皿及微孔板Ames试验加样量比较

Table 2 Comparisons on sampling amounts in Ames Test of standard plate and microporous plate

试验条件	顶层琼脂中每皿/孔加样量/mL		
	10 cm <sup>2</sup> 标准平皿	6孔板	24孔板
受试物	0.1	0.033	0.010
磷酸盐缓冲液/S9混合液	0.5	0.167	0.050
菌液	0.1	0.033	0.010
SEM顶层琼脂	2.0	0.667	0.200
顶层总加样量	2.7	0.900	0.270

表3 不同条件下菌株所对应阳性剂及浓度

Table 3 Positive agents and concentrations of strains under different conditions

试验条件	浓度	AF-2(μg/皿或孔)						NaN <sub>3</sub> (μg/皿或孔)			9AA(μg/皿或孔)		
		TA97/TA100/TA102/WP2			TA98			TA1535			TA1537		
		uvrA			标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板
-S9条 件	浓度1	/	0.001	0.0003	/	0.01	0.003	/	0.03	0.01	/	6.6	2
	浓度2	0.01	0.003	0.001	0.1	0.03	0.01	0.5	0.165	0.05	40	13.2	4
	浓度3	/	0.01	0.003	/	0.1	0.03	/	0.825	0.25	/	26.4	8
试验条件	浓度	2-AA(μg/皿或孔)											
		TA97/TA100/TA1535/TA1537			TA98			TA102			WP2 uvrA		
		标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板
+S9条 件	浓度1	/	0.09	0.03	/	0.085	0.025	/	0.18	0.06	/	1	0.3
	浓度2	1	0.3	0.1	0.5	0.17	0.05	2	0.6	0.2	10	3	1
	浓度3	/	0.9	0.3	/	0.34	0.1	/	1.8	0.6	/	10	3

此为依据在6孔板和24孔板中分别根据1/3和1/10的加样比例减少阳性剂用量。结果发现所有试验条件下均出现浓度相关性的回复菌落形成率增加,且最高浓度条件下的菌落数高于对照组3倍。提示本研究所用条件可成功开展上述两项微孔板Ames试验。

然而阳性剂浓度2在微孔板Ames试验中的效力不如标准平皿。以TA102为例,AF-2在标准平皿、6孔板和24孔板中的添加量分别为0.01 μg/皿、0.003 μg/孔和0.001 μg/孔时回复突变菌落数分别为(1 185±64)个/皿、(45±7)个/皿和(5±2)个/皿,菌落突变数倍数比不呈10:3:1。此外,上述突变菌落数值分别相同条件下对照组的4.2倍、1.7倍和0.6倍,即在微孔板条件下浓度2不足以产生阳性结果(表4~5)。细菌生长速率与其周边的菌落密度相关<sup>[17]</sup>,培养所用孔径较小时达到对数生长期较

晚。可见,微孔板Ames试验并非“缩小”的标准平皿Ames试验,其试验条件和背景数据需要经过摸索和积累,尤其是阳性剂的浓度或需作调整。

微孔法Ames试验的主要用途在于致突变性初筛,减少所用菌株可进一步减少工作量和受试物用量。TA100是最敏感的菌株,其次为TA98和TA1535。研究提示,结合移码突变和点突变两种检测类型的菌株组合可有效检出大部分致突变剂,如TA98/TA100、TA100/TA1535和TA98/TA1535可分别检出93%、87%和83%的致突变剂<sup>[18]</sup>。因此部分微孔法Ames研究仅使用TA98和TA100两种菌开展。然而不同菌株的特性不同,如羟基蒽醌类化合物可能仅表现为TA1537为阳性<sup>[19]</sup>;而氧化型致突变剂、DNA交联剂等可能主要表现为含AT位点突变的TA102和WP2 *uvrA*等菌株的结果为阳性<sup>[20]</sup>;

表4 非S9代谢活化条件下微孔板与标准平皿回复突变菌落计数( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 4 Recovery mutant colony counts of microporous plates and standard plates under non-S9 metabolic activation conditions**

组别	TA97/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA98/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA100/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA102/(个·皿 <sup>-1</sup> )		
	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板
1% DMSO	120±5	47±5	5±2	39±5	11±3	3±1	132±21	54±9	15±4	285±52	28±7	5±5
阳性剂浓度1	/	67±2	14±3	/	37±4	7±2	/	67±2	16±3	/	33±9	6±4
阳性剂浓度2	984±177	134±2	27±6	540±40	59±7	13±3	651±44	91±12	22±3	1185±64	45±7	5±2
阳性剂浓度3	/	369±270	89±8	/	131±12	49±9	/	274±27	74±5	/	98±26	14±13
组别	TA1535/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA1537/(个·皿 <sup>-1</sup> )			WP2 <i>uvrA</i> /(个·皿 <sup>-1</sup> )					
	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板			
1% DMSO	15±2	2±1	1±1	12±3	6±3	2±2	42±14	7±2	2±1			
阳性剂浓度1	/	22±3	8±4	/	29±8	8±3	/	12±3	2±1			
阳性剂浓度2	467±46	102±8	44±11	457±39	144±33	38±7	274±28	31±4	4±2			
阳性剂浓度3	/	288±40	92±8	/	472±19	192±38	/	199±25	86±11			

表5 S9代谢活化条件下微孔板与标准平皿回复突变菌落计数( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 5 Recovery mutant colony counts of microporous plates and standard plates under S9 metabolic activation conditions**

组别	TA97/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA98/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA100/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA102/(个·皿 <sup>-1</sup> )		
	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板
1% DMSO	122±4	41±8	12±4	46±6	6±3	2±2	101±21	42±5	11±4	250±30	23±5	6±3
阳性剂浓度1	/	68±7	12±2	/	35±6	4±2	/	58±5	11±7	/	38±4	9±4
阳性剂浓度2	1022±262	299±41	88±16	392±73	82±12	7±3	651±101	196±29	51±9	776±55	87±12	13±3
阳性剂浓度3	/	1309±123	503±42	/	273±16	73±10	/	1423±227	377±102	/	136±8	31±3
组别	TA1535/(个·皿 <sup>-1</sup> )			TA1537/(个·皿 <sup>-1</sup> )			WP2 <i>uvrA</i> /(个·皿 <sup>-1</sup> )					
	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板	标准平皿	6孔板	24孔板			
1% DMSO	14±3	4±2	1±2	10±3	2±1	0	32±12	4±2	2±1			
阳性剂浓度1	/	6±3	1±1	/	3±2	0	/	32±3	3±1			
阳性剂浓度2	264±22	58±7	14±3	254±32	12±2	3±1	399±43	73±10	13±4			
阳性剂浓度3	/	126±11	39±6	/	89±10	24±7	/	99±8	37±5			

尽管TA1535和TA100均为hisG46基因位点的碱基置换型突变,且理论上含有pKM101质粒的TA100应更加敏感,但已知的659种致突变剂中有5%的受试物可由TA1535检出,而TA100结果则为阴性<sup>[21]</sup>。因此,本研究中选用了7种可能在环境监测和安评领域中涉及的菌株进行全面比较。结果发现在微孔板条件下,尤其是使用24孔板时,阴性背景菌落数较少,如TA1535、TA1537和WP2 uvrA在有代谢活化条件下的菌落计数均值在0~3。尤其是代谢活化条件下24孔板中TA1537的阴性背景值为0,重复试验结果一致,调整顶层培养基中的TA1537菌液含量为之前2倍时对突变率无影响。但当阳性剂2-AA浓度为0.3 μg/孔时平均回复突变菌落数约为20个/孔。当孔径变小时,对阴性背景值较低的菌株突变率进行计数时应注意与受试物的抑菌性进行区分。

### 3 小结

微孔板Ames试验可节省受试物和试剂的使用,在早期致突变剂初筛时具有重要价值。但使用微孔板加样时易于有漏孔,或可出现阴性背景值过少的情况,而阳性剂的用量也不能照搬标准平皿中进行设置。故正式试验前,需要进行一些前期摸索。当前国际上缺乏基于各种不同微孔板Ames试验方法的标准化方法。OECD自1997年首次颁布Ames试验指导原则<sup>[22]</sup>自1997年发布以来,尚未进行更新。当前OECD正在收集基于微孔板(含6孔、24孔、96孔及384孔)的试验的背景数据,拟通过回顾性分析来确定技术细节并起草相关指导原则。这项工作将用于指导Ames试验在监管领域中的评价工作,从而更好地服务于公众安全。本研究将7种不同菌株使用6孔板和24孔板开展Ames试验的结果与标准平皿法作比较,并在重复试验中获得较为稳定的阴性及阳性突变菌数范围,初步建立了一套可行的试验流程及适宜的阳性剂使用浓度,以供相关研究者参考。

### 参考文献

- [1] Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay [J]. *Mutat Res*, 2000, 455 (1): 29-60.
- [2] 于仲波, 吴南翔, 金锋, 等. 1485种化学物致突变试验和致癌试验结果一致性比较 [J]. *毒理学杂志*, 2007(4): 320-320.
- [3] Cassano A, Raitano G, Mombelli E, et al. Evaluation of QSAR Models for the prediction of Ames genotoxicity: A retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2014, 32 (3): 273-298.
- [4] ISO10993-3: 2003 Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity [S]. 2003.
- [5] GB 15193.4-2014, 食品安全国家标准 细菌回复突变试验 [S]. 2014.
- [6] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R) [EB/OL]. (2011-11-9) [2018-7-2]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S2\\_R1/Step4/S2R1\\_Step4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf).
- [7] 药物遗传毒性研究技术指导原则课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则 2018 [EB/OL]. (2018-3-12) [2018-7-2]. [http://www.sdfda.gov.cn/art/2018/3/15/art\\_6088\\_200748.html](http://www.sdfda.gov.cn/art/2018/3/15/art_6088_200748.html).
- [8] Gee P, Maron D M, Ames B N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(24): 11606-11610.
- [9] 文海若, 宋捷, 刘倩, 等. Ames波动试验和GADD45a-GFP GreenScreen两种快速筛选方法评价大黄素和芫花素的遗传毒性 [J]. *药物评价研究*, 2018(5): 734-741.
- [10] Zwart N, Lamoree M, Houtman C, et al. Development of a luminescent mutagenicity test for high-throughput screening of aquatic samples [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018 (46): 350-360.
- [11] 许雷鸣, 胡燕平, 武谷, 等. 现行药物、保健食品和化妆品Ames试验方法的比较分析 [J]. *安徽医药*, 2013, 17 (9): 1595-1597.
- [12] 胡燕平, 宋捷, 李波. 细菌回复突变试验背景数据的采集 [J]. *中国新药杂志*, 2009(22): 2110-2112.
- [13] Sugiyama K, Yamada M, Awogi T, et al. The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms [J]. *Genes Environment*, 2016, 38(1):1-3.
- [14] Gatehouse D. Bacterial mutagenicity assays: test methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 817: 21-34.
- [15] 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): 105-114.
- [16] Wilson J D, Cariello N F. The Ames miniscreen assay: Volatility of sodium azide can cause an increase in the reversion frequencies of adjacent, untreated wells [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1997, 29(2): 217-219.

- [17] Cooper A L, Dean A C, Hinshelwood C. Factors affecting the growth of bacterial colonies on agar plates [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1968, 171(23): 175-199.
- [18] Zeiger E. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(5): 1287-1296.
- [19] Liberman D F, Fink R C, Schaefer F L, et al. Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames / Salmonella microsome system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1354.
- [20] Grey C E, Adlercreutz P. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102 [J]. *Mutat Res*, 2003, 527(1): 27-36.
- [21] Prival M J, Zeiger E. Chemicals mutagenic in *Salmonella typhimurium* strain TA1535 but not in TA100 [J]. *Mutat Res*, 1998, 412(3): 251-260.
- [22] ICH. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 471: Bacterial Reverse Mutation Test [EB/OL]. (1997-7-21) [2018-7-2]. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test\\_9789264071247-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en).