

## 中华人民共和国国家职业卫生标准

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

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—  
Part 8: *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：急性经口毒性试验；
- 第 3 部分：急性经皮毒性试验；
- 第 4 部分：急性吸入毒性试验；
- 第 5 部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第 6 部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第 7 部分：皮肤致敏试验；
- 第 8 部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第 9 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 10 部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第 12 部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第 14 部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第 15 部分：亚急性经口毒性试验；
- 第 16 部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第 17 部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第 19 部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第 21 部分：致畸试验；
- 第 22 部分：两代繁殖毒性试验；
- 第 23 部分：迟发性神经毒性试验；
- 第 24 部分：慢性经口毒性试验；
- 第 25 部分：慢性经皮毒性试验；
- 第 26 部分：慢性吸入毒性试验；
- 第 27 部分：致癌试验；
- 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第 29 部分：毒物代谢动力学试验；
- 第 30 部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第 31 部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第 32 部分：酵母菌基因突变试验；
- 第 33 部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第 34 部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第 35 部分：体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验；
- 第 36 部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 8 部分。

本部分的附录 A 是资料性附录。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:广西职业病防治研究所、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:陈晓琴、许建宁、孙金秀、林铮。

# 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

### 1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)的试验目的、试验概述、试验方法、结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品(有杀菌作用的除外)的致突变性。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第1部分:总则

### 3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**回复突变 reverse mutation**

细菌由营养缺陷型回变到野生型。

#### 3.2

**鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 salmonella typhimurium reverse mutation assay**

利用一组鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型试验菌株,测定化学品引起沙门氏菌碱基置换或移码突变所诱发的组氨酸缺陷型( $his^-$ )回变到野生型( $his^+$ )的试验方法。

### 4 试验目的

检测化学品的诱变性,预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

### 5 试验概述

鼠伤寒沙门氏组氨酸营养缺陷型菌株不能合成组氨酸,故在缺乏组氨酸的培养基上,仅有少数自发回复突变的细菌生长。假如有致突变物存在,则营养缺陷型的细菌回复突变成野生型,因此能生长形成菌落,据此判断受试样品是否为致突变物。

某些致突变物需要代谢活化后才能引起回复突变,故需加入外源性代谢活化系统,如  $S_9$ 。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品处理

选定受试样品的合适溶剂,首选无菌水作为溶剂。如果不溶于水的或水溶性低的化学品,可选二甲基亚砜。

### 6.2 剂量设计

决定受试样品高剂量的标准是对细菌的毒性及其溶解度。自发回变数的减少,背景变得清晰或被处理的培养物细菌存活数减少,都是毒性的标志。每一受试样品检测时至少设五个剂量组,剂量设定范围为  $5 \mu\text{g}/\text{皿} \sim 5\,000 \mu\text{g}/\text{皿}$ ,也可根据预试验结果按等比组距设定检测的剂量范围。

### 6.3 试验方法

#### 6.3.1 配制培养基和试剂

##### 6.3.1.1 20%葡萄糖溶液

称取 200 g 葡萄糖,加入蒸馏水至 1 000 mL,0.055 MPa 高压灭菌 20 min。贮于 4 °C 冰箱。

##### 6.3.1.2 0.5 mmol/L 组氨酸-0.5 mmol/L 生物素溶液成分

D-生物素(相对分子质量 244)	122 mg
L-组氨酸(相对分子质量 155)	78 mg
无菌蒸馏水	至 1 000 mL

不宜进行高压灭菌处理,使用无菌玻璃器皿配制。贮于 4 °C 冰箱。

##### 6.3.1.3 代谢活化系统

大鼠肝微粒体酶 S,其诱导和制备方法见附录 A。

##### 6.3.1.4 盐溶液(1.65 mol/L KCl-0.4 mol/L MgCl<sub>2</sub>)成分

氯化钾(KCl)	61.5 g
氯化镁(MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	40.7 g
蒸馏水	至 500 mL

0.103 MPa 高压灭菌 30 min。贮于 4 °C 冰箱。

##### 6.3.1.5 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)成分

磷酸二氢钠(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	2.965 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	29.015 g
蒸馏水	至 500 mL

0.103 MPa 高压灭菌 30 min。贮于 4 °C 冰箱。

##### 6.3.1.6 0.15 mol/L 氯化钾溶液

称取氯化钾 11.18 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,0.103 MPa 高压灭菌 30 min。贮于 4 °C 冰箱。

## 6.3.1.7 氨苄青霉素碱性溶液(8 mg/mL)

称取氨苄青霉素 80 mg,加入 0.02 mol/L NaOH 溶液 10 mL。

## 6.3.1.8 0.1%结晶紫溶液

称取结晶紫 10 mg,加 10 mL 无菌水。

## 6.3.1.9 四环素溶液(8 mg/mL)

称取四环素 40 mg,加入 0.02 mol/L HCl 溶液 5 mL。

## 6.3.1.10 溶解或稀释化学物质常用溶剂:蒸馏水、二甲基亚砜(DMSO)。

## 6.3.1.11 常用阳性对照及参考剂量(参见 GB 15193.4—2003):

柔毛霉素(Pubescens)	6.0 μg/皿
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	1.5 μg/皿
2-氨基芬(2-FA)	10 μg/皿 L
敌克松(dexon)	50 μg/皿
丝裂霉素 C(mytomycin C,MMC)	0.5 μg/皿

## 6.3.1.12 Vogel-Bonner(V-B)培养基 E 成分

枸橼酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	100 g
磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	500 g
磷酸氢氨钠( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	175 g
硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	10 g
蒸馏水	至 1 000 mL

先将前三种成分加热溶解后,再将溶解的硫酸镁缓缓倒入容量瓶中,加蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装后 0.103 MPa 高压灭菌 30 min。贮于 4 °C 冰箱。

## 6.3.1.13 顶层培养基成分

琼脂粉	1.2 g
氯化钠	1.0 g
蒸馏水	至 200 mL

0.103 MPa 高压灭菌 20 min 后,加入 0.5 mmol/L 组氨酸-0.5 mmol/L 生物素溶液。

## 6.3.1.14 底层培养基成分

琼脂粉	7.5 g
蒸馏水	480 mL
V-B 培养基 E	10 mL
20%葡萄糖溶液	10 mL

先将前两种成分于 0.103 MPa 高压灭菌 20 min 后,再加入后两种成分,充分混匀倒底层平板。按每皿 25 mL~30 mL 倒平皿,冷凝固化后倒置于 37 °C 培养箱中 24 h,备用。

## 6.3.1.15 肉汤培养基成分

牛肉膏	2.5 g
胰 胨	5.0 g

磷酸氢二钾(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0 g
蒸馏水	至 500 mL

将上述成分混合后,于 0.103 MPa 高压灭菌 30 min。贮于 4 °C 冰箱。

#### 6.3.1.16 营养琼脂平板成分

琼脂粉	7.5 g
营养肉汤培养基	500 mL

0.103 MPa 高压灭菌 20 min 后,倒斜面或平板。

### 6.4 菌株

一般使用鼠伤寒沙门氏菌 TA97a 或 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株,需要时可选用 TA1535、TA1537 等菌株。

#### 6.4.1 分离

将新获得的或经长期保存的试验菌株分别划线接种于主平板,37 °C 培养 18 h~24 h。

#### 6.4.2 增菌

用接种环分别刮取主平板中分离好的单个菌落分别接种于 5 mL 新鲜营养肉汤内增菌,37 °C 振荡(100 次/min)培养 10 h。该菌株培养物应每毫升不少于  $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$  活菌数。

#### 6.4.3 保存

取增菌液 0.8 mL,加高压灭菌 DMSO 0.07 mL 置于 2 mL 已灭菌、耐低温的带塞小塑料试管内,冷冻后贮存于盛有液氮的液氮罐内冷藏备用,置 4 °C 冰箱可保存一个月。

#### 6.4.4 菌株鉴定

新获得的或长期保存的菌种,在试验前必须进行菌株的生物特性鉴定,菌株鉴定的判断标准如表 1 所示。

表 1 试验菌株鉴定的判断标准

菌株	组氨酸缺陷	脂多糖屏障缺损	氨苄青霉素抗性	切除修复缺损	四环素抗性	自发回变菌落数
TA97	+	+	+	+	-	90~180
TA98	+	+	+	+	-	30~50
TA100	+	+	+	+	-	100~200
TA102	+	+	+	-	+	240~320
备注:	“+”表示需要组氨酸	“+”表示具有 rfa 突变	“+”表示具有 R 因子	“+”表示具有 $\Delta$ uvrB 突变	“+”表示具有 pAQI 质粒	* 在体外代谢活化条件下自发回变菌落数略增
注:其他菌株生物特性鉴定参照有关文献。						

##### 6.4.4.1 组氨酸依赖性

组氨酸营养缺陷型菌株只能在有组氨酸的营养培养基中生长,在不加组氨酸的培养基上则不生长。

将组氨酸营养缺陷型菌株分别用划线法接种于含有和不含有组氨酸的培养基中,37℃培养24h,观察细菌生长情况。组氨酸缺陷型菌株在含组氨酸平板上生长,而在无组氨酸平板上则不能生长或仅有少量增长。

#### 6.4.4.2 脂多糖屏障丢失

具有深粗型突变(*rfa*)的菌株,其表面一层脂多糖屏障缺损,因此一些大分子物质如结晶紫能穿透菌膜进入菌体,从而抑制其生长,而野生型菌株则不受影响。

取0.1 mL营养牛肉汤增菌液加到2 mL 45℃~46℃已融化的顶层琼脂中,摇匀,立即倒在有营养肉汤的底层琼脂培养基上,使其均匀分布。待琼脂凝固后,在平皿中央放一直径为6 mm的圆滤纸,然后将结晶紫水溶液(1 mg/mL)10 μL滴在滤纸上。37℃培养24 h。假若待测菌在滤纸片周围有清晰透明的抑菌圈,即表示结晶紫的分子已进入细菌体内,说明该待测菌株具有*rfa*突变。

#### 6.4.4.3 紫外线损伤修复缺陷

具有紫外线损伤修复缺陷( $\Delta$ *uvrB*突变)的菌株对紫外线敏感,当受到紫外线照射后,不能生长,而具有野生型切除修复酶的菌株,则能照常生长。

在营养牛肉汤琼脂培养基平皿的底部背面,用红笔划一直线,在培养基上沿红线用划线法接种细菌后,用黑纸覆盖平皿的1/2,其余部分用紫外线灯照射(15 W),距离33 cm,照射8 s。紫外线照射部分不能生长,而黑纸覆盖的那一半则能生长。具有 $\Delta$ *uvrB*突变的菌株对紫外线敏感,经辐射后细菌不生长,而具有完整的切除修复系统的菌株,则照常生长。

#### 6.4.4.4 抗氨苄青霉素 R 因子鉴定

含R因子的试验菌株对氨苄青霉素有抗性。因为R因子不太稳定,容易丢失,故用氨苄青霉素确定该质粒存在与否。

在营养牛肉汤琼脂平皿背面中线,用红笔划一直线,再用微量注射器在培养基上沿红线涂10 μL氨苄青霉素,待其干后与红线垂直方向划线接种细菌,37℃培养24 h。若待测菌在涂有氨苄青霉素的部位生长,说明该菌具有抗氨苄青霉素作用,表示含有R因子,仍能生长。否则表示待测菌不含R因子或R因子丢失。

#### 6.4.4.5 抗四环素 PAQ1 质粒鉴定

含PAQ1质粒的试验菌株对四环素有抗性。因为PAQ1质粒不太稳定,容易丢失,故用四环素确定该质粒存在与否。

在营养牛肉汤琼脂平皿背面中线,用红笔划一直线,再用微量注射器在培养基上沿红线涂10 μL四环素,待其干后与红线垂直方向划线接种细菌,37℃培养24 h。若待测菌在涂有四环素的部位生长,说明该菌具有抗四环素作用,表示含有PAQ1质粒,仍能生长。否则表示待测菌不含PAQ1质粒或PAQ1质粒丢失。

#### 6.4.4.6 自发回变

每一种试验菌株都以一定的频率自发地产生回变,称为自发回变。

将待测菌株增菌液0.1 mL加到2 mL含组氨酸-生物素的顶层琼脂培养基的试管内,混匀后铺到底层琼脂平板上,待琼脂固化后,置37℃培养箱中孵育48 h后记数每皿回变菌落数。每种标准测试菌株的自发回变菌落数应符合表2要求。经体外代谢活化后的自发回变菌落数,要比直接作用下的略高。



表 2 测试菌株的回变性

诱变剂	剂量 μg/皿	S <sub>9</sub>	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	6.0	—	124	3 123	47	592
叠氮化钠	1.5	—	76	3	3 000	188
ICR-191	1.0	—	1 640	63	185	0
链霉素	0.25	—	inh	inh	inh	2 230
丝裂霉素 C	0.5	—	inh	inh	inh	2 772
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.20	—	8 377	8 244	400	16
4-硝基-O-次苯二胺	20	—	2 160	1 599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	—	528	292	4 220	287
甲基磺酸甲酯	1.0	—	174	23	2 730	6 586
2-氨基芴	10	+	1 742	6 194	3 026	261
苯并(a)芘	1.0	+	337	143	937	255

注：inh 表示抑菌。表中数值均已扣除溶剂对照的回变菌落数；其他菌株对阳性物的反应参照有关文献。

#### 6.4.4.7 阳性对照物的回变菌落数

### 6.5 试验方法——平板掺入法

6.5.1 倒平板：先将底层培养基在 45 °C 时倒平板，冷却凝固后放入 37 °C 培养箱内 24 h。无菌落生长方可使用。

6.5.2 接种：将含 0.5 mmol/L 组氨酸-0.5 mmol/L 生物素溶液的顶层琼脂培养基 2.0 mL 分装于试管中，45 °C 水浴中保温，然后每管依次加入试验菌株增菌液 0.1 mL，受试样品溶液 0.1 mL 和 S<sub>9</sub> 混合液 0.5 mL（需代谢活化时），充分混匀，迅速倾入底层琼脂平板上，转动平板，使之分布均匀。水平放置待凝固化后，倒置于 37 °C 培养箱里孵育 48 h。每受试样品检测皿加或不加 S<sub>9</sub> 混合液均作三个平行皿。

6.5.3 对照：每一受试样品检测时必须设定阳性物对照，即将操作过程中加入受试样品溶液更换为阳性物，其他操作完全相同；同时，每批受试样品检测必须设定阴性对照，观察自发回变菌落数。操作过程中不加入受试样品，其余操作同本部分 6.5.2。

6.5.4 试验至少重复一次。

## 7 数据处理与结果评价

### 7.1 数据处理

记录受试样品各剂量组、空白对照组自发回变、溶剂对照组及阳性对照组的每皿回变菌落数，并求平均值和标准差。

### 7.2 结果评价

7.2.1 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-反应关系判定检测结果

为阳性。

7.2.2 受试样品经四个试验菌株检测后,只要有一个试验菌株,无论在加  $S_0$  或不加  $S_0$  条件下为阳性者时,均可判定该受试样品 Ames 试验结果为阳性。

7.2.3 四个试验菌株在加  $S_0$  和不加  $S_0$  条件下均为阴性,且重复试验结果一致时,则可判定受试样品 Ames 试验结果为阴性。

## 8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下内容:

- a) 试验菌株;
- b) 代谢活化系统及所用诱导剂;
- c) 试验方法、操作步骤、受试样品检测剂量分组及阴性、阳性对照名称;
- d) 阳性结果评价原则 以列表方式报告受试样品的 Ames 试验结果;
- e) 结论。

## 9 结果解释

阳性结果表明在本试验条件下受试样品具有致基因突变作用。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不具有致基因突变作用。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 大鼠肝微粒体酶的诱导和 S<sub>9</sub> 的制备

##### A.1 诱导

应用最广泛的大鼠肝微粒体酶的诱导剂是多氯联苯(Aroclor1254)混合物,选择健康雄性大鼠体重 200 g 左右,一次腹腔注射诱导剂 500 mg/kg。诱导剂溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL。

##### A.2 S<sub>9</sub> 制备

动物诱导后第 5 日断头处死。处死前 12 h 停止饮食,但可自由饮水。首先,用 75%酒精消毒动物皮肤,剖开腹部。在无菌条件下,取出肝脏,去除肝脏的结缔组织,用冰浴的 0.15 mol/L 氯化钾淋洗肝脏,放入盛有 0.15 mol/L 氯化钾溶液的烧杯里。按每克肝脏加入 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。用电动匀浆器制成肝匀浆,再在低温(0℃~4℃)高速离心机上,以 9 000g 离心 10 min,取其上清液(S<sub>9</sub>)组分分装于塑料管中。储存于液氮生物容器或-80℃冰箱中备用。

上述全部操作均在冰水浴中和无菌条件下进行。制备肝 S<sub>9</sub> 所用一切手术器械、器皿等,均经灭菌消毒。S<sub>9</sub> 置备后,其活力需经间接性诱变剂进行鉴定。

---