

Ames 氏致突变和致癌实验

实验材料:

菌株: 鼠伤寒沙门氏菌突变型 TA97 (CCTCC AB2014173), TA98 (CCTCC AB204062), TA100 (CCTCC AB204063), TA102 (CCTCC AB2014174);

培养基: LB 培养基, 底层葡萄糖基本培养基, 表层琼脂培养基 (含 10% 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液, 2ml/管);

溶液、试剂及待测物质: 滤纸片, 氨基青霉素溶液(8mg/ml), 四环素溶液(8mg/ml), 结晶紫溶液(1mg/ml), 秋水仙碱, 亚硝酸钠, 丙烯酰胺, 无菌水。

实验步骤:

1. 鉴定实验

(1) 组氨酸营养缺陷 (his^-) 实验

- 1.1 分别制备底层葡萄糖基本培养基平板和含有 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液 (0.2ml/皿) 的底层葡萄糖基本培养基平板;
- 1.2 用无菌棉签蘸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液, 分别划线接种于含组氨酸和不含组氨酸的平板上;
- 1.3 将平板倒置放入 37°C 培养箱培养 48h, 观察菌株生长情况。若菌株只在添加微量组氨酸的平板上生长, 而在不含组氨酸的平板上不能生长, 则菌株为 his^- 型菌株。

(2) 紫外线敏感实验 ($\Delta uvrB$ 实验)

- 2.1 制备含有 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液 (0.2ml/皿) 的底层葡萄糖基本培养基平板, 用无菌棉签分别蘸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液在平板上平行划线;
- 2.2 待菌液浸干后, 打开皿盖, 用锡箔纸遮盖平板的一半, 置于 15W 紫外灯下照射 15s;
- 2.3 盖上皿盖, 置 37°C 避光培养 27h, 观察菌株生长情况。只在未经照射一侧的

平板上生长的菌株为 Δ uvrB 型菌株。

(3) 抗氨基青霉素实验 (R 因子-抗氨基青霉素实验);

- 3.1 吸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液 0.1ml 分别放入盛有 2ml 表层培养基的试管中 (预先加热融化后 45°C 保温), 摇匀后倾倒在底层葡萄糖基本培养基平板上, 并使其分布均匀;
- 3.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 8mg/ml 氨基青霉素溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

(4) 抗四环素实验 (质粒 pAQ1 菌株实验)

- 4.1 平板制备同 3.1
- 4.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 8mg/ml 四环素溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

(5) 结晶紫敏感实验 (深粗糙突变, rfa)

- 5.1 平板制备同 3.1
- 5.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 1mg/ml 结晶紫溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

2. 致癌物检测 (平板渗入法)

- (1) 制备底层葡萄糖基本培养基平板, 置于 37°C 培养箱中过夜;
- (2) 菌液准备: 分别挑取适量四种缺陷菌株, 接种于 LB 液体培养基中振荡培养 10~12h, 使菌液浓度达到 $(1\sim 2) \times 10^9$ 个/ml;
- (3) 表层培养基试管置于 45°C 水浴备用, 依次加入 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液 0.1ml 和待检测致癌物质 0.1ml;
- (4) 表层培养基混匀后, 迅速倾倒在底层葡萄糖基本培养基平板上, 平放凝固

后，倒置于 37°C 培养箱 48h 后观察结果，计数平板上的回变菌落数。

实验结果：

1. 鉴定试验

各菌株的鉴定结果如下：

TA97：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA98：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA100：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA102：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线不敏感，氨基青霉素不敏感，四环素不敏感。

综合以上结果，本实验选用的鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 均符合 Ames 实验要求。

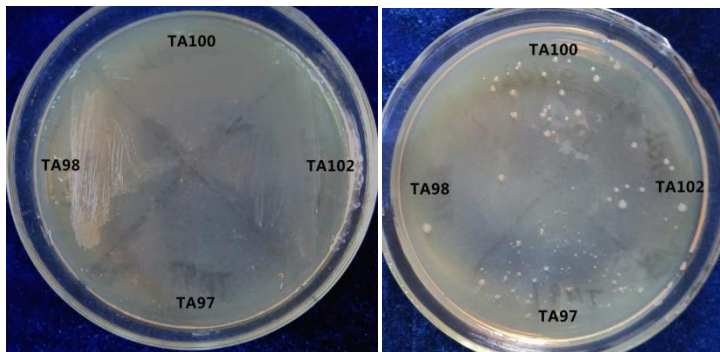


图 1. 组氨酸营养缺陷实验

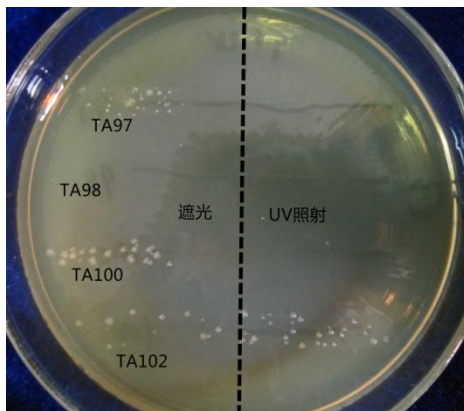


图 2. 紫外线敏感实验

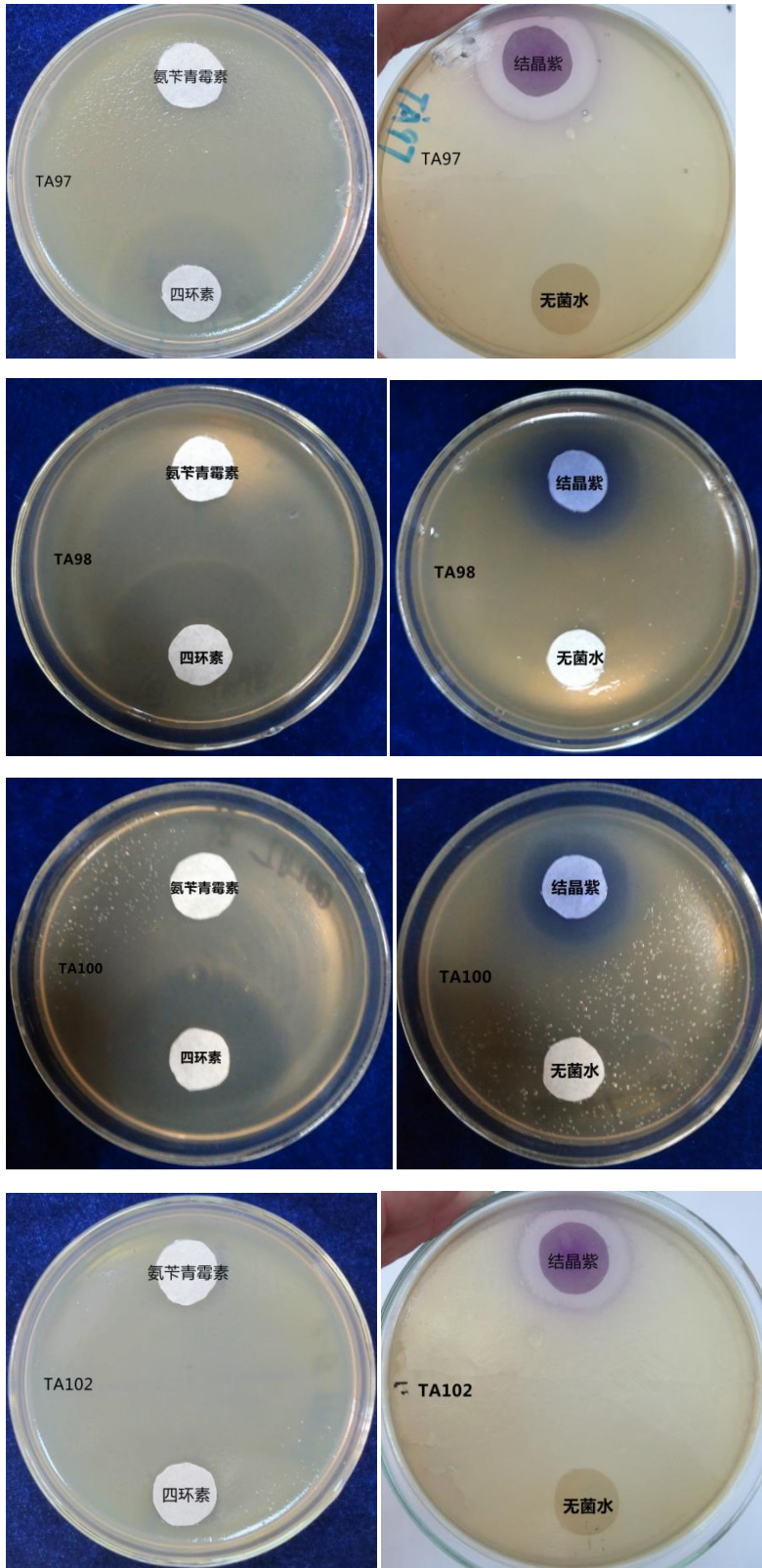


图 3: 抗氨苄青霉素实验、抗四环素实验和结晶紫敏感实验

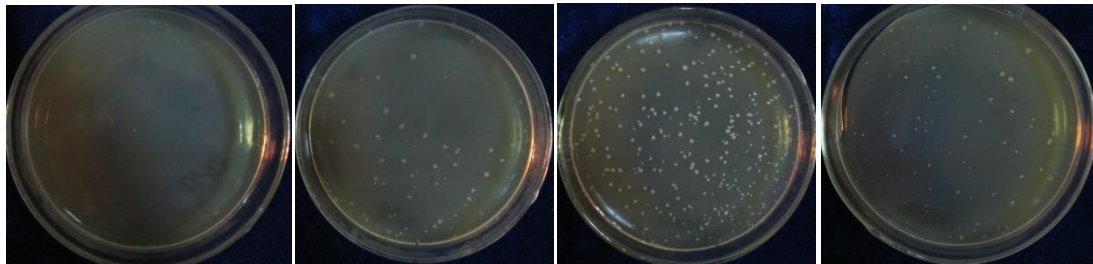
2. 致癌物检测 (平板渗入法)

计数结果 (CFU/皿):

菌株 检测物	TA97	TA98	TA100	TA102
空白	1	73	350	85
秋水仙碱	32	102	444	119
亚硝酸钠	29	83	684	524
丙烯酰胺	19	113	524	125

三种待检测物导致的四种菌株菌落突变数均多于自发突变菌落数, 可认为三种待测物为致癌物或致突变物质。

空白 (自发突变):



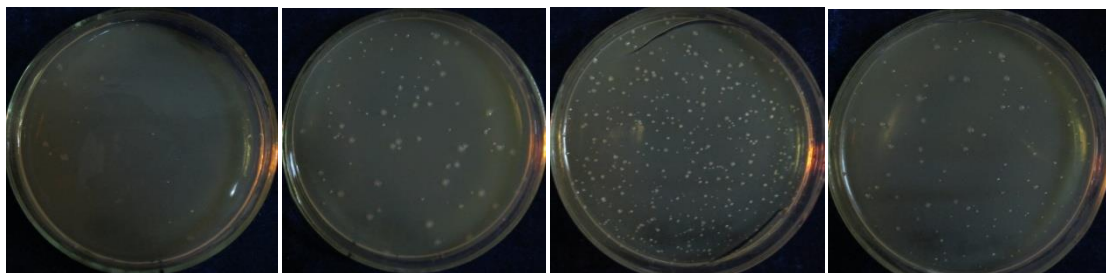
TA97

TA98

TA100

TA102

秋水仙碱:



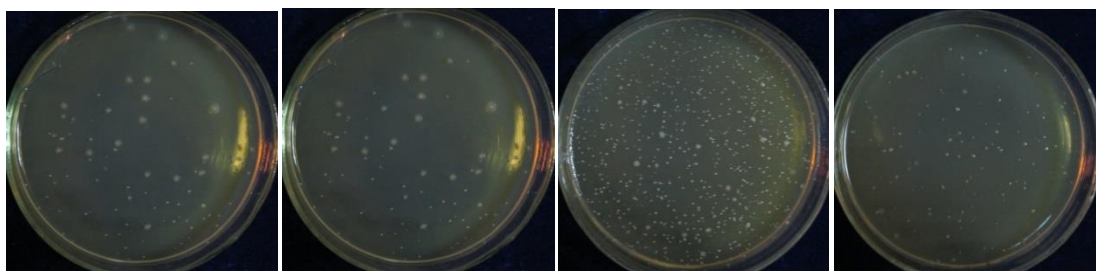
TA97

TA98

TA100

TA102

亚硝酸钠:



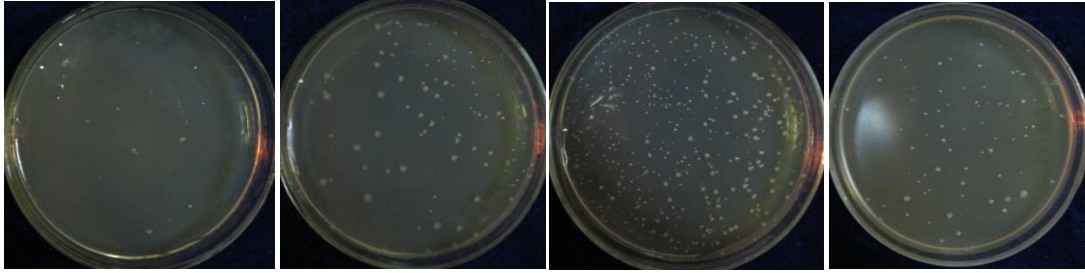
TA97

TA98

TA100

TA102

丙烯酸胺:



TA97

TA98

TA100

TA102

教学建议:

✳ 最佳保存条件: 不用于实验时, 该菌种可 4°C 存放 2 周左右。

实验教材:

沈萍, 陈向东 《微生物学实验》4 版. 高等教育出版社.2007, 137-140.