

8. Lei-sheng Yan. (阎雷生) Study of the carcinogenic mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbons-extended lay region theory and its quantitative model. *Carcinogenesis* 1985; 6(1):1-6.
9. 阎雷生. 多环芳烃广义湾区致癌理论的数学方法. *癌变·畸变·突变*, 1991; 4(4):1-6.
10. Kier L B, et al. Structure-Activity studies on Mutagenicity of Ni trosamines Using Molecular Connectivity. *J Pharm Sci*, 1978; 67(5): 725-726.
11. Yuan M, et al. Computer-assisted structur-activity studies of chemical carcinogens: A polycyclic aromatic hydrocarbons data set. *Tox Appl Pharm*, 1980; 52: 294.
12. Melkova Z. Utilization of the Index of molecular connectivity in the study of antitumor activity of a group of Benz[c]fluorene derivatives. *Cesk Farm*, 1984; 33:107.
13. Kier LB, et al. *Mutat Res*, 1986; 169, 69-240.
14. Kier LB, et al. Molecular connectivity in struuture-activity analysis, England: Research studies press, 1986; 1-262.
15. Free SM et al, *J Med Chem*, 1964; 7: 395.
16. Adamson GW, et al. *Nature*, 1974; 246: 406.
17. Adamson GW, et al. *J Chem Inform Comput Sci*, 1975; 15:215.
18. Adamson GW, et al. *J Chem Inform Comput Sci*, 1976; 16: 161.
19. Klopman G. Artificial intelligence approach to structure-activity studies, computer automated structure evaluation of biological activity of organic molecules. *J Am Chem Soc*, 1984; 106: 7315-7321.
20. Klopman G, et al. An artifical intelligent study of structure-activity relationships of non-fused ring nitroarenes and related compounds. *Mol Toxicol*, 1987; 1: 61-81.
21. Klopman G, et al. Computer-automated structure evaluation of quinolone antibacterials antimictob. *Ag Chemotherapy*, 1987; 31: 1831-1840.

※※※

癌变·畸变·突变 1994年第6卷第3期

采用冷冻真空干燥法保存肝微粒体酶(S_9)的探讨

韩惠娟 查 捷

杭州市卫生防疫站 310006

摘要 本实验采用冷冻真空干燥法保存肝微粒体酶(S_9)，经过冻干前后，冻干后一年及冻干后二年零四个月各时间点测试，结果表明，冻干 S_9 与新鲜制备的 S_9 活性比较一致，冻干 S_9 对间接诱变剂2AF具有活化作用。实验结果表明：采用冷冻真空干燥法保存肝微粒体酶 S_9 是可取的。

关键词 肝微粒体酶(S_9)；间接诱变剂；Ames试验；酶的活力

THE STUDY ON THE PRESERVATION OF MICROZOMAL ENZYME (S_9) BY LYOPHILIZATION

Han Hucijun Zha Jie

Hangzhou sanitation and antiepidemic station 310006

Abstract Ames test has been used widely to examine the mutagenicity of environmental chemicals and S_9 metabolic activation system is essential to the test. Researchers have to prepare S_9 from rat by PCB each time because S_9 can only be stored for long time under -130°C, which is not provided in most laboratories in China. Each lot of S_9 so prepared showed difference in activity and thus influences the experimental results. Therefore lyophilization procedure was adopted to prepare and store S_9 . The S_9 so prepared were stored for 24hr, one year and 2 1/2 years respectively. The number of revertants from all four lots of S_9 were recorded in Ames test in which TA_{98} and TA_{100} strains were used. The result showed that the activity of S_9 after storage didn't change significantly. The benefits from using lyophilized S_9 are: (1) it can be produced in large scale and supplied as a commercial product; (2) the results of Ames test performed in different laboratories are comparable; (3) the results between different experiments in the same laboratory are comparable; in a word the quality of Ames test and /or other invitro tests using S_9 would be improved.

Key words liver homogenate fraction (S_9); Indirect Mutagens; Ames Test, Enzymic activation

检测环境化学物(药物,农药,化妆品,工业品)诱变性和致瘤性的 Ames 试验及其它一些细胞诱变试验,必须使用活化系统。体外诱变试验中代谢活化系统对测试结果有关键性影响。最常用的活化系统是大鼠的肝匀浆组份含有的微粒体酶(简称 S_9)。 S_9 在室温条件下是不稳定的。Ashwood-Smith 曾报导,只有在温度低于-130°C冷冻 S_9 ,^②制剂才能长期稳定。故目前国内 S_9 均采用在液氮(-196°C)或超低温冰箱中才能长时间保存,遗憾的是大多数实验室没有能达到如此极低温度贮藏设备;故以往的 S_9 需临时用大鼠经多氯联苯诱导后取肝制备,费时费事费钱且不能长期保存。而且每批制品的活化能力有一定差异,会影响到 Ames 试验及其一些体外需代谢活化的试验结果。故这也是行家们长期以来感到难以克服的问题。为了解决此难题,我们试用冷冻真空干燥法来保存 S_9 ,然后与新鲜制备 S_9 进行 Ames 对比测定,经过二年零四个月的观察, S_9 的活性不变,这表明冷冻真空干燥法是有效和比较方便的保存 S_9 的方法。现将此方法介绍如下。

材料和方法

1. S_9 由上海劳动卫生职业病防治研究所提供。
2. 菌种、 TA_{98} 、 TA_{100} 由上海劳动卫生职业病防治研究所提供。
3. 培养基按 Ames 试验培养方法制备。
4. 阳性物 2-AF 从上海生化试剂商店购得。
5. 6-磷酸葡萄糖从美国 Sigma 公司进口,上海化学试剂商店购得。
6. 生物素从日本进口,上海生化试剂商店提供。
7. 组氨酸,辅酶 I 由中科院上海生物研究所提供。

按 Ames 试验方法,被测菌株先进行基因型及形态学性状鉴定,经鉴定合格的菌株来测定 S_9 的活性,经测定具有活性的 S_9 悬液分别注入空长颈安内,每支 0.2ml,迅速转入-40°C 冰箱中,冷冻 1h,然后立即转入冷冻真空干燥器中抽真空,在达到 5-10 毫托(millitorrs)^① 的真空以后,再继续抽 6h,直至

① torr 真空单位相当于 1mmHg 的压力

抽干。然后封口，冷却后放入4℃冰箱中，24h后取出二支溶解，然后按常规法测定 S_9 活性，均达到原来 S_9 的活性，其余继续放入常温冰箱中保存，以备测试不同时间点的活性作用，(一年，二年零四个月)。

结 果

1. 从表1结果可见大鼠肝脏微粒体混合功能氧化酶系统(即 S_9)采用冷冻真空干燥法保存二年零四个月后，仍然保存其原有活性。

2. 从表2表3结果可见，间接诱变剂二氨基芴(2AF)在冻干 S_9 活化作用下， TA_{98} 、 TA_{100} 菌株回复突变数仍与新鲜 S_9 诱导的回变数接近，而未加 S_9 则不出现阳性，说明 S_9 在冻干后二年零四个月其活化作用仍然保持不变，没有下降(表现在菌落数与冻干前比较没有明显差异)。

3. 本课题结果表明，采用冷冻真空干燥法保存肝微粒体酶(S_9)是有效的，是一种较为理想和经济的方法，它可解决 S_9 的长期保存和远距离携带问题，最关键的是可促成 S_9 的商品化，使各项试验活化条件相同，有可比性以利于达到标准化，规范化。

讨 论

冷冻真空干燥法，长期以来国内外用于细菌，病毒及生物制品的保存，而用于肝微粒体酶的保存，经杭州市医学情报检索中心检索，目前尚未见报导，而我们采用冷冻真空干燥技术保存肝微粒体酶 S_9 ⁽²⁾，经冻干前后的活性检定及冻干后一年，二年零四个月各时间点的测试，表明冻干 S_9 仍保持其原有活性，表1结果显示了冻干 S_9 在不同时间对 TA_{98} 、 TA_{100} 菌经二氨基芴(2AF)诱导的活化结果与新鲜的 S_9 比较，结果一致。这就证明了经冷冻真空干燥后的 S_9 活性不变。冷冻真空干燥保存 S_9 是使肝微粒体酶被迅速地达到冰点以下，使肝微粒体酶内的水分结成均

匀的一片玻璃状态，而不形成结晶，故它不会丧失酶的活力⁽¹⁾，所以能使 S_9 仍保持其原有活性。

表2结果表明：经冻干保存的 S_9 ，对间接诱变剂[2AF]具有活化作用， TA_{98} 、 TA_{100} 菌加了2AF而未加 S_9 呈阴性，而加了冻干 S_9 活化的条件下则呈阳性结果，并与新鲜 S_9 比较回变菌落数接近，说明冻干 S_9 仍具有同等活性。

据 Ashwood-Smith 报导^(4,5)， S_9 制剂只有在温度低于-130℃才能达到长期稳定，所以一般 S_9 都只能在液氮或超低温冰箱中保存。遗憾的是我国目前多数基层实验室尚不具备这种条件。液氮保存价格昂贵，超低温冰箱也不是所有实验室都有，而经冷冻真空干燥的 S_9 可在普通冰箱或常温中保存，这就解决了 S_9 的贮藏问题且冻干 S_9 还便于携带或邮购。

冻干保存 S_9 的成功可促成 S_9 商品化，国外目前基本上已达商品化⁽³⁾。 S_9 制剂在美国可向 AMC 癌症研究中心和医院 Litron 实验室，Litton Bionetics 等处购买。在欧洲 S_9 可由西德的化学药物厂提供，而我国 S_9 还没有商品化，一般都是各实验室需用时临时用大鼠经多氯联苯诱导后制得，由于每批制品含量有一定差异，会影响试验结果，而使用冻干 S_9 则可使每次试验采用同一批号的 S_9 ，以利于达到标准化，规范化，使不同样品试验时活化条件相同，有可比性，从而提高了试验和科研工作的质量。

有了商品化的 S_9 ，各基层单位都可向专门机构求购，不必因用量很少而自制。这样可大大减少实验工作人员接触诱导物多氯联苯的机会，因它是强致癌剂，比其他致癌剂也许有更大的潜在危险，所以多次接触无疑是对身体有害的。有了商品化的 S_9 就可使这种危害降低到最小程度，同时也可减少多氯联苯对环境的污染。故冻干 S_9 的成功是一种较理想、经济的保存 S_9 的方法，值得推广利用。

表1 不同保存期冻干S₉对两菌株回变的影响

鉴定时间	菌 株			
	TA ₉₈		TA ₁₀₀	
	自发回变数	阳性物(2AF)	自发回变数	阳性物(2AF)
冻干前	30	1280	260	1320
冻干后24小时	32.5	1305	155	1500
保存一年	28.5	1380	152	1100
保存二年四个月	29.5	946	179	1230

表2 S₉对2AF的活化作用

阳 性 物	菌 株			
	TA ₉₈		TA ₁₀₀	
	自发回变数	+S ₉	+S ₉	自发回变数
2AF	2836	30.5	946	179

表3 冻干S₉与新鲜液氮保存S₉的活化效果比较

新 鲜 S ₉	菌 株		冻干 S ₉ (保存时间)	
	TA ₉₈			
	新 鲜 S ₉	冻干 S ₉ (保存时间)		
1280	1260(24小时)	1320	1500(24小时)	
460	900(二年)	---	---	
960	1380(二年四个月)	800	1100(二年四个月)	

参考文献

1. 温州市卫生防疫站编. 奈瑟氏菌微生物学及其实验室诊断技术. 1977年9月.
2. 黄幸狩, 陈星若主编. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法. 杭州, 浙江科学技术出版社, 1985; 13-42.
3. Maron DM and Ames BN. Revised method the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983; 113: 173.
4. Ashwood-Smith MJ. *Cryobiology*, 1977; 14: 240.
5. Ashwood-Smith MJ. *Mutat Res*, 1980; 69: 199.

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

癌变·畸变·突变 1994年第5卷第3期

可编袖珍计算器在毒理统计分析中的应用

张策泉

上海市防疫站 200335