

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 homogenete 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)诱变性和致癌性的 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 制剂才能长期稳定。故目前国内外 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瓶内,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_0 活性,均达到原来 S_0 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_0)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_0 活化作用下, TA_{98} 、 TA_{100} 菌株回复突变数仍与新鲜 S_0 诱导的回变数接近,而未加 S_0 则不出现阳性,说明 S_0 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_0)是有效的,是一种较为理想和经济的办法,它可解决 S_0 的长期保存和远距离携带问题,最关键的是可促成 S_0 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,长期以来国内国外用于细菌,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_0 ⁽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_0 仍保持其原有活性,表1结果显示了冻干 S_0 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_0 比较,结果一致。这就证明了经冷冻真空干燥后的 S_0 活性不变。冷冻真空干燥保存 S_0 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_0 仍保持其原有活性。

表2结果表明:经冻干保存的 S_0 ,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_0 呈阴性,而加了冻干 S_0 活化的条件下则呈阳性结果,并与新鲜 S_0 比较回变菌落数接近,说明冻干 S_0 仍具有同等活性。

据 Ashwood—Smith 报导^(4,5), S_0 制剂只有在温度低于-130℃才能达到长期稳定,所以一般 S_0 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_0 可在普通冰箱或常温中保存,这就解决了 S_0 的贮藏问题且冻干 S_0 还便于携带或邮购。

冻干保存 S_0 的成功可促成 S_0 商品化,国外目前基本上已达商品化⁽³⁾。 S_0 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_0 可由西德的化学药物厂提供,而我国 S_0 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_0 则可使每次试验采用同一批号的 S_0 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_0 ,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,比其他致瘤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_0 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_0 的成功是一种较理想,经济的保存 S_0 的方法,值得推广利用。

