

丁丽军,奚照寿,袁华根. 蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):185-186.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.050

蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验

丁丽军,奚照寿,袁华根

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:通过 Ames 试验以评价蛋白质修饰粪肠球菌的潜在致突变性。受试物分为 0.05、0.50、5.00、50.00 mg/皿,另设对照组。以鼠伤寒沙门氏菌突变株 TA97、TA98、TA100 和 TA102 为试验菌株,在添加(+)或不加(-)S9 的情况下进行 Ames 试验,计数回复突变菌落数。结果表明,蛋白质修饰粪肠球菌在 +S9、-S9 的情况下,4 株试验菌的平均回变菌落数均小于阴性对照组的 2 倍,且未见剂量-反应关系。蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验结果为阴性,表明该受试物无体外致突变性。

关键词:蛋白质修饰粪肠球菌;Ames 试验;致突变

中图分类号:S816.73 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)24-0185-02

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)又称粪链球菌(*Streptococcus faecalis*),属于 D 群链球菌,是人和动物肠道内主要菌群之一^[1]。粪肠球菌能产生细菌素等抑菌物质,抑制大肠杆菌和沙门氏菌等病原菌的生长,改善肠道微环境^[2];还能抑制肠道内产尿素酶细菌和腐败菌的繁殖,减少肠道尿素酶和内毒素的含量,使血液中氨和内毒素的含量下降^[3]。粪肠球菌作为一种益生菌,在医学和食品工程领域得到广泛应用^[4-5]。粪肠球菌是我国农业部 2013 年《饲料添加剂品种目录》中公布的饲料级微生物添加剂菌种之一。研究发现,饲料中添加粪肠球菌具有提高动物生产性能、改善营养物质代谢和提高免疫功能等作用^[6-9]。蛋白质修饰粪肠球菌是采用某种特殊蛋白对粪肠球菌进行修饰的产品,以期在给予此益生菌的同时能对免疫应答有所增强。本研究通过 Ames 试验以评价其体外致突变性,可为该产品的安全性评价积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2017-07-18

基金项目:江苏省成人高等教育畜牧兽医重点专业建设支持项目(项目编号:11134415001)。

作者简介:丁丽军(1980—),男,江苏海安人,硕士,讲师,从事基础兽医学研究。E-mail:641042228@qq.com。

1.1.1 受试物、试验动物及菌株 受试物为蛋白质修饰粪肠球菌粉, 5×10^9 CFU/g,批号 20141206,由江苏省某生物技术有限公司研制。

SD 大鼠,体质量 200 g 左右,购自扬州大学比较医学中心,动物生产许可证号:SCXK(苏)2012-0004,使用许可证号:SYXK(苏)2012-0029。饲喂经⁶⁰Co 照射饲料,(24 ± 2)℃,湿度(60 ± 20)%,自由采食和饮水,饮水为符合城市饮用水标准的自来水。试验前在试验环境中适应 3 d。

试验菌株:鼠伤寒沙门氏菌突变株 TA97、TA98、TA100 和 TA102,由江苏省疾病预防控制中心提供,试验前经菌株鉴定符合要求。

1.1.2 试剂及配制 阳性对照物:2-氨基苄,纯度 >99%,日本东京化成工业株式会社;敌克松,纯度 98.8%,美国 DIMA 技术有限公司;叠氮钠,纯度大于 98%,美国 Amresco 公司;多氯联苯(Aroclor1254),美国 Crescent Chemical 有限公司。叠氮钠溶解在水中,其他阳性对照物均用二甲基亚砜作为溶剂配制相应浓度溶液。

0.5 mmol/L 组氨酸-0.5 mmol/L 生物素溶液、20%葡萄糖溶液、0.05 mol/L 葡萄糖-6-磷酸溶液、营养肉汤及营养肉汤琼脂培养基、顶层及底层琼脂培养基等,均按食品安全国家标准细菌回复突变试验(GB 15193.4—2014)中规定配制。

参考文献:

- [1]汪峰,许磊. 徐州市畜牧业污染治理及防治对策[J]. 畜牧兽医科技信息,2014(11):13-14.
- [2]杜淑彩. 徐州市大蒜产业发展现状及其套作玉米高产栽培技术[J]. 现代农业科技,2016(23):82,89.
- [3]马丽娜,李峰杰,陈坚,等. 大蒜主要活性成分及药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(6):760-763.
- [4]陈亦辉,王卫东,孙月娥. 洋葱中活性物质及生理药理作用研究进展[J]. 中国调味品,2015,40(4):129-132,140.
- [5]龙凯,谢小梅,方建如. 肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉色素及关键基因

- alb1mRNA 表达的影响[J]. 微生物学通报,2007,34(3):541-544.
- [6]王忠红,李振. 大蒜秸秆对肉兔生产性能的影响[J]. 粮食与饲料工业,2011(2):61-62.
- [7]刘可园,刘郝佳,刘诚刚,等. 大蒜茎秆对肉兔生产性能和免疫功能的影响[J]. 东北农业大学学报,2012,43(6):41-45.
- [8]高淑霞,杨丽萍,张召坤,等. 大蒜秸对生长肉兔的营养价值评定[J]. 饲料研究,2016(11):35-37.
- [9]杨英华. 大蒜秸秆添加剂在蛋鸡生产中的应用研究[J]. 兽药与饲料添加剂,2009,14(4):7-8.
- [10]马玉胜,张照喜. 日粮中添加大蒜茎、叶粉饲喂生长育肥猪的效果[J]. 四川畜禽,1997(5):46-47.

大鼠肝 S9 的诱导和制备:采用多氯联苯(Aroclor1254)作为诱导剂,多氯联苯溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL,按 500 mg/kg 体质量腹腔注射 SD 大鼠,给予正常的饮食和饮水。诱导注射后 5 d,脱颈椎处死。按 GB 15193.4—2014 方法制备 S9 及 S9 混合液。S9 制成后经无菌检查、蛋白含量测定、生物活性鉴定合格后,−80 ℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 增菌培养 将保存的 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株接种于营养肉汤培养基内,37 ℃ 振荡(100 次/min)培养 10 h。该菌株培养物应 1 mL 不少于 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ 活菌数。

1.2.2 平板掺入法 Ames 试验 配制 0.5 ~ 500.0 mg/mL 受试物系列浓度水溶液。

取已融化并在 45 ℃ 保温的顶层培养基 2.0 mL,依次加入受试物溶液 0.1 mL(每皿分别含受试物 0.05、0.50、5.00、50.00 mg)和试验菌株增菌液 0.1 mL(需活化时加 10% S9 混合液 0.5 mL),迅速混匀,倒在底层培养基上,平放固化,37 ℃ 培养 48 h,计数每皿回变菌落数及每处理各皿回变菌落数的平均数。

除受试物各剂量组外,还同时设阴性对照(灭菌水)、二甲基亚砷溶剂对照和阳性对照。阳性诱变剂为:−S9 混合液时 TA97、TA98、TA102 菌株阳性对照物为敌克松,50.0 μg/皿;TA100 菌阳性对照物为叠氮钠 NaN_3 ,1.5 μg/皿。+S9 混合液时 TA97、TA98、TA100 及 TA102 菌均以 2−氨基芴为对照,10.0 μg/皿。每处理 6 个平皿,平行试验 2 次。

1.2.3 结果判定 若受试样品的回复突变菌落数等于或大于阴性对照组 2 倍,且有剂量−反应关系;或某一剂量超过阴性对照组 2 倍以上,呈现可重复的并有统计学意义时,即可认为受试物为诱变阳性。

2 结果与分析

Ames 试验结果,由表 1 可知,阳性对照组引起鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 这 4 株试验菌株的回复突变菌落数明显增加,并远超过阴性对照组的 2 倍以上;而受试品 0.05、0.5、5.0、50.0 mg/皿的各剂量组,在加或不加 S9 活化时,回变菌落数均未超过阴性对照组菌落数的 2 倍,亦无剂量−反应关系。因此,受试品的 Ames 试验结果为阴性。

表 1 蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验

受试物剂量 (mg/皿)	回变菌落数							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	− S9	+ S9	− S9	+ S9	− S9	+ S9	− S9	+ S9
0.05	96.3 ± 7.1	94.4 ± 5.6	31.3 ± 2.4	35.3 ± 5.1	133.3 ± 6.9	130.7 ± 17.2	227.7 ± 36.4	220.0 ± 22.0
0.50	92.7 ± 4.3	99.7 ± 4.9	33.3 ± 3.8	36.0 ± 6.7	143.7 ± 5.6	138.7 ± 19.6	237.7 ± 21.8	222.7 ± 34.9
5.00	97.0 ± 5.3	98.7 ± 5.6	32.7 ± 3.8	36.3 ± 5.8	133.7 ± 21.57	142.7 ± 8.4	234.7 ± 42.2	236.0 ± 19.3
50.00	106.7 ± 9.8	99.0 ± 7.3	35.0 ± 3.3	37.0 ± 4.0	172.3 ± 10.9	135.0 ± 6.7	227.0 ± 17.2	230.7 ± 30.4
阴性对照	99.7 ± 5.8	99.3 ± 3.8	29.7 ± 1.4	33.3 ± 1.8	161.7 ± 12.9	156.7 ± 7.8	239.0 ± 26.0	228.3 ± 14.4
溶剂对照	98.5 ± 6.2	96.4 ± 5.8	34.2 ± 2.3	35.6 ± 5.2	146.8 ± 6.8	152.1 ± 6.5	232.2 ± 15.8	229.3 ± 15.0
阳性对照	440.7 ± 27.8	244.7 ± 14.4	76.3 ± 12.4	79.3 ± 13.1	661.0 ± 32.7	423.3 ± 24.4	854.0 ± 65.0	615.7 ± 42.4

3 结论与讨论

蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验结果为阴性,表明该产品对鼠伤寒沙门氏菌突变试验菌株无致突变作用。

根据农业部新饲料或饲料添加剂安全性评价指南,致突变试验除了 Ames 试验外,还必须进行小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验。在这 3 个试验的基础上,根据试验结果评估是否还需进行其他如显性致死试验等致突变试验。本研究中受试物蛋白质修饰粪肠球菌的 Ames 试验结果虽为阴性,至少还需进行小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,才可对其致突变作用进行基本评价。

参考文献:

[1] Malik R K, Montecalvo M, Reale M R, et al. Epidemiology and control of vancomycin − resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit[J]. Pediatric Infectious Disease Journal,1999,18 (4):352.
[2] David F M, Arthur E B, Gary J N, et al. An investigation of vancomycin − resistant enterococci faecium within the pediatric service

of a large urban medical center[J]. Pediatric Infectious Disease Journal,1998,17(3):184.
[3] 唐晓丹. 肠球菌感染研究现状[J]. 中国感染与化疗杂志,2007, 7(3):221 − 223.
[4] 鲍延娥,董晓芳,佟建明,等. 粪肠球菌益生特性的体外评价[J]. 西北农业学报,2013,22(11):202 − 207.
[5] 马立艳,许淑珍,马纪平. 肠球菌致病机制的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(3):356 − 360.
[6] 史自涛,姚焰础,江山,等. 粪肠球菌替代抗生素对断奶仔猪生长性能、腹泻率、血液生化指标和免疫器官的影响[J]. 动物营养学报,2015,27(6):1832 − 1840.
[7] 魏清甜,李平华,汪涵,等. 粪肠球菌替代抗生素对保育仔猪生长性能、腹泻率、体液免疫指标和肠道微生物数量的影响[J]. 南京农业大学学报,2014,37(6):143 − 148.
[8] 王改玲,宋云杰,高竞铎,等. 畜牧业中 4 种常用有益菌浓度与吸光度的关系[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):274 − 276.
[9] 刘松,董晓芳,佟建明,等. 饲料添加粪肠球菌对蛋鸡生产性能、蛋品质、脂质代谢和肠道微生物数量的影响[J]. 动物营养学报,2017,29(1):202 − 213.