

产品使用说明书 Product Manual

环境中致突变物检测培养基 (Ames 法)

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN261137
中文名称	环境中致突变物检测培养基 (Ames 法)
英文名称	Environmental Mutagen Detection Medium (Ames Method)
产品别名	Ames 法检测环境中致突变物培养基
用途	Ames 法检测环境中致突变物
配方出处	王英明 徐德强.2019.环境微生物学实验教程.北京: 高等教育出版社
上层半固体培养基成分 (g/L) :	
氯化钠 NaCl	5.0
D-生物素 D-biotin	0.0122
L-组氨酸 L-histidine	0.0077
琼脂 Agar	6.0
底层固体培养基成分 (g/L) :	
七水硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
柠檬酸 Citric Acid	2.0
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	10.0
四水磷酸氢铵钠 $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	3.5
葡萄糖 Dextrose	20.0
琼脂 Agar	15.0
pH	7.0
用法:	
1. 配置底层固体培养基: 称取培养基 50.7g, 加入 1000mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装, 115°C 高压灭菌 15 分钟。	
2. 配置上层半固体培养基: 称取培养基 1.102g, 加入 100mL 蒸馏水, 加热煮沸, 搅拌至完全溶解, 分装试管, 每管 3mL, 121°C 高压灭菌 20 分钟。	

产品组成:

本品包含独立包装的上层半固体培养基 50g、底层固体培养基 250g。

相关产品:

营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基)
环境中致突变物检测培养基 (Ames 法)

实验方法和步骤 (供参考):

实验名称: Ames 法检测环境中致突变物

材料和器皿:

1. 菌种

鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株。

2. 培养基

营养肉汤 (牛肉膏蛋白胨液体培养基)

环境中致突变物检测培养基 (Ames 法): 底层固体培养基

环境中致突变物检测培养基 (Ames 法): 上层半固体培养基。

3. 试剂

本品包含的上层半固体培养基, 每 100mL 培养基已提前加入了 1.22 mg D-生物素、0.77 mg L-组氨酸。无需额外配置 0.5mmol/L L-组氨酸与 0.5mmol/L D-生物素混合溶液。

4. 待检物

含联苯或萘等化合物的工业废水提取物(溶于二甲基亚砜, 2~4°C避光保存), 市售染发(稀释 10 倍), 4-硝基-O-苯二胺液(4-NOPD, 200µg/mL), 二甲基亚砜(DMSO), 无菌水。

5. 仪器设备

恒温培养箱, 恒温振荡培养箱, 恒温水浴锅, 灭菌锅。

6. 器皿和其他材料

培养皿, 移液管(1mL 和 5mL), 助吸器, 试管, 不锈钢锅, 煤气灯, 电子点火器, 三角瓶, 无菌圆滤纸片(直径 5mm), 镊子等。

实验方法:

1. 菌悬液的制备

从 TA98 菌株斜面上挑取一环菌苔转接于一含有 3mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管中, 后将此试管置于 37°C 恒温振荡培养箱上 220r/min 振荡培养 10~12h, 使菌悬液浓度达到约 1×10^9 CFU/mL。

2. 倒底层平板

将试验用的底层固体培养基彻底融化, 冷却至约 50°C 后倒 10 块底层平板, 每皿约 15mL。

3. 融化上层半固体培养基

将含有上层半固体培养基的试管置于沸水浴中彻底融化, 然后置于 50°C 恒温水中保温。

4. 倒含菌的上层半固体培养基

用一支 1mL 移液管吸取制备的 TA98 菌株菌悬液, 在上述每支上层半固体培养基试管中加入

0.1mL 菌悬液，并用两个手掌援匀，迅速倒在底层平板上，使其铺满底层，平放待凝。共重复 10 皿。

5. 加待检物

将镊子尖端蘸取乙醇并灼烧灭菌，用此镊子取无菌滤纸圆片并浸入含无菌水的小培养皿中，后将此圆片在皿壁轻碰一下(去除过多无菌水)，最后将此圆片置于上述制备的平板中央，重复 2 皿作为阴性对照。按上述方法将无菌滤纸圆片分别取二甲基亚砷(含或萘等化合物的工业废水提取物的阴性对照)、含联苯或茶等化合物的工业废水提取物(液)染发剂液及 4-硝基-O-苯二胺液(阳性对照)，并分别置于上述制备的平板中央，每个样品均重复 2 皿。

6. 培养

将上述 10 块平板置于 37°C 恒温培养箱中培养 48 h。

7. 消毒和清洗

将菌种管和观察过结果的平板置于沸水中煮 20min 消毒，然后清洗。

结果记录：

1.肉眼观察上述各试验平板中鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株的生长情况。若在滤纸圆片周围长出一圈密集可见的 his⁺回变菌落，可初步认为该待检物为致突变物。如没有或只有少数菌落出现，则为阴性。菌落密集圈外生长的散在大菌落是自发回复突变的结果，与待检物无关。此外，在纸片周围有时形成一透明圈，表明该待检物在一定浓度范围内具抑菌效应。

2.将观察的各试验结果记录于表中。

待检物致病性的检测结果

待检物	实验平板中测试菌生长情况	结论
工业废水提取物		
染发剂		
4-NOPD		
DMSO		
无菌水		

3.拍摄各试验平板中鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株的生长特征。

注意事项：

1.由于某些待检物的致突变性需要哺乳动物肝细胞中的羟化酶系统激活后才能显示而原核生物的细胞内缺乏该酶系统，故在进行试验时需另做一组试验，加入哺乳动物肝细胞内微粒体的酶作为体外活化系统(S9 混合液)，以此提高致突变物的检出率。

2.试验前，须对鼠伤寒沙门氏菌 TA98 菌株进行性状鉴定，以确保其为可靠的纯培养物。

3.倒底层平板时，融化好的培养基应冷却至 50°C，这样可减少平板表面的水膜或微滴，从而防止上层培养基滑动。若能将倒好的底层平板预先在 37°C 过夜，则效果会更好。

4.倒上层半固体培养基时，动作要快，吸取、混匀和铺满底层需在 20s 内完成，否则培养基会凝固。

5.一般来说，一种阳性待检物(某种化合物)对一菌株可表现出致突变性，而对另一菌株可表现

出阴性结果。因此，在检测待检物时，宜采用多个菌株进行试验，任一菌株检出阳性结果，都表明该待检物具致突变性，可能为致癌物。如果多个菌株均未检出阳性结果，则记录为Ames 试验未检出致突变性。

6.《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》(CB15193.4-2014)推荐 5 个菌株，见下表：

部分测试菌株的遗传特性

菌株	组氨酸 His	脂多糖屏障 Rfa	紫外修复 UvrB	生物素 Bio	抗药因子 R	检测突变型
TA1535	-	-	-	-	-	置换, 部分移码
TA100	-	-	-	-	+	置换, 部分移码
TA1537	-	-	-	-	-	移码
TA98	-	-	-	-	+	移码
TA102	-	-	+	-	+	置换, 部分移码

其中 TA102 菌株可用大肠埃希氏菌回复突变试验替代，所用菌株为 WP2uvrA 或 WP2uvrA(pKM101)。

7.鼠伤寒沙门氏菌是一种条件致病菌，试验中所用过的器皿应放入 5%苯酚溶液中消毒或煮沸杀菌，培养基也应经煮沸后弃去。同时操作者也须注意个人安全防护，尽量减少接触污染物的机会。

储存方式：

贮存于避光、干燥处，用后立即旋紧瓶盖；贮存期三年。

注意事项：

- 1.称量时注意粉尘，佩戴口罩操作以避免引起呼吸道系统不适。
- 2.干粉培养基使用后立即旋紧瓶盖，避免吸潮结块。贮存于避光、干燥处。未开封产品保质期三年。开封后根据存放条件的不同保质时间存在一定的差异。

废物处理：

检测之后带菌物品置于 121℃下高压灭菌 30 分钟后处理。

附录：

微生物培养基正确配置方法及注意事项

步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

步骤二：溶解

1.搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水并用玻璃棒小幅度搅拌。

注意：一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

2.加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热**；相反**含有琼脂**，需要用**本生灯/电磁炉加热煮沸**。

注意：

(1) 琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

(2) 不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

(3) 琼脂溶解不充分导致非常严重的后果，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。

3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，**防止焦化**。

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。

注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

①其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

步骤三：调培养基 pH

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

(1) 如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸**。

(2) 然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠**或 **1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4 ~ 7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需要将 pH 调至比要求值高 0.1 ~ 0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~ 0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

步骤四：培养基过滤

1.如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。

2.培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121°C 高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

步骤五：培养基分装

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。

用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37°C 培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

(1) 高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121°C 十五分钟

②对于大份：121°C 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115°C/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化**。

(2) 煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

(3) 过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

(1) 倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。

(2) 在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。

(3) 试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。

(4) 不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开灭菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高，否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水；温度太低，培养基容易凝固成块状，不能做成平板。

2.倒平板时，要靠近酒精的火焰（以此防止外来细菌落入盘中）。左手托住培养皿，右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞，烧灼烧瓶口，用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝，直到烧瓶口刚好伸进去，倒入培养基，直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一，迅速盖上盖子，放在桌上后轻轻旋转培养皿，使培养基分布均匀，凝结后即可。24 小时后检查，如培养基未长杂菌，即可用来培养微生物。

步骤八：培养基摆斜面

灭菌完成后，将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上，并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。（斜面长度不超过试管的二分之一）

步骤九：微生物培养基质检

1. 检验培养基灭菌后，若发现有破损，浸水，颜色异常，棉塞被培养基污染。所有这些问题，都必须丢弃，不能重复使用，并确定其最终 pH 值。

2.无菌检查和效果检查也是必需的。

(1) 无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基，37°C 孵育一两天，确认无细菌生长。

(2) 效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格，准备好的培养基就可以使用了。