

Ames 测试不确定性分析

刘波 金建玲 张辉 高培基*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 Ames 测试具有实验周期短、简便的优点,是目前普遍采用的检测化合物致突变性的初筛方法,但 Ames 测试仍有一定的不确定性.本文主要依据本实验室的研究结果分析了 Ames 测试中测试菌株、统计回复子数目的时间及 2 倍判定标准给测试结果带来的不确定性,对影响 Ames 测试结论存在假阳性及假阴性的因素做了进一步分析与讨论.图 6 表 1 参 19

关键词 Ames 测试;致突变物;致癌物;假阴性;假阳性

CLC Q93-3 : X171.5

Uncertainty of Ames Test

LIU Bo, JIN Jianling, ZHANG Hui & GAO Peiji*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Ames test was widely used to detect and predict the mutagenicity of chemicals, but it had many uncertain factors. In this article, some factors leading to uncertainty of the Ames test were revealed, such as the test strains, time to count the number of revertant colonies, two-fold rule calculating the possibility of mutagenicity and quantity of histidine in the tested materials. The potential factors resulting in false negative and false positive were investigated. Fig 6, Tab 1, Ref 19

Keywords Ames test; mutagen; carcinogen; false negative; false positive

CLC Q93-3 : X171.5

20 世纪 40 年代后期, Auerbach 和 Robson^[1]曾指出“化学物质可能是很强的诱变剂”,引起了人们普遍的关注.这些关注导致了 20 世纪 60、70 年代与环境监测有关机构的成立以及一系列检测环境致突变物、致癌物方法的建立^[2].

致突变物、致癌物通常采用 Ames 于 1966 年建立并不断改进、完善的沙门氏菌/微粒体回复试验,即借助化学物质的致突变作用(损伤遗传物质 DNA 的能力)鉴定化学致癌物和致突变物.致突变物能使测试菌株回复突变成野生型的能力大大提高,明显高于阴性对照,并伴有剂量-效应关系^[3].由于该法实验周期短、简便,是目前世界上各个实验室普遍采用的检测环境来源的大量潜在致癌物的通用初筛方法之一^[4].

自 Ames 测试建立以来,不断有学者对其进行了各方面的改进,Ames 测试的准确性、有效性也得以不断提高,并日益被广泛采用.但至今该测试仍只是一个有效但不完美的检测致突变物的方法,该测试在试验设计、试验过程及试验结果判定上都存在一定疑问和不确定性因素.例如估计一个微生物群体的自发突变率和诱发突变率在遗传理论上和试验技术上都是一个涉及多方面因素的复杂性难题;诱发突变率的估计涉及到对两个正态分布的混合分布的估计,它需要大量的样本,但 Ames 测试中样本数(测定回复突变的培养皿数)均较小,无法用条件矩估计等方法测定混合分布的参数^[5];DNA 发生突变的随机性和诱发因素的相关性更是遗传机理上尚未阐明的难题;另外用 Ames 测试检测中药制剂的微生物致突变作用是否适当,更是目前亟待解决的问题.本文对本实验室在 Ames 测试中遇

到的难题和开展的系列研究结果做一简介和讨论.

1 试验材料及方法

1.1 材料

试验中所用菌株为 Ames 测试菌株 *Salmonella typhimurium* TA100 (*hisG46*, *rfa*, *bio*, Δ *uvrB*, pKM101),由山东省疾病预防控制中心赠送. DNA 测序仪为 ABI 3700,所用中药购于济南建联中药有限公司,并采用传统煎煮法^[6]制成每 mL 含 1 g 生药的药液.

1.2 方法

1.2.1 TA100 回复子 *hisG46* 位点扩增、测序及序列比对

据 GenBank 中 TA100 的全基因序列设计引物扩增 TA100 的 *hisG46* 位点,PCR 扩增产物为 425 bp, *hisG46* 位点位于第 200 bp 左右. PCR 扩增产物用 ABI 3700 测序仪测序后,以 DNA-MAN 软件比对回复子序列与 TA100 相应的 DNA 片段序列间的差异.

1.2.2 Ames 测试检测中药的致突变性 取 0.1 mL 于 37 °C、200 r/min 过夜培养的 TA100 菌液涂布含中药的 MM 平板(含有痕量组氨酸)和不含中药的对照 MM 平板,涂布均匀后于 37 °C 恒温箱培养 48 h 后进行菌落计数,统计含药平板和对照平板上的 His⁺ 回复子的数目.

2 Ames 测试中不确定因素的分析

2.1 Ames 测试菌株及致突变物的类型

Ames 测试菌株的类型、数目及检测出的致突变物种类、数量逐渐增加^[4],但 Ames 测试仍只能检出引起少数几个碱基变化导致突变(碱基置换突变、移码突变)的致突变物;而对于导

致染色体较链、DNA 链断裂及染色体大段缺失而引起突变的致突变物或物理因子,则无法检测它们的致突变性^[2]。这样就产生了一个严重的问题:对于一个致突变性未知的物质并用目前已有的全部 Ames 菌株检测,其检测结果仍都表现为阴性,显然也不能由此判定该物质无致突变性,原因之一在于目前还没有合适的菌株可以检测它是否具有致突变性。这种“以真作假”的检测和判断失误对于广泛应用的致突变性检测的首选方法无疑会造成检测真实致突变物的致命性失误。

Ames 等人不断地改进测试菌株以便能成功地检测出更多的致突变物,当然构建出一个可用于检测各种类型致突变物的菌株是不可能的,而多种适用于检测致突变物菌株的出现又大大地增加了测试过程的复杂性。

2.2 定点突变与多点突变(以 TA100 为例来说明)

在 Ames 测试中有且只有在 *hisG46* 位点发生有义突变,TA100 才能发生回复而成为原养型。而致突变物在 DNA 上的作用位点不仅仅限于 *hisG46* 位点,还能作用于其它位点,所以 Ames 测试中组氨酸回复子的产生具有随机性,致突变物的致突变效应强弱是通过随机事件表现出来的,这样并不能直接、准确判定致突变物的致突变能力。

2.3 基因型与表型

Ames 测试中测试菌株 TA100 检测能导致碱基置换的致突变物,其 *hisG46* 位点产生突变(—GAG—→—GGG—)使得 TA100 由野生型(非组氨酸缺陷型)突变成组氨酸缺陷型,突变后的 TA100 经自发或诱发回复为原养型(非组氨酸缺陷型),但回复子基因型与野生型基因型可能不同。由组氨酸缺陷型回复突变为原养型,其基因型有以下几种变化:1) CCC→ACC, 2) CCC→TCC, 3) CCC→GCC, 4) CCC→CTC, 5) CCC→CAC, 6) tRNA 水平上基因间抑制突变,如图 1 所示。

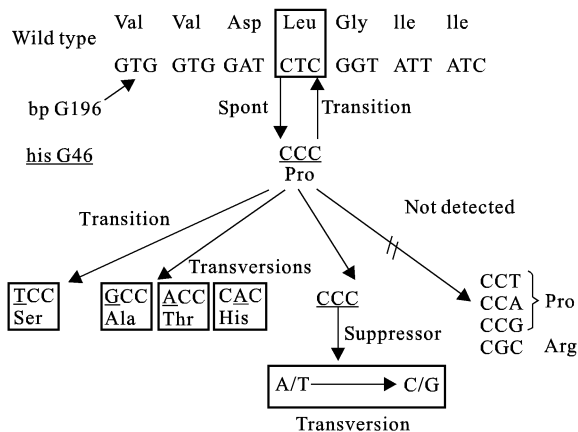


图1 *hisG46* 位点碱基置换类型与回复子基因型
Fig.1 Types of base substitution at *hisG46* locus and genotypes of revertants

从上述分析可以看出,Ames 测试涉及到基因型与表型的问题:以回复子的出现来反映 DNA 的变化,即以表型来推测基因型。而表型决定于基因型和环境因素的相互作用,因此,回复子可能并不是由于基因型发生了改变而是环境或培养基中一些因子影响、改变了 TA100 的正常生理代谢调控而产生的,这就使得 Ames 测试机理的正确性受到质疑,回复子的出现一定是 DNA 序列发生相应的改变么?

为了验证 Ames 测试中基因型与表型是否对应,我们采用标准 Ames 测试方法分别从含有银杏叶、杜仲和黄芩、阳性诱变剂(NaN_3)及阴性对照(水)的 GM 平板上挑取一定数量的回复子。PCR 扩增含有 *hisG46* 位点的基因片段并测序后,比较不同试验材料处理后的 TA100 目的序列(*hisG46* 位点)的差异性,来对 Ames 测试的合理性及中药致突变性与否做出判断。回复子 *hisG46* 位点测序结果分别见表 1。

表 1 不同生境下 *hisG46* 位点各回复类型所占百分比

Table 1 Percent of types of reversion at *hisG46* locus under different environmental conditions

回复子类型 Types of revertant	TCC	CTC	ACC	CAC	GCC	CCC
叠氮钠 NaN_3	9.1	18.2	23.6	47.3	1.8	0
H_2O	4.1	12.3	30.1	53.4	0	0
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	9.5	4.8	19.0	66.7	0	0
黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	10.9	12.7	27.3	49.1	0	0
银杏叶 <i>Ginkgo biloba</i>	10.8	10.8	38.5	40.0	0	0

从试验结果看,TA100 回复子的基因型与理论情况相同,即基因型决定了表型。回复子的出现是由于 DNA 序列(*hisG46* 位点)发生了相应变化,说明了 Ames 测试的合理性。

由于原核生物之间信号传递、染色体结构、基因表达机制复杂性远低于真核生物使得基因型能直接地决定表型,TA100 回复子基因型与表型之间有着很高的一致性。但是怎样在诱发突变的 TA100 群体中定量检出这些回复子并做出是否致突变作用的推断却还存在着一系列影响因素。

2.4 培养时间与回复子数

在标准 Ames 测试中,从倾倒入上层琼脂至统计回复子数的时间为 48 h。回复子是假定每个发生突变的细胞都可分裂、繁殖形成一个菌落即 CFU (Colony forming units)而计数的,但在一个发生分裂、繁殖的细菌群体中,回复突变何时发生具有随机性,可计数的回复子菌落数目及大小并不是同一时间出现而是随时间变化的(图 2)。我们还观察到,Ames 测试中在可见的菌落周围存在大量微菌落,这些微菌落可能也是由回复子繁殖形成但受培养条件、时间和自身生理状态的影响而没有形成肉眼可见的菌落,可见菌落及微菌落分别见图 3、图 4。由于目测一般只能分辨出 $d > 1 \text{ mm}$ 的菌落,因而微菌落是无法统计的。同时在 Ames 测试中只添加了痕量的组氨酸,测试菌株基本上组氨酸饥饿状态,这也可能涉及到适应性突变的问题^[7],适应性突变而形成的回复子数目随着培养时间的延长也会逐渐增多。因此,CFU 是培养时间的函数,人为规定 48 h (或其它时间)必然会得出不同的结果。这样,在 Ames 测试中统计回复子数目的时间标准,实际上就成为了一个“约定俗成”的惯例,而失去了其应具有的科学内涵。

2.5 Ames 测试中的统计标准

Ames 测试是以试验组中的回复子数大于或等于阴性对照中回复子数 2 倍的标准来判定被检测物的致突变性。这个判定标准不是经科学的统计学方法确定的,而是经验性的^[8],统计过程简单、方便。但对于自发回复率低的菌株(TA98)来说易产生假阳性结果;对于自发回复率高的菌株(TA100、TA102)来说易产生假阴性结果^[9];对于相同的试验数据采用 2 倍标准和其他统计分析法有时会得出相矛盾的判定^[5]。

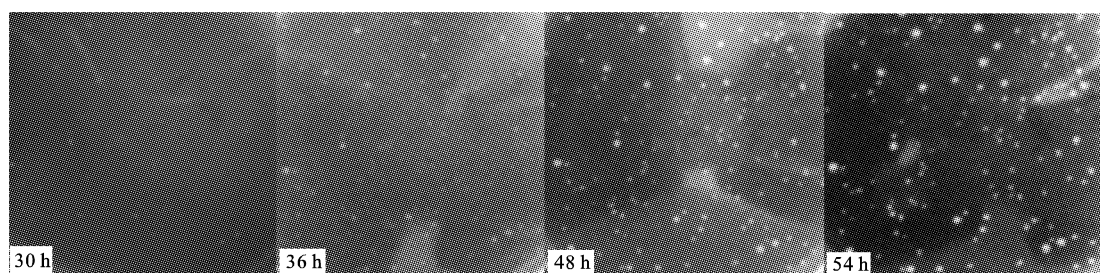


图2 不同培养时刻(30 h、36 h、48 h、54 h)平板上的可见菌落
Fig.2 Colonies on plates at different incubation times (30 h, 36 h, 48 h, 54 h)

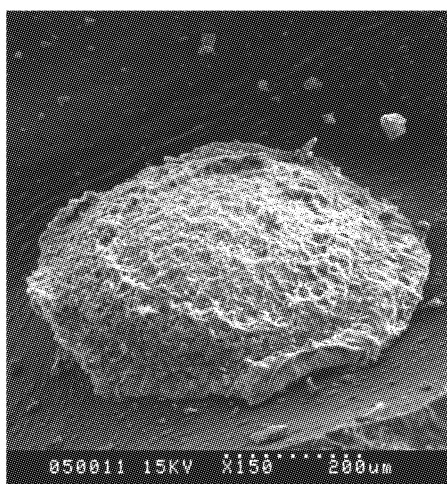


图3 可见菌落及其周围的微菌落
Fig.3 Colony and micro-colonies around

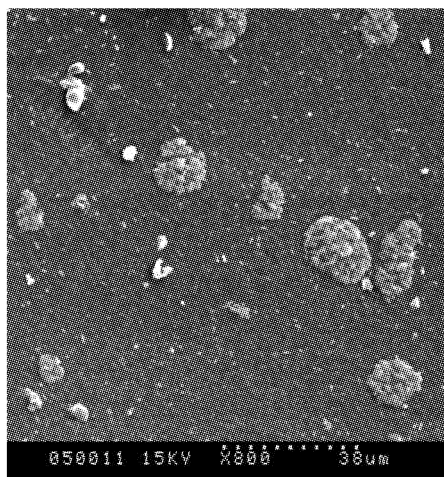


图4 散在的微菌落
Fig.4 Dispersed micro-colonies

通常认为,自发突变率在分批培养条件下微生物群体中近似呈正态分布,但诱发突变往往是偏离正态分布的^[10],对二者进行比较都需大样本和进行正态分布符合度的检验^[5, 8, 9],显然这都是标准 Ames 测试中所用小样本条件下无法进行分析的.因此,要提高判定的准确性必须要增加样本数.但作为一个初筛方法,为达到统计要求而增加测试样本数(样本数增加到至少 25 皿、3 次重复等)则难以被接受.不少学者意识到了

Ames 测试中 2 倍标准存在的缺陷并提出了一些修正方案,但目前对于 Ames 测试结果的判定仍没有一个准确、被普遍接受的方法.

2.6 致突变物的胞外浓度与胞内浓度

在 Ames 测试中以“回复子数/nmol”来指示致突变物的致突变能力,其中致突变物浓度是以环境、培养基中的浓度(胞外浓度)而不是以胞内浓度来计算.细胞膜是细胞与细胞外环境之间一种选择性通透屏障,它严格地控制着物质的进出,具有选择性的通透作用.细胞膜的选择性的通透作用使得特定物质在细胞膜内外的浓度存在很大差异.如果对 DNA 损伤弱的致突变物在细胞膜上有特异性的通道,则该致突变物的胞内浓度大大高于胞外浓度,Ames 测试结果表现为强阳性;在细胞膜上没有相应的通道、对 DNA 损伤强的致突变物,其胞内浓度可能会远低于胞外浓度,Ames 测试结果表现为弱阳性.因此,以致突变物的胞外浓度来衡量致突变物的致突变能力不够确切而应以胞内浓度来衡量,以“回复子数/nmol”来指示致突变物的致突变能力是不恰当的.

2.7 Ames 测试检测含组氨酸的物质致突变性

Ames 测试菌株是组氨酸依赖型突变体,Ames 测试的培养条件尤其是培养基中组氨酸含量是影响回复子数目的关键因素.为此,我们检测了培养基中组氨酸含量与 TA100 回复子数目的关系,结果见图 5.

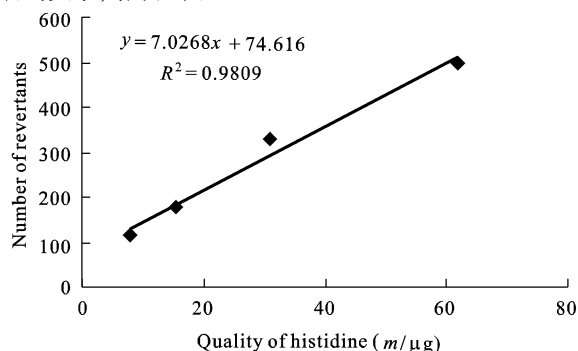


图5 组氨酸含量与 TA100 回复子数的关系
Fig.5 Relationship between the quantity of histidine and number of revertants

如图 5 所示,TA100 的回复子数目与上层琼脂中组氨酸含量在一定范围内有很高的相关性.因此,以 Ames 测试检测含有组氨酸的物质的致突变性时需要考虑其中组氨酸对测试结果的影响,但目前诸多测试含有组氨酸的物质致突变性时都没有考虑组氨酸的问题^[11, 12],这些物质的致突变性测试结果

都是值得商榷的。

用标准 Ames 测试检测中药的致突变性试验中发现有多种中药具有致突变性^[11, 12], 这些结果严重挑战了传统中药用途广且毒性和不良反应小的观点. 对于同一种中药的致突变性用标准 Ames 测试的结果有时甚至相互矛盾^[11], 这种相互矛盾结论究其主要原因在于不同产地的中药成分可能存在差异, 其

中组氨酸含量的差异对检测结果尤显重要. 有研究结果表明, 被检测物中组氨酸会严重影响 Ames 测试结果的准确性, 结果易于出现假阳性的结果^[13, 14].

为了检测中药真实的致突变性及中药中组氨酸对测试的影响, 我们检测了一部分中药在扣除其所含组氨酸前后的致突变性. 图 6 为在标准 Ames 测验条件下多种中药的致突变性.

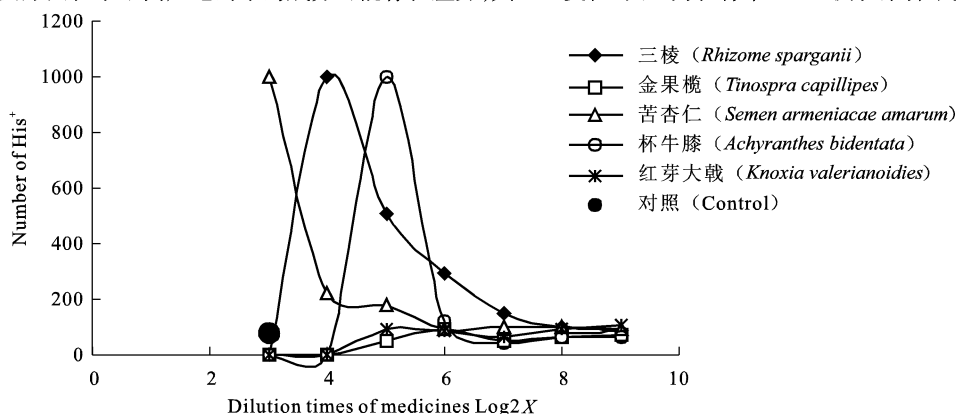


图 6 几种中药的致突变性
Fig.6 Mutagenic effect of some herbal medicines

图 6 显示, 在标准 Ames 检测条件下, 苦杏仁、三棱、杯牛膝试验组回复子数目大于阴性对照组的 2 倍, 为阳性结果。

由于回复子数目与培养基中组氨酸含量正相关, 所以对于致突变性检测结果为阳性的中药 (苦杏仁、三棱、杯牛膝), 它们所含组氨酸的量 (游离态和结合态) 可能会影响测定的结果. 为此, 我们用氨基酸仪测定了苦杏仁中组氨酸含量, 并应用软件 SPSS12.0 对苦杏仁内的组氨酸含量与回复菌落数目进行相关性和回归分析, 结果显示, 试验组中回复子数的增加主要是由于苦杏仁内含有组氨酸的缘故, 而其本身的致突变效应较小. 同样, 扣除组氨酸影响后, 中药三棱、杯牛膝的致突变性结果也会被修正为阴性。

在标准的 Ames 测试中, 要求被测试物不应应对测试菌株生长产生有利或有害影响, 以使得试验组与阴性对照组中测试菌株的分裂次数相同, 只有在这个前提下阴性对照才有意义. 然而从上述中药的致突变性检测试验可以看出, 中药或其它药物对细菌的生长和突变可能会有多种作用, 由生理效应导致的抑制或促进菌体生长、直接或间接诱发某一点或多点突变, 并由最终群体生长造成的表型效应来推断其致突变效应是相当复杂的过程, 此过程中试验组与阴性对照组中测试菌株的分裂次数是不相同的, 阴性对照实际上缺乏可比性。

为了用 Ames 测试来检测成份复杂物质的致突变性, 同时避免其中组氨酸带来的假阳性的问题, 目前主要有 3 种方案: 一是去除检测物中的组氨酸后再用标准 Ames 测试检测^[15]; 二是检测物不需预处理而是对 Ames 测试做改进^[16]; 三是在阴性对照组加入与检测物中组氨酸总量相当后再用标准 Ames 测试检测. 这 3 种方案表面上消除了组氨酸的影响, 但实际上也降低了试验的灵敏性, 使检测结果仍不准确。

2.8 假阴性及假阳性结论的影响因素

Ames 等人用检测了已知的 300 种致癌物, 结果显示 90%

已知致癌物的 Ames 测试结果显示有致突变性^[17], 说明物质的致癌性与诱变性有相当高的相关性. Ames 测试能较好地预测物质是否具有致癌性. 但同时也说明 10% 的致癌物在 Ames 测试中是阴性的、没有致突变性, 即 Ames 测试存在假阴性结果. 在 108 种非致癌物中 14 种 (13%) 的 Ames 测试结果为阳性, 这也说明了 Ames 测试存在假阳性结果^[17]. 但是在上述的 300 余种化合物的“致癌性”并非全都来自动物试验的直接结果, 大都是基于细胞水平、染色体水平和 DNA 水平上的“in vitro”的试验结果, 它们与诱发致癌之间的因果关系是相当复杂的, 显然这些物质的致癌性与否仍然限于统计推断的分析。

上述 Ames 测试结论建立在统计推理过程简化了的 2 倍标准基础上, 300 多种致癌物和 100 多种非致癌物的判定也是基于统计、归纳、推理的结果, 而统计推理方法又具有“统计方法揭示可能有某种规律性的东西存在, 而不涉及事物的质的规定性”, “统计规律未必蕴含因果关系”^[18] 的本性, 以上三方面原因必然会使得物质致癌性与致突变性的判定导致出现假阴性和假阳性的结论. 应用 Ames 测试的结果推断致突变物的致癌潜在危险性是其主要目的, 但也是最难做出推断之处。

Ames 测试中假阴性或假阳性的结论都会带来负面影响. 对于结论为假阴性的物质, Ames 测试结果导致失去预测其是否具有致癌性的潜力进一步研究, 这将是极其危险的. Ames 测试为假阳性的物质, 其致突变性、致癌性会被其它测试检测出来, 但这个过程耗费了大量的人力、物力。

Ames 测试中一些因素和环节会导致假阴性、假阳性结论, 以下分析了可能引起 Ames 测试假阴性和假阳性结论的因素。

2.8.1 影响假阴性结论的因素 (1) Ames 测试菌株测定突变剂类型的有限性, 已论述. (2) 被检测物的有效浓度: Ames 测试要求是在被检测物不对菌株产生毒性的浓度进行的, 而被检测物的致突变性作用需要该物质进入菌体并与菌体内的相关成分相互作用后才能检测出来, 即被检测物的致突变效

应与它在菌体内甚至在核区的有效浓度有关。被检测物对测试菌株有很强的毒性,用 Ames 测试该物质的致突变性时只能在较低的浓度水平下进行,这也使得菌体内该物质的有效浓度很低,其诱变效应可能不能显示出来,Ames 测试结果为阴性,亦即出现了假阴性的结果。(3) 被检测物的致突变性、致癌性的测试体系不同测试物质致癌性使用啮齿动物系统,而 Ames 测试则是原核生物体系。致癌物在原核生物体系中不能被有效地活化而表现为无致突变性^[19],两种体系含有的酶系及代谢系统的差异性使得检测结果有所不同。(4) 致癌与致突变的机制差异性致癌的机制可能会多于致突变的机制,突变的产生均来源于 DNA 序列的改变而癌症的产生并不仅限于此,一些激素因子通过影响细胞的代谢、分裂、生长等环节而不是改变 DNA 序列导致癌症的产生。对于此类物质,Ames 测试结果是阴性的,而啮齿动物致癌性检测结果则为阳性。

2.8.2 影响假阳性结论的因素 致突变性、致癌性测试的试验体系不同导致假阳性结论:(1) 这两种体系含有的酶系及代谢系统的差异性使得检测结果不同,有些化合物能被原核生物酶系或代谢系统活化而不能被啮齿动物有效活化,在 Ames 测试结果为阳性、致癌性测试结果为阴性。(2) 当原核生物细胞(单细胞生物)遭受不利因素作用时,其选择突变以使自己得以存活;而真核生物(大部分为多细胞结构)的某一或某些细胞遭受不利因素作用发生变异后,这些变异的细胞往往会死亡而保住整个生物体的原有性状。当环境中致突变物存在时,TA100 可能就会发生突变,Ames 测试表现为阴性;而啮齿动物的某些细胞也可能发生变异、表达不寻常的产物,但这些细胞可能会被生物系统的一些防御机制吞噬而死亡,整个动物体也就不会表现为患癌的状态,啮齿动物致癌性测试就表现为阴性。被检测物的营养成分(含有组氨酸),已论述。

Ames 测试目前是一种快速有效检测致突变物的生物学短期试验,因其能很好地预测致癌物(能有效检测 90% 的致癌物)而在国际上得到广泛认同,但仍有较多的因素限制了该测试结果的有效性,甚至出现假阳性和假阴性的结果。我们分析了 Ames 测试中导致测定结果不确定性的因素,正在探索建立一种诸如 Ames 测试一样快速、有效但测试结论更准确的测试方法。从发展的角度来看,Ames 方法检测化合物和物理因素致突变性的目的是推断其致癌的潜在危险性。现代分子生物学技术的有效应用可望对物质或因素的致突变性在 DNA 水平上能有效检出,但不能由此推断突变与诱发致癌的因果关系,这涉及癌症起因的复杂机理,已超出本文所讨论的范围。

References

- 1 Auerbach C, Robson JM. The chemical production of mutations. *Science*, 1947, **105** (2723): 243 ~ 247
- 2 Macgregor JT, Casciano D, Müller L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mut Res*, 2000, **455**: 3 ~ 20
- 3 Mortelmans K, Zeiger E. The Ames salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mut Res*, 2000, **455**: 29 ~ 60
- 4 陈祖辉, 张湘桥. 生物学短期试验. 北京: 人民卫生出版社, 1982
- 5 Gao PJ (高培基). Some questions on the Ames test. *Environ Sci* (环境科学), 1983, **8** (6): 81 ~ 83
- 6 周帮靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1986
- 7 Foster PL. Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu Rev Genet*, 1999, **33**: 57 ~ 88
- 8 Takanashi H, Urano K. Statistical procedures for estimating the detection limit and determination limit of the Ames Salmonella mutagenicity assay. *Sci Environ*, 1998, **221**: 31 ~ 42
- 9 Cariello NF, Piegorsch WW. The Ames test: The two-fold rule revisited. *Mut Res*, 1996, **369**: 23 ~ 31
- 10 Liu CY (刘垂玕). Estimation of the microbial mutation rate. *Sci China Series B* (中国科学 B 辑), 1983, **7**: 625 ~ 633
- 11 Zhang JQ (张建清), Su CY (苏诚玉), Quan YL (权玉玲), Liu CL (刘春来), Lan H (蓝弘). A study on acute toxicity and mutation of four kinds of hematonic Chinese medicine. *Mod Prev Med* (现代预防医学), 1999, **26** (1): 26 ~ 28
- 12 Zhang CY (张春颖), Zhou ZM (周钟鸣). Progress in the study on mutagenicity of some familiar traditional Chinese medicine. *Chin J Inform Trad Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2001, **8** (3): 20 ~ 24
- 13 Prival M, Simmon VF, Motelmans KE. Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. *Mut Res*, 1991, **260**: 321 ~ 329
- 14 Nylund L, Einistö P. Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/Salmonella plate incorporation test and the fluctuation test. *Mut Res*, 1993, **272**: 205 ~ 214
- 15 Aeschbacher H, Finot PA, Wolleb U. Interactions of histidine - containing test substances and extraction methods with the Ames mutagenicity test. *Mut Res*, 1983, **113**: 103 ~ 116
- 16 Thompson C. Modified bacterial mutation test procedures for evaluation of peptides and amino acid-containing material. *Mutagenesis*, 2005, **20** (5): 345 ~ 350
- 17 McCann J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1976, **73** (3): 950 ~ 954
- 18 陈希孺. 机会的数学. 清华大学出版社, 暨南大学出版社, 2000
- 19 Stoltz DR, Poirier LA, Irving CC, Stich FF, Weisburger JH, Grice HC. Evaluation of short-term tests for carcinogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1974, **29** (2): 157 ~ 180