



中华人民共和国国家标准

GB 15193.5—2014

食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验

2014-12-24 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 15193.5—2003《骨髓细胞微核试验》。

本标准与 GB 15193.5—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验”;
- 修改了范围;
- 增加了术语和定义;
- 增加了试验报告;
- 增加了试验的解释;
- 修改了试验目的和原理;
- 修改了实验动物;
- 修改了给予程序;
- 修改了标本制作;
- 修改了阅片的内容。

食品安全国家标准

哺乳动物红细胞微核试验

1 范围

本标准规定了哺乳动物红细胞微核试验的基本试验方法和技术要求。
本标准适用于评价受试物的遗传毒性作用。

2 术语和定义

2.1 微核

细胞有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时,仍留在细胞质中的整条染色单体或染色体的无着丝断片或环。在末期单独形成一个或几个规则的次核,被包含在细胞的胞质内而形成。

2.2 着丝粒

在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域,以使子染色体有序移动到子细胞两极。

2.3 正染红细胞

成熟的红细胞,其缺乏核糖体并可用选择性核糖体染料与未成熟的嗜多染红细胞区分。

2.4 嗜多染红细胞

未成熟的红细胞处于发育的中间期,仍含有核糖体,故可用选择性核糖体染料与成熟的正染红细胞区分。

2.5 总红细胞

正染红细胞和嗜多染红细胞的总和。

3 试验目的和原理

哺乳动物红细胞微核试验通过分析动物骨髓和(或)外周血红细胞,用于检测受试物引起的成熟红细胞染色体损伤或有丝分裂装置损伤,导致形成含有迟滞的染色体断片或整条染色体的微核。这种情况的出现通常是受到染色体断裂剂作用的结果。此外也可能在受到纺锤体毒物的作用时,主核未能形成代之以一组小核,此时小核比一般典型的微核稍大。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

解剖器械、生物显微镜、载玻片等。

4.2 试剂

注：全部试剂除注明外均为分析纯，试验用水为蒸馏水。

4.2.1 小牛血清：小牛血清滤菌后放入 56 °C 恒温水浴保温 1 h 进行灭活。通常储存于 4 °C 冰箱里。亦可用大、小鼠血清代替。

4.2.2 Giemsa 染液：称取 Giemsa 染料 3.8 g，加入 375 mL 甲醇研磨，待完全溶解后，再加入 125 mL 甘油。置 37 °C 恒温箱保温 48 h，期间振摇数次，取出过滤，两周后可用。

4.2.3 Giemsa 应用液：取一份 Giemsa 染液与 6 份磷酸盐缓冲液混合而成。现用现配。

4.2.4 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)：

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	4.50 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	11.81 g
加蒸馏水至	1 000 mL

4.2.5 甲醇。

5 试验方法

5.1 受试物

5.1.1 受试物的配制：应将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中，首选溶媒为水、不溶于水的受试物可使用植物油(如橄榄油、玉米油等)，不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应现用现配，有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

5.1.2 给予途径：应采用灌胃法。阳性对照物也可采用腹腔注射的方法。灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重，如为水溶液时，最大灌胃体积可达 20 mL/kg 体重；如为油性液体，灌胃体积应不超过 4 mL/kg 体重；各组灌胃体积一致。

5.2 实验动物

5.2.1 动物种、系选择：在利用骨髓时，推荐使用小鼠或大鼠。利用外周血时，推荐用小鼠。如果已经证实某品系动物脾脏不清除有微核的嗜多染红细胞，或对引起染色体结构或数目畸变的化学物检测有足够的敏感性，则此种动物可以利用。通常用 7 周龄~12 周龄，体重 25 g~35 g 的小鼠或体重 200 g~300 g 的大鼠，在试验开始时，动物体重差异应不超过每种性别平均体重的 ±20%。每组用两种性别的动物至少各 5 只。

5.2.2 动物准备：试验前动物在试验动物房应进行至少 3 d~5 d 环境适应和检疫观察。

5.2.3 动物饲养：实验动物饲养条件、饮用水、饲料应符合国家标准和有关规定(GB 14925、GB 5749、GB 14924.1、GB 14924.2、GB 14924.3)。每个受试物组动物按性别分笼饲养，每笼 5 只。试验期间实验动物喂饲基础饲料，自由饮水。

5.3 剂量

受试物应设三个剂量组，最高剂量组原则上为动物出现严重中毒表现和(或)个别动物出现死亡的剂量，一般可取 1/2 LD₅₀，低剂量组应不表现出毒性，分别取 1/4 LD₅₀ 和 1/8 LD₅₀ 作为中、低剂量。急性毒性试验给予受试物最大剂量(最大使用浓度和最大灌胃容量)动物无死亡而求不出 LD₅₀ 时，高剂量组则按以下顺序：

- 10 g/kg 体重；
- 人的可能摄入量的 100 倍；
- 一次最大灌胃剂量进行设计，再下设中、低剂量组。另设溶媒对照组。阳性对照物可用环磷酰

胺 40 mg/kg 体重经口或腹腔注射(首选经口)给予。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 受试物给予

经口灌胃。根据细胞周期和不同物质的作用特点,可先做预试,确定取材时间。常用 30 h 给受试物法。即两次给受试物间隔 24 h,第二次给受试物后 6 h 采集骨髓样品。试验还可以有以下 2 种采样方式:

- a) 以受试物 1 次给予动物。以适当的间隔采集骨髓样品至少 2 次,开始不早于给予后 24 h,最后不晚于给予后 48 h。早于给予后 24 h 的采样,应说明理由。外周血采样以适当的间隔至少 2 次,开始不早于给予后 36 h,最后不晚于给予后 72 h。如在一个采样时间发现阳性结果,则不需要进一步采样。
- b) 每天 1 次给予,共 2 次或多次(间隔 24 h)给予,可在末次给予后 18 h~24 h 之间采集骨髓 1 次,对外周血可在末次给予后 36 h~48 h 之间采样 1 次。若选用外周血正染红细胞的含微核细胞率作为试验观察终点,动物给予的时间应达 4 周以上。

5.4.2 标本制作

5.4.2.1 骨髓样品:处死后取胸骨或股骨,用止血钳挤出骨髓液与玻片一端的小牛血清混匀,常规涂片,或用小牛血清冲洗股骨骨髓腔制成细胞悬液涂片,涂片自然干燥后放入甲醇中固定 5 min~10 min。当日固定后保存。将固定好的涂片放入 Giemsa 应用液中,染色 10 min~15 min。立即用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液或蒸馏水冲洗、晾干。写好标签,阴凉干燥处保存。

5.4.2.2 外周血样品:从尾静脉或其他适当的血管采集外周血,血细胞立即在存活状态染色或制备涂片并染色。为排除与使用非 DNA 染料相关的人工假象可利用 DNA 特异性染料(如吖啶橙或 Hoechst33258 加 Pyronin-Y)。这种方法的好处是不会排除常用染料(如 Giemsa)的使用。

5.4.3 阅片

5.4.3.1 选择细胞完整、分散均匀,着色适当的区域,在油镜下观察。以有核细胞形态完好作为判断制片优劣的标准。

5.4.3.2 本方法系观察嗜多染红细胞的微核。用 Giemsa 染色法,嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈粉红色。典型的微核多为单个的、圆形、边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,直径通常为红细胞的 1/20~1/5。

5.4.3.3 对每个动物的骨髓至少观察 200 个红细胞,对外周血至少观察 1 000 个红细胞,计数嗜多染红细胞在总红细胞中比例,嗜多染红细胞在总红细胞中比例不应低于对照值的 20%。每个动物至少观察 2 000 个嗜多染红细胞以计数有微核嗜多染红细胞频率,即含微核细胞率,以千分率表示。如一个嗜多染红细胞中有多个微核存在时,只按一个细胞计。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

按动物性别分别统计各组含微核细胞率的均数和标准差,利用适当的统计学方法如泊松(Poisson)分布或 χ^2 检验,对受试样品各剂量组与溶剂对照组的含微核细胞率进行比较。

6.2 结果评价

试验组与对照组相比,试验结果含微核细胞率有明显的剂量-反应关系并有统计学意义时,即可确

认为有阳性结果。若统计学上差异有显著性,但无剂量-反应关系时,则应进行重复试验。结果能重复可确定为阳性。

7 试验报告

7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。

7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

7.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。

7.4 试验摘要。

7.5 受试物:名称、批号、剂型、状态(包括感官、性状、包装完整性、标识)、数量、前处理方法、阳性对照物的相关信息。

7.6 实验动物:物种、品系、级别、数量、周龄、体重、性别、来源(供应商名称、实验动物生产许可证号)、动物检疫、适应情况,饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号),饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。

7.7 试验方法:试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、采样时间点、标本制备方法、每只动物观察的细胞数、统计方法和判定标准。

7.8 试验结果:记录每只动物观察的嗜多染红细胞数和含有微核的细胞数,以列表方式报告不同性别每组动物的嗜多染红细胞数、含微核细胞率和嗜多染红细胞在总红细胞中的比例、剂量反应关系、阴性对照的历史资料和范围,并写明结果的统计方法。

7.9 试验结论:根据试验结果,对受试物是否能引起哺乳动物嗜多染红细胞含微核细胞率增加做出结论。

8 试验的解释

阳性结果表明受试样品在本试验条件下可引起哺乳动物嗜多染红细胞含微核细胞率增加。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起哺乳动物嗜多染红细胞含微核细胞率增加。一般阴性对照组的含微核细胞率 $<5\%$,供参考。但应有本实验室所用实验动物的自发含微核细胞率本底值作参考。本试验方法不适用于有证据表明受试物或其代谢产物不能达到靶组织的情况。
