



中华人民共和国国家标准

GB 15193.12—2014

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 HGPRT 基因突变试验

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 15193.12—2003《体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验》。

本标准与 GB 15193.12—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 体外哺乳类细胞 HGPRT 基因突变试验”;
- 增加了术语和定义;
- 修改了试验目的和原理;
- 增加了不同种类受试物的配制方法;
- 增加了参考阳性对照物;
- 增加了试验用细胞株。

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 HGPRT 基因突变试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)基因突变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致突变作用。

2 术语和定义

2.1 HGPRT 基因

哺乳类动物的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因。在人类,HGPRT 基因定位于 X 染色体的长臂,坐标为 Xq26.1;在小鼠也定位于 X 染色体。

2.2 突变频率

在某种细胞系中,某一特定基因突变型的细胞(集落)占细胞(集落)总数的百分率。

3 试验目的和原理

细胞在正常培养条件下,能够产生 HGPRT,在含有 6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine,6-TG)的选择性培养液中,HGPRT 催化产生核苷-5'-单磷酸(NMP),NMP 掺入 DNA 中致细胞死亡。在致癌和(或)致突变物作用下,某些细胞 X 染色体上控制 HGPRT 的结构基因发生突变,不能再产生 HGPRT,从而使突变细胞对 6-TG 具有抗性作用,能够在含有 6-TG 的选择性培养液中存活生长。

在加入和不加入代谢活化系统的条件下,使细胞暴露于受试物一定时间,然后将细胞再传代培养,在含有 6-TG 的选择性培养液中,突变细胞可以继续分裂并形成集落。基于突变集落数,计算突变频率以评价受试物的致突变性。

4 材料和试剂

4.1 细胞

常用中国仓鼠肺细胞株(V79)和中国仓鼠卵巢细胞株(CHO),其他如小鼠淋巴瘤细胞株(L5178Y)和人类淋巴母细胞株(TK6)亦可。细胞在使用前应进行有无支原体污染的检查。

4.2 培养液

应根据试验所用系统和细胞类型来选择适宜的培养基。对于 V79 和 CHO 细胞,常用最低必需培养基(MEM, Eagle)、改良 Eagle 培养基(DMEM)加入 10%胎牛血清和适量抗菌素。对于 TK6 和 L5178Y 细胞,常用 RPMI 1640 培养液,加入 10%马血清(培养瓶培养)或 20%马血清(96 孔板培养)和适量抗菌素(青霉素、链霉素)。

4.3 胰蛋白酶/EDTA 溶液

用无钙、镁 PBS 配制,胰酶的浓度为 0.05%,EDTA 的浓度为 0.02%,胰蛋白酶与 EDTA 溶液按 1:1 混合。-20℃ 储存。

4.4 活化系统

通常使用的是 S9 混合物。S9 的制备方法如下:

选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠,体重 150 g~200 g 左右,周龄约 5 周~6 周。将多氯联苯(Aroclor1254)溶于玉米油中,浓度为 200 g/L,按 500 mg/kg 体重无菌操作一次腹腔注射,5 d 后处死动物,处死前禁食 12 h。

也可采用苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导的方法进行制备,经口灌胃给予大鼠苯巴比妥钠和 β -萘黄酮,剂量均为 80 mg/kg,连续 3 d,禁食 16 h 后断头处死动物。其他操作同多氯联苯诱导。

处死动物后取出肝脏,称重后用新鲜冰冷的氯化钾溶液(0.15 mol/L)连续冲洗肝脏数次,以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加氯化钾溶液(0.1 mol/L)3 mL,连同烧杯移入冰浴中,用无菌剪刀剪碎肝脏,在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min,1 min~2 min)或组织匀浆器(低于 20 000 r/min,1 min)中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将制成的肝匀浆在低温(0℃~4℃)高速离心机上以 9 000 g 离心 10 min,吸出上清液为 S9 组分,分装于无菌冷冻管或安瓿中,每安瓿 2 mL 左右,用液氮或干冰速冻后置 -80℃ 低温保存。

S9 组分制成后,经无菌检查,测定蛋白含量(Lowry 法),每毫升蛋白含量不超过 40 mg 为宜,并间接致癌物(诱变剂)鉴定其生物活性合格后贮存于深低温或冰冻干燥,保存期不超过 1 年。

S9 的使用浓度为 1%~10%(终浓度)。

4.5 选择剂

6-硫代鸟嘌呤(6-TG),建议使用终浓度为 5 μ g/mL~15 μ g/mL,用碳酸氢钠溶液(0.5%)配制。

4.6 预处理培养液(THMG/THG)

为减少细胞的自发突变频率,在试验前,先将细胞加在含 THMG 的培养液中培养 24 h,杀灭自发的突变细胞,然后再将细胞接种于 THG(不含氨甲喋呤的 THMG 培养液)中培养 1 d~3 d 至细胞恢复正常生长周期和形态。

THMG 所含各物质终浓度如下(除培养液成分外):

- 胸苷, 5×10^{-6} mol/L;
- 次黄嘌呤, 5×10^{-5} mol/L;
- 氨甲喋呤, 4×10^{-7} mol/L;
- 甘氨酸, 1×10^{-4} mol/L。

5 试验方法

5.1 受试物

5.1.1 受试物的配制

固体受试物应溶解或悬浮于适合的溶媒中,并稀释至适当浓度。液体受试物可直接使用或稀释至适当浓度。受试物应在使用前现用现配,否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

5.1.2 溶媒的选择

溶媒必须是非致突变物,不与受试物发生化学反应,不影响细胞存活和 S9 活性。首选溶媒是蒸馏水;对于不溶于水的受试物可选择其他溶媒,首选二甲基亚砜(DMSO),但使用时浓度不应大于 0.5%。

5.1.3 对照

每一项试验中,在代谢活化系统存在和不存在的条件下均应设阳性和阴性(溶媒)对照组。

5.1.3.1 阳性对照

当使用代谢活化系统时,阳性对照物必须是要求代谢活化、并能引起突变的物质,可以使用 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene)、*N*-亚硝基二甲胺(*N*-nitroso-dimethylamine)、7,12-二甲基苯并[*a*]蒎(7,12-dimethylbenz [*a*] anthracene)等。在没有代谢活化系统时,阳性对照物可使用甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate)、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea)等。也可使用其他适宜的阳性对照物。

5.1.3.2 阴性对照

阴性对照(包括溶媒对照)除不含受试物外,其他处理应与受试物相同。此外,当不具有实验室历史资料证实所用溶媒无致突变作用和无其他有害作用时,还应设空白对照。

5.2 剂量

5.2.1 最高浓度选择

决定最高浓度的因素是细胞毒性、受试物在试验系统中的溶解度以及 pH 或渗透压的改变。

5.2.2 细胞毒性确定

应使用指示细胞完整性和生长情况的指标,在代谢活化系统存在和不存在两种条件下确定细胞毒性,例如相对集落形成率或相对存活率。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。

5.2.3 浓度设置和最高浓度选择

至少应设置 4 个可供分析的浓度。当有细胞毒性时,其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性,通常浓度间隔系数在 $2\sim\sqrt{10}$ 之间;如最高浓度是基于细胞毒性,那么该浓度组的细胞相对集落形成率或相对存活率应为 10%~20%(不低于 10%)。对于那些细胞毒性很低的化合物,最高浓度应是 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、5 mg/mL 或 0.01 mol/L 。对于相对不溶解的物质,其最高浓度应达到或超过在细胞培养状态下的溶解度限值;最好在试验处理开始和结束时均评价溶解度,因为由于 S9 等的存在,试验系统内在暴露过程中溶解度可能发生变化;不溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不应影响观察。

5.3 试验步骤和观察指标

5.3.1 贴壁生长细胞的试验步骤和观察指标

5.3.1.1 细胞准备

将 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 平皿中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养 24 h。

5.3.1.2 接触受试物

吸去培养液,PBS 洗两次,加入一定量的无血清培养液、一定浓度的受试物及 S9 混合物(无需代谢

活化者用无血清培养液补足),置于培养箱中 3 h~6 h,结束后吸去含受试物的培养液,用 PBS 洗细胞两次,换入含 10% 血清的培养液,继续培养 19 h~22 h。

5.3.1.3 表达

接触受试物的细胞继续培养 19 h~22 h 后用胰酶-EDTA 消化,待细胞脱落后,加入含 10% 血清的培养液终止消化,混匀,放入离心管以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 5 min~7 min,弃上清液,制成细胞悬液,计数,以 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 的平皿,3 d 后传代,仍接种 5×10^5 个细胞培养 3 d(最佳表达时间为 6 d~8 d)。

5.3.1.4 细胞毒性测定

将上述首次消化计数后的细胞每皿接种 200 个,每组 5 个皿,37 °C、5% 二氧化碳条件下培养 7 d,固定,Giemsa 染色,计数每皿集落数。

5.3.1.5 突变体的选择及集落形成率的测定

表达结束后,消化细胞,分种,每组 5 个皿,每皿接种 200 个细胞,不加 6-TG,7 d 后固定,Giemsa 染色,统计每皿集落数,计算集落形成率。同时另做突变频率测定,每组 5 个皿,每皿接种 2×10^5 个细胞,待细胞贴壁后加入 6-TG(建议使用终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$),放入培养箱培养 8 d~10 d 后固定,Giemsa 染色,统计每皿集落数,并计算突变频率。

5.3.2 悬浮生长细胞的试验步骤和观察指标

5.3.2.1 细胞准备及接触受试物

取生长良好的细胞,调整密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,按 1% 体积加入一定浓度的受试物及 S9 混合物(无需代谢活化者用无血清培养液补足),37 °C 振摇处理 3 h~6 h,以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 4 min~6 min,弃上清液,用 PBS 或无血清培养液洗细胞 2 次,重新悬浮细胞于含 10% 马血清的 RPMI 1640 培养液中,并调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。

5.3.2.2 PE_0 (0 天的平板接种效率)测定

取适量细胞悬液,作梯度稀释至 8 个细胞/mL,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 1.6 个细胞/孔),每个剂量接种 1~2 块平板,37 °C,5% 二氧化碳,饱和湿度条件下培养 9 d~11 d,计数每块平板有集落生长的孔数。

5.3.2.3 表达

取 5.3.2.1 所得细胞悬液,作 6 d 表达培养,每天计数细胞密度并保持密度在 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 以下。

5.3.2.4 PE_6 (第六天的平板接种效率)测定

表达培养结束后,取适量细胞悬液,按“5.3.2.2”方法测定 PE_6 。

5.3.2.5 突变频率(MF)测定

表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,加入 6-TG(建议使用终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $15 \mu\text{g}/\text{mL}$),混匀,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即 2×10^4 个细胞/孔),每个剂量接种 2~4 块平板,37 °C,5% 二氧化碳,饱和湿度条件下培养 11 d~14 d,计数有突变集落生长的孔数。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

6.1.1 贴壁生长细胞 HGPRT 试验数据处理

6.1.1.1 细胞毒性

以相对于溶媒对照组的集落形成率表示细胞毒性。即以溶媒对照的集落形成率为 100%(1.00), 求出各受试物组的相对值。

相对集落形成率的计算见式(1):

$$A = B/C \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A ——相对集落形成率,%;

B ——受试物组集落形成率,%;

C ——溶媒对照组集落形成率,%。

6.1.1.2 集落形成率和突变频率

集落形成率的计算见式(2):

$$D = E/F \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

D ——集落形成率,%;

E ——实际存活的细胞集落数;

F ——接种细胞数。

突变频率的计算见式(3):

$$G = \frac{H}{I} \times \frac{1}{D} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

G ——突变频率;

H ——突变集落数;

I ——接种细胞数;

D ——集落形成率。

6.1.2 悬浮生长细胞 HGPRT 试验数据处理

6.1.2.1 平板接种效率(PE_0 、 PE_6)

平板接种效率的计算见式(4):

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

EW ——无集落生长的孔数;

TW ——总孔数;

1.6 ——每孔接种细胞数。

6.1.2.2 相对存活率(RS)

相对存活率的计算见式(5):

$$RS = \frac{PE_0(\text{受试物组})}{PE_0(\text{溶媒对照组})} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (5)$$

6.1.2.3 突变频率(MF)

突变频率的计算见式(6):

$$MF(\times 10^{-6}) = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_6} \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

EW ——无集落生长的孔数;

TW ——总孔数;

N ——每孔接种细胞数即 2×10^4 ;

PE₆ ——第六天的平板接种效率。

6.2 结果评价

6.2.1 阳性结果的判定

6.2.1.1 受试物组在任何一个剂量条件下的突变频率为阴性(溶媒)对照组的 3 倍或 3 倍以上,可判定为阳性。

6.2.1.2 受试物组的突变频率增加,与阴性(溶媒)对照组比较具有统计学意义,并有剂量-反应趋势,则可判定为阳性。

6.2.1.3 受试物组在任何一个剂量条件下引起具有统计学意义的增加并有可重复性,则可判定为阳性。

6.2.2 阴性结果的判定

不符合上述阳性结果判定标准,则可判定为阴性。

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、鉴定资料、CAS 编号(如已知)、纯度、与本试验有关的受试物的物理和化学性质及稳定性等。

7.6 溶媒和载体:溶媒和载体的选择依据,受试物在溶媒和载体中的溶解性和稳定性。

7.7 细胞株:名称、来源、浓度及培养条件(包括培养基的组成、培养温度、CO₂ 浓度和培养时间)。

7.8 试验条件:剂量、代谢活化系统、标准诱变剂、操作步骤等。

7.9 试验结果:各剂量组受试物(加和不加 S9)对细胞的毒性和突变频率的均数和标准差、是否具有剂量-反应关系、统计结果,同时进行的阴性(溶媒)对照和阳性对照的均数和标准差、以及阴性(溶媒)对照

和阳性对照的历史范围。

7.10 结论:本试验条件下受试物是否具有致突变作用。

8 试验的解释

若阴性对照中,集落形成率或存活率低于 50%,结果应不采用。各实验室选用的阳性对照突变频率有一定范围,若受试物的结果为阴性或弱阳性时,阳性对照的诱变率应达正常值的下限以上,否则结果不能成立。
