



中华人民共和国国家标准

GB 15193.6—2014

食品安全国家标准

哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

2015-01-28 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 15193.6—2003《哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验》。

本标准与 GB 15193.6—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验”;
- 修改了范围;
- 增加了术语和定义;
- 修改了试验目的和原理;
- 修改了试验方法;
- 修改了数据处理。

食品安全国家标准

哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

1 范围

本标准规定了哺乳动物骨髓细胞染色体畸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对哺乳动物骨髓细胞的遗传毒性。

2 术语和定义

2.1 染色体结构畸变

通过显微镜可以直接观察到的发生在细胞有丝分裂中期的染色体结构变化。如染色体中间缺失和断片,染色体互换和内交换等。结构畸变可分为染色体型畸变(chromosome-type aberration)和染色单体型畸变(chromatid-type aberration)。

2.2 染色体型畸变

染色体结构损伤,表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

2.3 染色单体型畸变

染色体结构损伤,表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

2.4 染色体数目畸变

染色体数目发生改变,不同于正常核型。

2.5 核内复制

在DNA复制的S期之后,细胞核未进行有丝分裂就开始了另一个S期的过程。其结果是染色体有4、8、16…倍的染色单体。

2.6 裂隙

染色体或染色单体损伤的长度小于一个染色单体的宽度,为染色单体的最小错误排列。

2.7 有丝分裂指数

中期相细胞数与所观察的细胞总数之比值。

3 试验目的和原理

在试验动物给予受试物后,用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素或秋水仙胺)处理,抑制细胞分裂时纺锤体的形成,以便增加中期分裂相细胞的比例,随后取材、制片、染色、分析染色体畸变。

本试验可检测受试物能否引起整体动物骨髓细胞染色体畸变,以评价受试物致突变的可能性。若

有证据表明受试物或其代谢产物不能到达骨髓，则不适用于本方法。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

实验室常用设备、恒温水浴锅(37 °C±5 °C)、离心机、生物显微镜。

4.2 试剂

4.2.1 秋水仙素(0.4 mg/mL)：置于棕色瓶中，冰箱保存。

4.2.2 氯化钾溶液(0.075 mol/L)。

4.2.3 固定液：甲醇与冰醋酸以3:1混合，临用时现配。

4.2.4 姬姆萨(Giemsa)储备染液：取Giemsa染料3.8 g和少量甲醇于乳钵里仔细研磨，逐渐加入甲醇至375 mL，待完全溶解后，再加入125 mL甘油，混合均匀。置37 °C恒温箱中保温48 h。保温期间振摇数次，促使染料的充分溶解。取出过滤，室温保存，两周后使用。

4.2.5 Giemsa应用染液：取1份Giemsa储备染液与9份磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L)混合而成。临用时配制。

4.2.6 磷酸盐缓冲液(pH6.8)。

4.2.6.1 磷酸氢二钠溶液(1/15 mol/L)：磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)9.47 g溶于1 000 mL去离子水中。

4.2.6.2 磷酸二氢钾溶液(1/15 mol/L)：磷酸二氢钾(KH₂PO₄)9.07 g溶于1 000 mL去离子水中。

4.2.6.3 取磷酸氢二钠溶液(1/15 mol/L)50 mL与磷酸二氢钾溶液(1/15 mol/L)50 mL混合。

4.2.7 阳性对照物：常用环磷酰胺、丝裂霉素C等。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应使用原始样品，若不能使用原始样品，应按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。

5.2 实验动物

5.2.1 动物选择

常用健康年轻的成年大鼠或小鼠，如使用小鼠，可选择7周龄~12周龄，试验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的20%。动物应随机分组，每组雌性和雄性动物至少各5只。如果试验设有几个采样时间点，则要求每组每个性别每个采样时间点都有5只能用于分析的动物。

5.2.2 动物准备

试验前动物在实验动物房至少应进行3 d~5 d环境适应和检疫观察。

5.2.3 动物饲养

实验动物饲养条件应符合GB 14925、饮用水应符合GB 5749、饲料应符合GB 14924的有关规定。试验期间动物自由饮水和摄食，每笼动物数应满足实验动物最低需要的空间，以不影响动物自由活动和观察动物的体征为宜。

5.3 剂量

应进行预试验以选择最高剂量。如果受试物具有毒性,应设3个剂量,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 $1/2 LD_{50}$,低剂量组应不表现出毒性,分别取 $1/4 LD_{50}$ 和 $1/8 LD_{50}$ 作为中、低剂量。对于在低或无毒剂量下具有特异生物学活性的物质(如激素和丝裂源)可以抑制骨髓细胞有丝分裂指数(50%以上)为指标确定最高剂量,按等比级数2向下设置中、低剂量组。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 LD_{50} ,并且根据结构相关物质资料不能推断受试物具有遗传毒性时,则不必设3个剂量。按以下顺序只设一个剂量:

- a) 10 g/kg 体重;
- b) 人的可能摄入量的100倍;
- c) 一次最大灌胃剂量,连续染毒14 d。另设溶媒对照组和阳性对照组,如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶媒不具有有害作用或致突变作用,还应设空白对照组。阳性对照物可用丝裂霉素C(1.5 mg/kg 体重~ 2.0 mg/kg 体重)或环磷酰胺(40 mg/kg 体重)经口或腹腔注射给予。

5.4 试验步骤

5.4.1 给予受试物方式

经口给予受试物,受试物溶液一次灌胃量不应超过 20 mL/kg 体重。采用一次染毒或多次染毒方式。一次染毒应分两次采集标本,即每组动物分两个亚组,亚组1于染毒后12 h~18 h处死动物采集第一次标本,亚组2于亚组1动物处死后24 h采集第二次标本。如果采用多次染毒方式,可给予受试物2次~4次,每次间隔24 h,在末次染毒后12 h~18 h采集一次标本。处死动物前3 h~5 h,按 4 mg/kg 体重腹腔注射秋水仙素。

5.4.2 取材

颈椎脱臼法处死动物,迅速取出股骨,剔去肌肉,擦净血污,剪去两端骨髓,用带针头的注射器吸取5 mL生理盐水,插入骨髓腔,将骨髓洗入10 mL离心管,然后用吸管吹打骨髓团块使其均匀,将细胞悬液以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液。

5.4.3 低渗

离心后的沉淀物加入7 mL 0.075 mol/L氯化钾溶液,用滴管将细胞轻轻吹打均匀,放入37 °C水浴中低渗10 min~20 min。

5.4.4 预固定

立即加入1 mL~2 mL固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液。

5.4.5 固定

加入7 mL固定液,混匀,固定15 min后,以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,用同法再加固定液1次~2次,弃去上清液。

5.4.6 滴片

加入数滴新鲜固定液,用滴管充分混匀。将细胞悬液均匀的滴于冰水玻片上,轻吹细胞悬液扩散平

铺于玻片上。每个标本制 2 张~3 张玻片,空气中自然干燥。

5.4.7 染色

用 Giemsa 染液染色 15 min,去离子水冲洗,空气中自然干燥。

5.4.8 阅片

在低倍镜下检查制片质量,制片应为全部染色体较集中,而各个染色体分散、互不重叠、长短收缩适中、两条单体分开、清楚地显示出着丝点位置、染色体呈红紫色。用油镜进行细胞中期染色体分析,每只动物分析 100 个中期相细胞,每个剂量组不少于 1 000 个中期分裂相细胞。在读片时应记录每个观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录显微镜视野的坐标位置及畸变类型。由于低渗等机械作用的破坏,会导致处于中期的染色体发生丢失,所以,观察的中期相染色体数目应控制在 $2n \pm 2$ 内。

5.5 观察指标

5.5.1 染色体数目的改变

5.5.1.1 非整倍体:亚二倍体或超二倍体。

5.5.1.2 多倍体:染色体成倍增加。

5.5.1.3 核内复制:核膜内的特殊形式的多倍化现象。

5.5.2 染色体结构的改变

5.5.2.1 断裂:损伤长度大于染色体的宽度。

5.5.2.2 微小体:较断片小而呈圆形。

5.5.2.3 有着丝点环:带有着丝点部分,两端形成环状结构并伴有一双无着丝点断片。

5.5.2.4 无着丝点环:成环状结构。

5.5.2.5 单体互换:形成三辐体、四辐体或多种形状的图像。

5.5.2.6 双微小体:成对的染色质小体。

5.5.2.7 裂隙:损伤的长度小于染色单体的宽度。

5.5.2.8 非特定性型变化:如粉碎化、着丝点细长化、黏着等。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

每只实验动物作为一个观察单位,每组动物按性别分别计算染色体结构畸变细胞百分率。若雌、雄动物之间无明显的性别差异,可合并计算结果。可用 χ^2 检验方法进行统计学分析。裂隙应单独记录和报告,但一般不计人总的畸变率。

6.2 结果评价

结果评价时应从生物学意义和统计学意义两个方面进行分析。剂量组染色体畸变率与阴性对照组相比,具有统计学意义,并呈剂量-反应关系或一个剂量组出现染色体畸变细胞数明显增高并具有统计学意义,并经重复试验证实,即可确认为阳性结果。若有统计学意义,但无剂量-反应关系时,则应进行重复试验。结果能重复者可确定为阳性。

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或授权签字人、签发日期。
- 7.4 试验摘要。
- 7.5 受试物：名称、批号、剂型、性状（包括感官、性状、包装完整性、标识）、数量、前处理方法、溶媒。
- 7.6 实验动物：物种、品系、级别、数量、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：分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、观察指标、统计学方法。
- 7.8 试验结果：以文字描述和表格逐项进行汇总，包括观察和分析的细胞数、染色体畸变类型和数量及畸变率，给出数据的统计处理结果。
- 7.9 试验结论：给出明确结论。

8 试验的解释

阳性结果表明受试物具有引起受试动物骨髓细胞染色体畸变的作用。

阴性结果表明在本试验条件下受试物不引起受试动物骨髓细胞染色体畸变。
