



中华人民共和国国家标准

GB 15193.23—2014

食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

2014-12-01 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

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞染色体畸变试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类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的体外哺乳类细胞染色体畸变。

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、染色体互换等。染色体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)。

2.1.1 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等改变。

2.1.2 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等改变。

2.2 有丝分裂指数

中期相细胞数与所观察的细胞总数之比值;是反映细胞增殖程度的指标。

2.3 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。

2.4 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。

3 试验目的和原理

通过检测受试物是否诱发体外培养的哺乳类细胞染色体畸变,评价受试物致突变的可能性。在加入或不加入代谢活化系统的条件下,使培养的哺乳类细胞暴露于受试物中。用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素或秋水仙胺)处理,使细胞停止在中期分裂相,随后收获细胞、制片、染色、分析染色体畸变。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

细胞培养箱,倒置显微镜,超净台,离心机。

4.2 培养液

常用 Eagle's MEM 培养液(minimum essential medium, MEM),也可选用其他合适培养液。加入抗生素(青霉素按 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),将灭活的胎牛血清或小牛血清按 10% 的比例加入培养液。

4.3 代谢活化系统

4.3.1 S9 辅助因子的配制

4.3.1.1 镁钾溶液

氯化镁 1.9 g 和氯化钾 6.15 g 加蒸馏水溶解至 100 mL。

4.3.1.2 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 28.4 g/L)440 mL, 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 27.6 g/L)60 mL, 调 pH 至 7.4, 0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。

4.3.1.3 辅酶-II(氧化型)溶液

无菌条件下称取辅酶-II, 用无菌蒸馏水溶解配制成 0.025 mol/L 溶液, 现用现配。

4.3.1.4 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液

称取葡萄糖-6-磷酸钠盐, 用蒸馏水溶解配制成 0.05 mol/L, 过滤灭菌。现用现配。

4.3.2 大鼠肝 S9 组分的诱导和配制

选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠, 体重 150 g ~ 200 g, 约 5 周龄 ~ 6 周龄。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 体重, 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 0.15 mol/L 氯化钾溶液连续冲洗肝脏数次, 以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 3 mL, 连同烧杯移入冰浴中, 用消毒剪刀剪碎肝脏, 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 °C ~ 4 °C)高速离心机上以 9 000 g 离心 10 min, 吸出上清液为 S9 组分, 分装于无菌冷冻管中, 每管 2 mL 左右, 最好用液氮或干冰速冻后置 -80 °C 低温保存。

S9 组分制备后, 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, 并经间接致突变剂鉴定其生物活性合格后贮存于 -80 °C 低温或冰冻干燥, 保存期不超过 1 年。

4.3.3 10% S9 混合液的制备

一般由 S9 组分和辅助因子按 1 : 9 组成 10% 的 S9 混合液, 无菌现用现配。10% S9 混合液 10 mL 配制如下:

取上述磷酸盐缓冲液 6.0 mL、镁钾溶液 0.4 mL、葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液 1.0 mL、辅酶-II 溶液 1.6 mL、肝 S9 组分 1.0 mL, 混匀, 置冰浴中待用。

S9 混合液浓度一般为 1% ~ 10%, 实际使用浓度可由各实验室自行决定, 但需对其活性进行鉴定,

必须能明显活化阳性对照物,且对细胞无明显毒性。

4.4 秋水仙素溶液

用 PBS 溶液配制适当浓度的储备液,过滤除菌,在避光冷藏的条件下至少能保存 6 个月。

4.5 0.075 mol/L 氯化钾溶液

5.59 g 氯化钾加蒸馏水至 1 000 mL。

4.6 固定液

甲醇:冰醋酸为 3:1,临用前配制。根据试验条件,可适当调整冰醋酸的浓度,改善染色体分散度,但不宜过大,导致细胞破裂。

4.7 姬姆萨(Giemsa)染液

取姬姆萨染料 3.8 g,置乳钵中,加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加 125 mL 甘油,放入 37 ℃温箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,使充分溶解。取出过滤,2 周后使用,作为姬姆萨染液原液。使用时,取 1 份姬姆萨染液原液,与 9 份 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)混合,配成其应用液,现配现用。

磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L,pH 6.8)配制方法如下:

- 第一液:取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.47 g 溶于去离子水 1 000 mL 中,配成 1/15 mol/L 溶液;
- 第二液:取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)9.07 g 溶于去离子水 1 000 mL 中,配成 1/15 mol/L 溶液;
- 取第一液 50 mL 加于第二液 50 mL 中混匀,即为 pH 6.8 的 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液。

5 试验方法

5.1 受试物

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。受试物应无菌现用现配,否则须确认储存不影响其稳定性。

5.2 细胞株

可选用中国仓鼠肺(CHL)细胞株或卵巢(CHO)细胞株、人或其他哺乳动物外周血淋巴细胞(lymphocyte)。试验前检查细胞的核型和染色体数目,检测细胞有无支原体污染。推荐使用中国仓鼠肺(CHL)细胞株。

5.3 剂量

5.3.1 剂量设置

受试物至少应取 3 个检测剂量。对有细胞毒性的受试物,其剂量范围应包括从最大毒性至几乎无毒性(细胞存活率在 20%~100% 的范围内);通常浓度间隔系数不大于 $2 \sim \sqrt{10}$ 。

5.3.2 最高剂量的选择

当收获细胞时,最高剂量应能明显减少细胞计数或有丝分裂指数(大于 50%,如毒性过大,应适当增加接种细胞数);同时应该考虑受试物对溶解度、pH 和摩尔渗透压浓度的影响;对无细胞毒性或细胞毒性很小的化合物,最高剂量应达到 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、5 mg/mL 或 10 mmol/L。

对溶解度较低的物质,当达到最大溶解浓度时仍无毒性,则最高剂量应是在最终培养液中溶解度限值以上的一个浓度。在某些情况下,应使用一个以上可见沉淀的浓度,溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不能影响观察。

5.3.3 细胞毒性的确定

测定细胞毒性可使用指示细胞完整性和生长情况的指标,如相对集落形成率或相对细胞生长率等。应在 S9 系统存在或不存在的条件下测定细胞毒性。

5.3.4 阳性对照

可根据受试物的性质和结构选择适宜的阳性对照物,应是已知的断裂剂,能引起可检出的、并可重复的阳性结果。当不存在外源性代谢活化系统时,可使用的阳性对照物有甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS)、甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS)、丝裂霉素 C(mytomycin C)、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea, ENU)、硝基喹啉-N-氧化物(4-nitroquinoline-N-oxide)等。当存在外源性活化系统时,可使的阳性对照物有苯并[*a*]芘[benzo(*a*) pyrene, BaP]、环磷酰胺(cyclophosphamide)等。

不加 S9 的阳性对照常用丝裂霉素 C,其常用浓度为 0.2 μg/mL~0.8 μg/mL。其 pH 为 6~9 的水溶液在 0 ℃~5 ℃下避光保存能存放 1 周。加 S9 的阳性对照常用环磷酰胺,其常用浓度为 8 μg/mL~15 μg/mL。其水溶液不稳定,应现配现用。

5.3.5 阴性对照

溶媒应为非致突变物,不与受试物发生化学反应,不影响细胞存活和 S9 活性。首选溶媒对照是不含血清的培养液和水,亦可使用二甲基亚砜(DMSO),但浓度不应大于 0.5%。

5.3.6 空白对照

如果没有文献资料或历史资料证实所用溶媒无致突变作用时应设空白对照。

5.4 试验步骤

5.4.1 细胞培养与染毒

试验需在加入和不加入 S9(S9 的终浓度常为 1%~10%,以细胞毒性试验结果为准)的条件下进行。试验前一天,将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)中[以收获细胞时,培养皿(瓶)的细胞未长满为标准,一般以长到 85% 左右为佳;如用 CHL 细胞,可接种 1×10^6 个],放 CO₂ 培养箱内培养。试验时吸去培养皿(瓶)中的培养液,加入一定浓度的受试物、S9 混合液(不加 S9 混合液时,需用培养液补足)以及一定量不含血清的培养液,置培养箱中处理 2 h~6 h。处理结束后,吸去含受试物的培养液,用 PBS 溶液洗细胞 3 次,加入含 10% 胎牛血清的培养液,放回培养箱,于 24 h 收获细胞。于收获前 2 h~4 h,加入细胞分裂中期阻断剂(如用秋水仙素,终浓度为 0.1 μg/mL~1 μg/mL)。

当受试物为单一化学物质时,如果在上述加入和不加入 S9 混合液的条件下均获得阴性结果,则需加做长时间处理的试验,即在没有 S9 混合液的条件下,使受试物与试验系统的接触时间延长至 24 h。当难以得出明确结论时,应更换试验条件,如改变代谢活化条件、受试物与试验系统接触时间等重复试验。

5.4.2 收获细胞与制片

5.4.2.1 消化

用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞,待细胞脱落后,加入含 10% 胎牛或小牛血清的培养液终止胰蛋

白酶的作用,混匀,放入离心管以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 5 min,弃去上清液。

5.4.2.2 低渗

加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 2 mL,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37 ℃ 细胞培养箱中低渗处理 30 min~40 min。

5.4.2.3 固定

加入 2 mL 固定液,混匀后固定 5 min 以上,以 800 r/min~1 000 r/min 速度离心 5 min,弃去上清液。重复一次,弃去上清液。

5.4.2.4 滴片

加入数滴新鲜固定液,混匀。用混悬液滴片,自然干燥。玻片使用前用冰水浸泡。

5.4.2.5 染色

5%~10% 姬姆萨染液,15 min~20 min。

5.4.3 阅片

在油镜下阅片,每一剂量组应分析不少于 100 个分散良好的中期分裂相,且每个观察细胞的染色体数在 $2n \pm 2$ 范围之内。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。

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

数据按不同剂量列表,指标包括观察细胞数、畸变细胞数、染色体畸变率、各剂量组及对照组不同类型染色体畸变数与畸变率等。裂隙应单独记录和报告,但一般不计入总的畸变率。各组的染色体畸变率用 χ^2 检验进行统计学处理。

6.2 结果评价

下列两种情况可判定受试物在本试验系统中为阳性结果：

- a) 受试物引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义，并与剂量相关；
- b) 受试物在任何一个剂量条件下，引起的染色体结构畸变数增加具有统计学意义，并有可重复性。

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 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：溶媒的选择依据为受试物在溶媒中的溶剂性和稳定性。

7.7 细胞株：细胞株的来源、名称。

7.8 试验条件：剂量、代谢活化系统、标准诱变剂、操作步骤等。

7.8.1 代谢活化系统：制备 S9 所用酶的诱导剂、选用的动物品种和来源、S9 混合液的配方。

7.8.2 对照物：阳性对照物的名称、生产厂家、批号和选用浓度。

7.8.3 培养液：所用培养液的名称、血清类别和使用浓度。

7.8.4 接种的细胞密度以及所用培养皿（瓶）的规格。

7.8.5 中期分裂阻断剂：名称、所用浓度、作用时间。

7.8.6 处理时间：受试物与试验系统的接触时间。

7.8.7 制片方法、分析的中期分裂相数目、结果评价方法。

7.9 试验结果。

7.9.1 试验结果应包括细胞毒性的测定、加受试物后的溶解情况及对 pH 和渗透压的影响（如果有影响）。

7.9.2 各剂量组和对照组细胞染色体畸变率。

7.9.3 本实验室的阳性对照组和阴性对照组（常用溶媒，如 DMSO）在本实验室历史上的染色体畸变率范围和检测数（说明样品数）。

7.10 试验结论：给出受试物在试验条件下是否引起体外培养的细胞染色体畸变的结论，必要时对有关问题进行讨论。

8 试验的解释

大部分的致突变剂导致染色单体型畸变，偶有染色体型畸变发生。虽然多倍体的增加可能预示着染色体数目畸变的可能，但本方法并不适用于检测染色体的数目畸变。阳性结果表明受试物在该试验条件下可引起所用哺乳类细胞染色体畸变。阴性结果表明在该试验条件下受试物不引起所用哺乳类细胞染色体畸变。评价时应综合考虑生物学和统计学意义。