



中华人民共和国国家标准

GB 15193.12—2014

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

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准
体外哺乳类细胞 HGPRT 基因突变试验
GB 15193.12—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2015年1月第一版 2015年1月第一次印刷

*

书号: 155066·1-49821 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB 15193.12-2014

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

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(加和加不加 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

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。

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 000r/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 PE₀(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 PE₆(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 PE₆。

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。

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)和人类淋巴瘤细胞株(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)。