



中华人民共和国国家标准

GB 15193.10—2014

GB 15193.10—2014

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 DNA 损伤修复 (非程序性 DNA 合成) 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 DNA 损伤修复
(非程序性 DNA 合成) 试验
GB 15193.10—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 14 千字
2015 年 1 月第一版 2015 年 1 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-49822 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 15193.10-2014

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

6.2 结果评价

受试物组的细胞³H-TdR 掺入数随剂量增加而增加,且与阴性对照组相比有统计学意义,或者至少在一个测试点得到可重复并有统计学意义的掺入量增加,均可判定为该试验阳性。

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、细胞株、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:溶媒的选择依据,受试物在溶媒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、细胞株、标准诱变剂、操作步骤等。

7.9 试验结果:受试物对细胞株的毒性、是否具有剂量-反应关系、统计结果,同时进行的溶媒对照和阳性对照的均数和标准差。

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

受试物组的细胞³H-TdR 掺入数不随剂量增加而增加,各剂量组与对照组比较均无统计学意义,则认为受试物在该试验系统下不引起 UDS。判定结果时,应综合考虑生物学意义和统计学意义。

前 言

本标准代替 GB 15193.10—2003《非程序性 DNA 合成试验》。

本标准与 GB 15193.10—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 DNA 损伤修复(非程序性 DNA 合成)试验”;

——修改了试验目的和原理;

——修改了试验方法;

——修改了数据处理;

——修改了结果评价。

5.5 细胞培养

5.5.1 细胞的选择

原代培养细胞(如大鼠肝细胞),人淋巴细胞或已建系的细胞(如人羊膜细胞 FL 株、人二倍体成纤维细胞、Hela 细胞)都可用于本试验。人类细胞的 UDS 反应大于啮齿类动物细胞。使用最多的人类细胞为成纤维细胞、外周血淋巴细胞、单核细胞和 Hela 细胞等。

5.5.2 培养条件

选用适当的生长培养基、CO₂ 浓度、温度和湿度维持细胞生长。细胞系应定期检查有无支原体污染。

5.5.3 细胞的传代、维持和贮存

生长成单层的细胞,除去培养基。用 Hanks 平衡盐液(HBSS)洗涤后,用 0.02%EDTA 或 0.1%胰酶溶液(于无 Ca²⁺、Mg²⁺ 之磷酸盐缓冲液中)于 37 °C 下处理数分钟使细胞退缩,细胞间隙增加。再用 HBSS 洗涤 1 次,加入适量培养基,反复吹吸,使细胞自玻面上脱下并分散于培养基中。取细胞悬液一滴,加于血球计数池中,计数 4 大格中的细胞数,计算出悬液中之细胞浓度(4 大格的细胞数/4×10⁴ 即为每毫升所含细胞数)。将细胞悬液生长培养基稀释至 0.5×10⁵ 个/mL~1×10⁵ 个/mL。将上述细胞悬液接种于培养瓶中(30 mL 培养瓶可接种 3 mL。100 mL 的培养瓶可接种 10 mL)。每次接种 3 份,长成融合单层后取其中一瓶再按以上方法传代接种 3 瓶。另两瓶在证明传代成功后弃去或供试验所用,这样可保证细胞在试验中延续保持。有条件可按下法将细胞贮存于液氮中。若较长时间不用,不必在实验室中维持。在需要时取出经增殖后供试验所用。将细胞增殖至所需数量后,按上法制成细胞悬液(于生长用培养基中)。细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL~1.5×10⁶ 个/mL。在冰浴中,逐渐加入为细胞悬液总量 10%的灭菌二甲亚砷。然后将细胞悬液分装于洁净干燥之灭菌的玻璃容器或细胞冻存专用塑料小管中,每份 1 mL。封口后,置于 4 °C 中 2 h~3 h,然后移至普通冰箱之冰室内 4 h~5 h,再移入 -30 °C~-20 °C 之低温冰箱内过夜。次日晨将安瓿移入生物用液氮储存器内。需用时,将安瓿或小塑料管锯(打)开,除去含有二甲亚砷的培养基,加入适量之生长用培养基,并调整细胞浓度至 10×10⁴ 个/mL~15×10⁴ 个/mL。分种于细胞培养瓶中,37 °C 培养 1 h 后,换培养基一次,将无活力之细胞除去,待长成融合单层后分传增殖维持于实验室中。

5.6 操作步骤

注:根据实验室情况,可选择通过 DNA 放射自显影显示法或液体闪烁技术显色法(LSC)的方法测定染毒细胞中³H-TdR 的掺入量。

5.6.1 UDS 的放射自显影显示法

将细胞增殖至所需数量后,按上述方法制成单细胞悬液。浓度为 0.5×10⁵ 个/mL~1×10⁵ 个/mL。将上述细胞悬液接种于置有小盖片(18 mm×6 mm)之培养瓶中,37 °C 培养 1 d~3 d,使细胞在盖片上生长至适当密度。培养瓶接种数目根据受试物的数目、所选剂量级别而定。每一剂量作 2 个~3 个样片,并另备 4 个~6 个样本供溶媒对照和已知致癌物的阳性对照用。细胞在增殖培养后,用同步培养基(ADM 补以 1%小牛血清)作同步培养 3 d~4 d。在试验前一日下午,加入溶于 ADM 之羟基脲(HU)溶液,使 HU 在培养基中之终浓度为 10 mmol/L。继续在 37 °C 下孵育 16 h,然后将上述长有细胞之盖片置于含有不同浓度之受试物、HU[c(HU)=10 mmol/L]及³H-胸腺嘧啶核苷(5 μCi/mL~10 μCi/mL, 30 Ci/mmol)之同步用培养基中。37 °C 中孵育 5 h。

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 DNA 损伤修复 (非程序性 DNA 合成)试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类细胞 DNA 损伤修复(非程序性 DNA 合成)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诱变性和(或)致癌性。

2 术语和定义

2.1 非程序性 DNA 合成

当 DNA 受损伤时,损伤修复的 DNA 合成主要在 S 期以外的其他细胞周期,称非程序性 DNA 合成。

3 试验目的和原理

在正常情况下,DNA 合成仅在细胞有丝分裂周期的 S 期进行。当化学或物理因素诱发 DNA 损伤后,细胞启动非程序性 DNA 合成程序以修复损伤的 DNA 区域。在非 S 期分离培养的原代哺乳动物细胞或连续细胞系中,加入³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TDR),通过 DNA 放射自显影技术或液体闪烁计数(LSC)法检测染毒细胞中³H-TDR 掺入 DNA 的量,可说明受损 DNA 的修复合成的程度。

在体外培养细胞中,用缺乏半必需氨基酸精氨酸的培养基(ADM)进行同步培养,DNA 合成的始动受阻,使细胞同步于 G1 期;并用药物(常用羟基脲)抑制残留的半保留 DNA 复制后,通过³H-TDR 掺入可显示非程序性 DNA 合成(UDS)。

4 试剂和材料

4.1 试剂

注:全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为双蒸水或超纯水。

4.1.1 细胞增殖用培养基

Eagle 氏最低要求培养基(Eagle's Minimal Essential Medium,EMEM),加入 10%小牛血清、青霉素、链霉素贮存液,使青霉素的最终浓度为 100 单位,链霉素的最终浓度为 100 μg/mL。EMEM 培养基可选用各种商品供应之粉末培养基按生产厂商提供资料配制并除菌。4 °C 冰箱贮存。

4.1.2 细胞同步用培养基

不含精氨酸之 EMEM 培养基(ADM),加入小牛血清、青霉素、链霉素浓度同细胞增殖用培养基。