



中华人民共和国国家标准

GB 15193.20—2014

GB 15193.20—2014

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 TK 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 TK 基因突变试验
GB 15193.20—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: 155066·1-49833 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 15193.20-2014

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

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

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 相对存活率(RS)

相对存活率(%)的计算见式(2)：

$$RS = \frac{PE_{处理}}{PE_{阴性/溶媒对照}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

注：溶媒使用非水溶媒时，与溶媒对照比较。

6.1.3 相对悬浮生长(RSG)

相对悬浮生长(%)的计算见式(3)：

$$RSG = \frac{处理组表达期间细胞增殖倍数}{阴性 / 溶媒对照组表达期间细胞增殖倍数} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

注：溶媒使用非水溶媒时，与溶媒对照比较。

6.1.4 相对总生长(relative total growth, RTG)

相对总生长(%)的计算见式(4)：

$$RTG = RSG \times RS_n \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中：
RS_n——第2天(L5178Y 细胞)或第3天(TK6 细胞)的相对存活率。

6.1.5 突变频率(MF)

突变频率的计算见式(5)：

$$MF(\times 10^{-6}) = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_{2/3}} \dots\dots\dots(5)$$

式中：
EW ——无集落生长的孔数；
TW ——总孔数；
N ——每孔接种细胞数(L5178Y 细胞为 2 000, TK6 细胞为 30 000)；
PE_{2/3} ——第2天(L5178Y 细胞)或第3天(TK6 细胞)的平板效率。

此外，对于 L5178Y 细胞，可分别计算大集落突变频率(L-MF)、小集落突变频率(S-MF)和总突变频率(T-MF)。对于 TK6 细胞，可分别计算正常集落突变频率(N-MF)、缓慢生长集落突变频率(S-MF)和总突变频率(T-MF)。

6.1.6 小集落突变百分率(small colony mutation, SCM)或缓慢生长集落突变百分率(slowly-growth colony mutation, SCM)

小集落突变百分率或缓慢生长集落突变百分率的计算见式(6)：

$$SCM = \frac{S-MF}{T-MF} \times 100\% \dots\dots\dots(6)$$

前 言

本标准代替 GB 15193.20—2003《TK 基因突变试验》。
本标准与 GB 15193.20—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 TK 基因突变试验”；
——修改了范围；
——增加了术语和定义；
——修改了试验目的和原理；
——增加了代谢活化系统；
——增加了 THMG 和 THG 选择培养基的配制方法；
——增加了 CHAT 和 CHT 选择培养基的配制方法；
——增加了三氟胸苷的配制方法；
——增加了磷酸盐缓冲液的配制方法；
——修改了受试物剂量设定的要求；
——修改了对照的设定；
——增加了备选细胞系及相应的试验方法及数据处理；
——增加了试验报告的要求；
——增加了试验的解释的要求。

4.4 磷酸盐缓冲液(phosphate buefferd saline,PBS)

将 8.0 g NaCl、0.20 g KCl、2.74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.20 g KH_2PO_4 溶于双蒸水并定容至 1 000 mL,pH7.2~7.4。

4.5 三氟胸苷(trifluorothymidine,TFT)的配制

取 TFT 30 mg,用 PBS 溶解加至 10 mL,配成 3 mg/mL 的储备液。应用时按 1‰的体积比加入培养基。

5 试验方法

5.1 细胞和培养条件

tk^{+/-}基因型的 L5178Y-3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞或 TK6 人类淋巴瘤母细胞。

两种细胞均在 5%二氧化碳、37 ℃、饱和湿度条件下作常规悬浮培养。

为避免在培养和传代期间自发突变的细胞对试验结果的影响,在正式试验前,应清除自发突变的 tk^{-/-}基因型细胞。方法是:

- 对于 L5178Y 细胞,使用 THMG 培养基处理 24 h,以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 4 min~6 min、洗涤后在不含氨甲喋呤的 THG 培养基中培养 2 d;
- 对于 TK6 细胞,使用 CHAT 培养基处理 48 h,以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 4 min~6 min、洗涤后在不含氨基喋呤的 CHT 培养基中继续培养 3 d。

5.2 受试物

5.2.1 受试物的配制

受试物在使用前应现用现配,否则须证实在特定贮存条件下不影响其稳定性。

5.2.2 受试物剂量设定

至少应设置 3 个~4 个可供分析的浓度。对于有细胞毒性的受试物,应根据细胞毒性预试验结果,在 RS 或 RSG 为 20%~80%范围内设 3 个~4 个剂量(浓度)水平,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。方法是:取生长良好的细胞,调整密度为 5×10^5 /mL,按 1%体积加入不同浓度受试物,37 ℃ 震荡处理 3 h(L5178Y 细胞)或 4 h(TK6 细胞),细胞经离心洗涤后,作 2 d(L5178Y 细胞)或 3 d(TK6 细胞)表达培养,每天计数细胞密度并计算相对悬浮生长(RSG)。或取上述处理后细胞悬液,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),每个剂量种 1 块~2 块平板,37 ℃,5%二氧化碳,饱和湿度条件下培养 12 d,计数每块平板有集落生长的孔数,计算相对存活率(RS)。

对于细胞毒性极低的受试物,最高浓度应设为 5 mg/mL、5 μL/mL 或 0.01 mol/L。对于相对不溶解的物质,其最高浓度的设置应达到不影响细胞培养的最大可加入浓度。

5.2.3 对照的设定

一般情况下,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。

当使用代谢活化系统时,阳性对照物应使用要求代谢活化、并能引起典型突变集落的物质,可以使用 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene)、环磷酰胺(cyclophosphamide,CP)等。在没有代谢活化系统时,

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类胸苷激酶(thymidine kinase,TK)基因突变试验的基本试验方法与技术要求。

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 TK 基因

哺乳类动物的胸苷激酶基因。人类的 TK 基因定位于 17 号染色体长臂远端;小鼠的则定位于 11 号染色体。

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)总数的比例(单位通常为 10^{-6})。

3 试验目的和原理

TK 基因突变试验的检测终点是 TK 基因的突变。TK 基因突变属于常染色体基因突变。

TK 基因的产物胸苷激酶在体内催化从脱氧胸苷(TdR)生成胸苷酸(TMP)的反应。在正常情况下,此反应并非生命所必需,原因是体内的 TMP 主要来自于脱氧尿嘧啶核苷酸(dUMP),即由胸苷酸合成酶催化的 dUMP 甲基化反应生成 TMP。但如在细胞培养物中加入胸苷类似物(如三氟胸苷,即 trifluorothymidine,TFT),则 TFT 在胸苷激酶的催化下可生成三氟胸苷酸,进而掺入 DNA,造成致死性突变,故细胞不能存活。若 TK 基因发生突变,导致胸苷激酶缺陷,则 TFT 不能磷酸化,亦不能掺入 DNA,故突变细胞在含有 TFT 的培养基中能够生长,即表现出对 TFT 的抗性。根据突变集落形成数,可计算突变频率,从而推断受试物的致突变性。在 TK 基因突变试验结果观察中可发现两类明显不同的集落,即大/小集落(L5178Y 细胞)或正常生长/缓慢生长集落(TK6 细胞),有研究表明,大集落/正常生长集落主要由点突变或较小范围的缺失等引起,而小集落/缓慢生长集落主要由较大范围的染色体畸变,或由涉及调控细胞增殖的基因缺失引起。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

实验室常用设备、低温冰箱(-80 ℃)或液氮罐、生物安全柜、细胞培养箱、倒置显微镜、离心机。