



中华人民共和国国家标准

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

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

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。

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($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)或液氮罐、生物安全柜、细胞培养箱、倒置显微镜、离心机。

4.2 培养基

4.2.1 完全培养基

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)及适量抗菌素(青霉素、链霉素的最终浓度分别为 100 IU/mL 及 100 μg/mL)。

4.2.2 THMG 和 THG 选择培养基

THMG 培养基:3 μg/mL 胸腺嘧啶核苷(thymidine,T)+5 μg/mL 次黄嘌呤(hypoxanthine,H)+0.1 μg/mL 氨基喋呤(methotrexate,M)+7.5 μg/mL 甘氨酸(glycine,G)。

THG 培养基:3 μg/mL 胸腺嘧啶核苷(T)+5 μg/mL 次黄嘌呤(H)+7.5 μg/mL 甘氨酸(G)。

以上浓度为各试剂在培养基中的终浓度。实际试验中,常按照表 1 的方法把 THMG 和 THG 配成 100 倍浓度:

表 1 T、H、M、G 试剂的配置

试剂	相对分子质量	质量/mg	溶剂及其体积	浓度/(mg/mL)
T	242.2	30	10 mL H ₂ O	3
H	136.1	5	1 mL 1 mol/L HCl	5
M	454.5	5	50 mL H ₂ O	0.1
G	75.07	75	10 mL H ₂ O	7.5

将 4 种试剂配制成上述 1 000 倍浓度,再分别取此浓度的 T、H、M、G 溶液各 5 mL(共 20 mL)或 T、H、G 溶液各 5 mL(共 15 mL),均用双蒸水稀释至 50 mL,配成 100 倍的 THMG 或 THG 储备液。最后用滤膜过滤除菌,分装,-20℃下保存。应用时以 1%的比例加入完全培养基。

4.2.3 CHAT 和 CHT 选择培养基

CHAT 培养基:1×10⁻⁵ mol/L 脱氧胞苷(cytosine deoxyriboside,C)+2×10⁻⁴ mol/L 次黄嘌呤(hypoxanthine,H)+1×10⁻⁷ mol/L 氨基喋呤(aminopterin,A)+1.75×10⁻⁵ mol/L 胸苷(thymidine,T)。

CHT 培养基:1×10⁻⁵ mol/L 脱氧胞苷(C)+2×10⁻⁴ mol/L 次黄嘌呤(H)+1.75×10⁻⁵ mol/L 胸苷(T)。

以上浓度为各试剂在培养基中的终浓度。实际试验中,常按表 2 的方法把 CHAT 和 CHT 配成 100 倍浓度:

表 2 C、H、A、T 试剂的配置

试剂	相对分子质量	质量/mg	溶剂及其体积	浓度/(mol/L)
C	227.2	113.6	50 mL H ₂ O	1×10 ⁻²
H	136.1	1 361.0	50 mL 1 mol/L HCl	2×10 ⁻¹
A	440.4	2.2	50 mL H ₂ O	1×10 ⁻⁴
T	242.2	423.85	10 mL H ₂ O	1.75×10 ⁻²

将 4 种试剂配制成 1 000 倍浓度,再分别取此浓度的 C、H、A、T 溶液各 5 mL(共 20 mL)或 C、H、T 溶液各 5 mL(共 15 mL),均用双蒸水稀释至 50 mL,配成 100 倍的 CHAT 或 CHT 储备液。最后用滤

膜过滤除菌,分装,—20℃下保存。应用时以1%的比例加入完全培养基。

4.3 代谢活化系统

4.3.1 S9 辅助因子

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(pH7.4)

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 组分的制备

选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠,体重 150 g~200 g 左右,约 5 周龄~6 周龄。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,处死前禁食 12 h。

处死动物后取出肝脏,称重后用新鲜冰冷的氯化钾溶液(0.15 mol/L)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)加氯化钾溶液(0.1 mol/L)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℃~4℃)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,用液氮或干冰速冻后置-80℃低温保存。

S9 组分制成后,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,并间接致突变剂鉴定其生物活性合格后贮存于-80℃低温或冰冻干燥,保存期不超过 1 年。

4.3.3 10% S9 混合液

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

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,应能明显活化阳性对照物,且对细胞无明显毒性。

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、洗涤后在不含氨基嘌呤的 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、洗涤后在不含氨基嘌呤的 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 $5 \times 10^5/\text{mL}$,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 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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,

阳性对照物可使用甲基磺酸甲酯(methyl methane sulfonate, MMS)、丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)、甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulfonate, EMS)等。也可使用其他适宜的阳性对照物。

溶媒应是非致突变物,不与受试物发生化学反应,不影响细胞存活和 S9 活性。溶媒首选蒸馏水,如使用非水溶媒(可选择二甲基亚砷、丙酮、乙醇等),则需增设溶媒对照。

5.3 处理

取生长良好的细胞,调整密度为 5×10^5 /mL,按 1% 体积加入受试物(需代谢活化的情况下,同时加入终浓度为 1%~10% 的 S9 混合物),37 °C 振摇处理 3 h(L5178Y 细胞)或 4 h(TK6 细胞),以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 4 min~6 min,弃上清液,用 PBS 或不含血清的培养基洗涤细胞 2 遍,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 2×10^5 /mL。

5.4 PE_0 (0 d 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),每个剂量种 1 块~2 块平板,37 °C,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。

5.5 表达

取 5.3 所得细胞悬液,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保持密度在 10^6 /mL 以下,计算相对悬浮生长(RSG)。

5.6 PE_2 (L5178Y 细胞)或 PE_3 (TK6 细胞)测定

表达培养结束后,取适量细胞悬液,按 5.4 方法测定 PE_2 / PE_3 。

5.7 突变频率(MF)测定

5.7.1 L5178Y 细胞

L5178Y 细胞表达培养 2 d 后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 /mL,加入 TFT(终浓度为 3 μ g/mL),混匀,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 2 000 个细胞/孔),每个剂量作 2 块~4 块板,37 °C,5% 二氧化碳,饱和湿度条件下培养 12 d,计数有突变集落生长的孔数。突变集落按大集落(Large Colony, LC; 直径 $\geq 1/4$ 孔径,密度低)和小集落(small colony, SC; 直径 $< 1/4$ 孔径,密度高)分别计数。极小集落可再继续培养 3 d 后计数。

5.7.2 TK6 细胞

TK6 细胞表达培养 3 d 后,取适量细胞悬液,调整细胞密度至 1.5×10^5 /mL,加入 TFT(终浓度为 3 μ g/mL),混匀,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 30 000 个细胞/孔),每个剂量作 2 块~4 块板,37 °C,5% 二氧化碳,饱和湿度条件下培养 12 d,计数正常生长突变集落(normal-growth colony, NC)。然后每孔再追加适量 TFT,继续培养 12 d,计数新长成的缓慢生长突变集落(slow-growth colony, SC)。

6 数据处理与结果评价

6.1 数据处理

6.1.1 平板效率(PE_0 、 PE_2 / PE_3)

平板效率(%)的计算见式(1):

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

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)：

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

6.2 结果评价

6.2.1 试验成立的条件

试验所用 L5178Y 细胞的自发突变频率应在 $50 \times 10^{-6} \sim 200 \times 10^{-6}$ 之间; TK6 细胞的自发突变频率应在 $1.5 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-6}$ 之间,同时自发突变频率应在本实验室历史记录范围内。阴性/溶媒对照的 PE_0 在 60%~140%之间, PE_2/PE_3 的值在 70%~130%之间。阳性对照的 T-MF 与阴性/溶媒对照有显著差异,或是阴性/溶媒对照 3 倍以上。

6.2.2 受试物阳性和阴性结果的判定

6.2.2.1 阳性结果的判定。受试物一个以上剂量(浓度)组的 T-MF 显著高于阴性/溶媒对照,或是阴性/溶媒对照的 3 倍以上,并有剂量-反应趋势,则可判定为阳性。但如仅在相对存活率低于 20%的高剂量情况下出现阳性,则结果判为“可疑”。

6.2.2.2 阴性结果的判定。在相对存活率低于 20%的情况下未见突变频率的增加,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:溶媒或载体的选择依据,受试物在溶媒和载体中的溶解性和稳定性。

7.7 细胞系:名称、来源及其特性。

7.8 试验条件:溶媒、剂量、代谢活化系统、阳性对照物、操作步骤等。

7.9 试验结果:每个剂量(浓度)表达培养期间细胞的密度、0 d 的平板接种效率、第 2 天或第 3 天的平板接种效率、相对存活率、相对悬浮生长和相对总生长、总突变频率[必要时给出大集落突变频率、小集落突变频率和小集落突变百分率(L5178Y 细胞)、或正常集落突变频率、缓慢生长集落突变频率和缓慢生长集落突变百分率(TK6 细胞)]、统计结果、是否具有剂量-反应趋势、同时进行的溶媒对照和阳性对照的结果及其本实验室溶媒对照和阳性对照结果的历史范围。

7.10 试验结论。

8 试验的解释

TK 基因突变试验具有较高的敏感性,可检出包括点突变、大的缺失、重组、异倍体和其他较大范围基因组改变在内的多种遗传改变,长时间处理还可检出某些断裂剂、纺锤体毒物和多倍体诱导剂等。但体外试验不能完全模拟哺乳动物体内代谢条件,因此,本试验结果不能直接外推到哺乳动物。阳性结果表明受试样品在该试验条件下可引起所用哺乳类细胞基因突变;阴性结果表明在该试验条件下受试样品不引起所用哺乳类细胞基因突变。评价时应综合考虑生物学意义和统计学意义。