



中华人民共和国国家标准

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

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 15193.10—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。

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℃ 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。

4.1.3 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)

4.1.3.1 贮液 A:将氯化钠 160 g,氯化钾 8 g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)2 g 及氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)2 g 溶于 800 mL 双蒸水(50 °C~60 °C)中。另取无水氯化钙 2.8 g 溶于 100 mL 双蒸水中。将上述两溶液混合后,加水定容至 1 000 mL,加入三氯甲烷 2 mL,保存于 4 °C 冰箱中。

4.1.3.2 贮液 B:将磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)3.04 g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g)、磷酸二氢钾($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)1.2 g(或 KH_2PO_4 0.95 g)、葡萄糖 20 g 溶解于 800 mL 双蒸水中,加入 100 mL 0.4% 酚红溶液[取酚红 1 g,溶于 3 mL 氢氧化钠(1 mol/L)中],待完全溶解后,加入双蒸水中至 250 mL,加水定容至 1 000 mL,加入三氯甲烷 2 mL,保存于 4 °C 冰箱中。

4.1.3.3 贮液 C:1.4%碳酸氢钠以双蒸水配制。

4.1.3.4 应用液的配制:取 A 液 1 份,B 液 1 份,水 18 份,混合后分装于玻璃容器内;高压灭菌,4 °C 冰箱保存。用前加入 C 液,将 pH 调整至 7.2~7.4。

4.1.4 无钙、镁的 Dulbecco 氏磷酸缓冲液

pH7.4,取氯化钠 8.00 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.20 g、氯化钾 0.20 g、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.89 g 溶解并定容至 1 000 mL 双蒸水中。

4.1.5 0.02%乙二胺四乙酸钠或四钠(EDTA)溶液

取 EDTA 0.2 g 溶于无钙、镁的磷酸缓冲液中,定容至 1 000 mL。高压灭菌后使用。

4.1.6 抗菌素贮存液

取临床注射用青霉素 G 100 万单位及链霉素 1 g 粉剂,在无菌操作下溶于 100 mL 之灭菌蒸馏水中,使青霉素的浓度为 1 万单位,链霉素的浓度为 10 000 $\mu\text{g/mL}$,使用时每 100 mL 培养基中加入抗菌素贮存液 1 mL。

4.1.7 大鼠肝微粒体 S-9 组分的制备

S-9 混合液可按以下方式配制:将磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)86.8 mg、磷酸二氢钾 7.0 mg、氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)8.1 mg、6-磷酸葡萄糖(G-6-P) 5.4 mg、辅酶 II (Co II)(纯度 90%)4 mg 溶于 ADM 中,加入 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)溶液(1 mol/L)0.2 mL 及大鼠肝 S-9 组分 0.8 mL~4 mL 或 20 mL,并用碳酸氢钠溶液调整 pH 至 7.2~7.4。

4.1.8 显影液及定影液(放射自显影用)

4.1.8.1 Kodak D-170 显影液

贮液:无水亚硫酸钠 25 g、溴化钾 1 g,水加至 200 mL。使用时用水稀释,溶入 2-氨基酚盐酸盐(Amitol)4.5 g,定容至 1 000 mL。

4.1.8.2 Kodak D-196 显影液

水(50 °C)500 mL,顺次溶入米吐尔(硫酸对甲氨基苯酚)2 g,无水亚硫酸钠 72 g,对苯二酚 8.8 g,无水碳酸钠 48 g,溴化钾 4 g,定容至 1 000 mL。

4.1.8.3 停显液

98%冰乙酸 15 mL,定容至 1 000 mL。

4.1.8.4 Kodak F-5 定影液

水(50℃)100 mL,依次溶入海波 240 g,无水亚硫酸钠 15 g,28%乙酸 48 mL,硼酸 7.5 g,钾矾 15 g,定容至 1 000 mL。

4.1.9 高氯酸(0.25 mol/L 及 0.5 mol/L)

70%高氯酸 8.57 mL,加水至 100 mL,浓度为 1 mol/L。

4.1.10 闪烁液

称取 2,5-二苯基噁唑(PPO) 5 g,1,4-双-[5-苯基噁唑基-2]-苯(POPOP) 300 mg 溶于甲苯中,定容至 1 000 mL。

4.2 材料

推荐使用一次性细胞培养用器皿及微孔滤膜,普通试验器材使用前应按细胞培养技术要求清洗、包扎、消毒灭菌。对不带橡皮塞的玻璃及金属用具可用高温灭菌,温度升至 140℃后,保持 2 h。橡皮类及带橡皮塞之玻璃应用高压灭菌 120℃,30 min。溶液除不耐热的应用抽滤除菌外,耐热的可用高压灭菌,一般用 115℃,10 min。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物在试验时新鲜配制。先将受试物溶于适当溶媒(蒸馏水、二甲亚砷、丙酮等)中,配制成所需浓度,试验时加于培养基中,使溶媒的最终浓度为 1%,不影响细胞活性。

5.2 对照

每次试验均应同时设置加和不加代谢活化系统两种情况下的阳性和阴性(溶媒)对照。

用大鼠肝细胞进行试验时,阳性对照物可用 7,12-二甲基苯并蒽(7,12-DMBA,7,12-dimethylbenzanthracene)和 2-乙酰氨基苊(2-AAF,2-acetylaminofluorene)。如果用细胞系,在无代谢活化系统情况下,放射自显影和 LSC 检测均可用 4-硝基喹啉氧化物(4-NQO,4-nitroquinoline oxide)作为阳性对照物;而在有代谢活化系统情况下,则用 *N*-二甲基亚硝胺(*N*-dimethylnitrosamine)作为阳性对照物。

5.3 染毒浓度

受试物最高染毒浓度的选择由预试验获得。选用多个浓度受试物进行预试验,浓度应覆盖确定毒性反应的合适范围。受试物最高染毒浓度应产生一定细胞毒性。相对不溶于水的受试物应以其能达到的最高溶解度进行试验。对于易溶于水的受试物,应根据受试物细胞存活率的范围值确定染毒浓度。

5.4 代谢活化

除非采用肝原代细胞,建株细胞中药物代谢活化酶系的活性一般都很低,因此对一些需经酶代谢活化才显示其 DNA 损伤作用的化学物质,可在试验体系中加入以大鼠肝微粒体酶系及辅助因子组成的体外活化系统(S-9 混合液)。

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% 的灭菌二甲基亚砷。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,除去含有二甲基亚砷的培养基,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。

孵育结束后,用 HBSS 充分洗涤,用 1% 柠檬酸钠溶液处理 10 min,随后用乙醇(64-17-5)-冰乙酸(3:1)固定(4℃)过夜,空气中干燥后,用少量中性树胶,将盖片粘固于载玻片上,长有细胞的一面朝上,45℃烘烤 24 h。

在暗室中,将适量之核-4 乳胶移入浸渍用之玻璃器皿中,于 40℃ 水浴中融化,同时取等量之蒸馏水于一量筒中也置于该水浴中加热,待乳胶融化后,将热蒸馏水倾于乳胶液中,继续在水浴中加温,并用玻璃棒轻轻搅拌,等待 10 min~20 min,使气泡逸出。将准备作自显影处理之玻片置于水浴之平台上预热。将玻片垂直浸渍于 1:1 稀释之乳胶液中约 5 s,徐徐提出玻片,并将玻片背面之乳胶用纱布或擦镜纸拭去,将已涂有乳胶之玻片移入温度为 29℃ 及一定湿度之温箱中(4 h)待乳胶干涸。然后置于内置适量干燥剂(变色硅胶)袋之曝光盒中。曝光盒外包以黑色避光纸及塑料纸,置于 4℃ 冰箱中曝光 10 d。曝光结束后,将玻片移入有机玻璃制成的玻片架上,在液温为 19℃ 之 D-170 或 D-196 显色液中显影 5 min,在停显液中漂洗 2 min,在 F-5 定影液中定影 6 min~10 min,再用水漂洗数小时。

细胞可在乳胶涂片前用地衣红(2%)冰乙酸溶液或在显影液后用 H.E 或 Giemsa 染液染色。将玻片脱水透明后,用盖片封固。

在油渍镜下,计数各样本细胞核的显影银粒数,同时计数相同面积之本底银粒数,并计算出两者的差值。每张玻片至少计数 50 个细胞核,计算出对照组、各受试物组及阳性对照组的银粒数的均值和标准差等统计量。

为了区分 UDS 和正常的 DNA 半保留复制,可采用精氨酸缺乏的培养基、低血清培养基或在培养基中添加羟基脲的方法来减少和抑制正常的 DNA 半保留复制。

5.6.2 UDS 的液体闪烁技术显色法

将试验用细胞悬于生长用培养基中,细胞浓度为 0.5×10^5 个/mL,将细胞接种于液体闪烁计数瓶中,每瓶 1 mL,并加入 ^{14}C 胸腺嘧啶核苷终浓度为 $0.01 \mu\text{Ci/mL}$ (50 mCi/mmol)。37℃ 中培养 48 h 使细胞增殖并预标记,去培养基并用 HBSS 洗涤后,换以含 ^{14}C -胸腺嘧啶核苷($0.01 \mu\text{Ci/mL}$)之同步用培养基,在 37℃ 中进行同步培养 2 d~4 d,于试验前一天下午去培养基,用 HBSS 充分洗涤后,加入含有羟基脲 [$c(\text{HU}) = 10 \text{ mmol/L}$] 之同步用培养基,37℃ 中孵育 16 h,UDS 的诱发同放射显影显示法,细胞在含有 HU 及 ^3H -胸腺嘧啶核苷($5 \mu\text{Ci/mL}$, 30 Ci/mmol)之同步用培养基中与不同浓度之受试物接触 5 h,孵育结束后,去培养基及受试物。以冷盐水洗涤 2 次,随后用冰冷的过氯酸 [$^{7601-90-3}$, $c(\text{HClO}_4) = 0.25 \text{ mol/L}$] 溶液处理 2 次,每次 2 min,再用乙醇处理 10 min,干后以 0.5 mL 过氯酸 [$c(\text{HClO}_4) = 0.5 \text{ mol/L} \sim 1 \text{ mol/L}$] 于 75℃~80℃ 之恒温箱中水解 40 min。冷却后加入乙二醇乙醚 3.5 mL 及闪烁液(PPO 0.5%、POPOP 0.03%,以甲苯为溶媒)5 mL,振荡均匀,以液体闪烁计数器测定各样本中之 ^{14}C 及 ^3H 的放射活性。每组(包括对照组)至少做 6 个培养瓶。

标本中的 ^3H 放射活性即反映 UDS 中 ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入量;而 ^{14}C 的放射活性反映试验细胞的数目或其 DNA 量,因此 ^3H 和 ^{14}C 放射活性之比($^3\text{H}/^{14}\text{C}$)即为细胞单位数或单位质量 DNA 中 UDS 水平。若将阴性对照组的 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 作为 100% (1.00),计算出各受试物组与阴性对照组的变量及受试物组各测试浓度的均值和标准差等统计量。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

选用合适的统计方法如“ t 检验”,判断各受试物组与溶媒对照组间差异有无统计学意义,对数据进行分析 and 评价。

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。
