

体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验

V79/HGPRT gene mutation test

1 主题内容与适用范围

本标准规定了体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验的基本技术要求。
本标准适用于需要进行食品安全性评价的用作或用于食品的化学物质。

2 原理

细胞在正常培养条件下,对 6-TG 的毒性作用敏感,不能生存,在致癌物和致突变物作用下,某些细胞 X 染色体上控制次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(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。这些突变细胞在含有 6-TG 的选择性培养液中能继续分裂并形成集落。根据突变集落形成数,计算突变率以判定受试物的致突变性。

3 材料和试剂

3.1 细胞:使用中国仓鼠肺(V79)细胞株。为了减少自发突变率,正式实验前先将野生型细胞群体中存在的自发 HGPRT 座位突变体选择性杀灭,方法是将野生型细胞接种于含次黄嘌呤及胸腺嘧啶,氨甲蝶呤,甘氨酸的 MEM 培养液中培养 1 周,然后重新接种于 MEM 培养液中。

3.2 培养液:采用 MEM(Eagle)基础培养液或 DMEM 培养液,补以 10%小牛血清及适量抗菌素(青霉素,链霉素)。

3.3 磷酸缓冲液(无钙、镁 PBS)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	200 mg
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.89 g
氯化钾(KCl)	200 mg
氯化钠(NaCl)	8.0 g
双蒸水	1 000 mL

高压消毒,121℃,0.103 MPa,20 min。

3.4 胰蛋白酶/EDTA 溶液:用无钙、镁 PBS 配制,胰酶的浓度为 0.05%,EDTA 的浓度为 0.02%,胰蛋白酶与 EDTA 溶液按 1:1 混合。—20℃贮存。

3.5 受试物:最好能溶于培养液。也可溶于二甲基亚砜(DMSO),其浓度应低于 0.5%(V/V)。

3.6 阳性对照物:可根据受试物的性质和结构选用不同的阳性对照物,例如甲基磺酸乙酯(EMS),丝裂霉素 C(MMC),甲基硝基亚硝基胍(MNNG),苯并(a)芘(BP)等。

3.7 6-TG 用 0.5%碳酸氢钠溶液配成 1.0 mg/mL,4℃贮存。

3.8 大鼠肝匀浆 S-9 混合物,按 Ames 试验程序制备。

4 实验步骤

4.1 细胞准备:将 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 平皿中,于 37℃,5%二氧化碳培养箱中放置

24 h。

4.2 接触受试物：吸去培养液，PBS 洗两次，加入无血清培养液及一定浓度的受试物（需代谢活化者同时加入大鼠肝匀浆 S-9 混合物），置于培养箱中 2 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 19~22 h。

4.3 表达：接触受试物的细胞继续培养 19~22 h 后用胰酶-EDTA 消化，待细胞脱落后，加入含 10% 血清培养液终止消化，混匀，放入离心管以 800~1 000 r/min 的速度离心 5~7 min，弃去上清液，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 后分传一次，仍接种 5×10^5 个细胞培养 3 d。

4.4 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℃，5% 二氧化碳条件下培养 7 d，固定，Giemsa 染色，计数每皿集落数，以相对于溶剂对照组的集落形成率表示细胞毒性，即以溶剂对照的集落形成率为 100% (1.00)，求出各检品试验组的相对值。

$$A(\%) = \frac{B}{C} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：A——相对集落形成率；

B——试验组集落形成率；

C——溶剂对照组集落形成率。

4.5 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，每皿种 2×10^5 个细胞，待细胞贴壁后加入 6-TG，终浓度为 5 μ g/mg，放入培养箱培养 8~10 d 后固定，Giemsa 染色，统计每皿集落数，并计算突变率。同时另做集落形成率测定，每皿接种 200 个细胞，不加 6-TG，每组 5 个皿，7 d 后固定染色，计算集落形成率。

$$D = \frac{E}{F} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：D——集落形成率；

E——实际存活的细胞集落数；

F——接种细胞数。

4.6 计算

$$G = \frac{H}{I} \times \frac{1}{D} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：G——突变率；

H——突变集落数；

I——接种细胞数；

D——集落形成率。

5 结果判定

5.1 若阴性对照中，集落形成率低于 50%，结果应不予采用。

5.2 各实验室选用的阳性对照突变率有一定范围，若受试物的结果为阴性或弱阳性时，阳性对照的诱变率应达正常值的下线以上，否则结果不能成立。

5.3 当突变率为自发突变率的 3 倍或 3 倍以上，或至少在 3 个浓度范围内突变率有随浓度递增而升高的剂量反应关系时，可判为阳性。

附加说明：

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由卫生部食品卫生监督检验所负责起草。

本标准主要起草人冯继农、高芑。

本标准由卫生部委托技术归口单位卫生部食品卫生监督检验所负责解释。