



中华人民共和国国家标准

GB 15193.20—2003

TK 基因突变试验

TK gene mutation test

2003-09-24 发布

2004-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准全文强制。

本标准参考美国 FDA 营养素补充剂与食品安全中心食品添加剂安全办公室发布的“食品成分安全评价毒理学原则 2000 年版红皮书(2001 年 9 月发布):IV.C.1.c. 小鼠淋巴瘤胸腺嘧啶激酶基因突变试验(IV.C.1.c. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay)”。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位:四川大学华西公共卫生学院、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人:张立实、张建清、帅培强、王怡净。

本标准首次发布。

TK 基因突变试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类细胞 TK 位点基因突变试验的基本技术要求与方法。

本标准适用于评价食品生产、加工、保藏、运输和销售过程中所涉及的可能对健康造成危害的化学、生物和物理因素的遗传毒性,检验对象包括食品添加剂(含营养强化剂)、食品新资源及其成分、新资源食品、辐照食品、食品容器与包装材料、食品工具、设备、洗涤剂、消毒剂、农药残留、兽药残留、食品工业用微生物等。

2 原理

TK 基因突变试验的检测终点是胸苷激酶(thymidine kinase, TK)基因的突变。在人类,TK 基因定位于 17 号染色体长臂远端;在小鼠则定位于 11 号染色体。故 TK 基因的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 TFT——trifluorothymidine),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,计算突变频率,以判定受试物的致突变性。

3 试剂与材料

3.1 细胞:L5178Y tk^{+/-} 3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞。为清除自发突变的 tk^{-/-} 基因型细胞,在正式实验前,应使用含 3 μg/mL 胸苷,5 μg/mL 次黄嘌呤,0.1 μg/mL 氨甲碟呤和 7.5 μg/mL 甘氨酸的 THMG 培养基中处理 24 h,离心、洗涤后在不含氨甲碟呤的 THMG 培养基中培养 3 天。

3.2 试剂:PBS 磷酸盐缓冲液,三氟胸苷(trifluorothymidine),次黄嘌呤(hypoxanthine),甘氨酸(glycine),氨甲碟呤(methotrexate),胸腺嘧啶核苷(thymidine),阳性对照物(MMS,MMC,环磷酰胺等)。

4 试验设计

一般应进行细胞毒性预试验,根据预试验结果,在相对存活率(relative survival,RS)为阴性对照组的 20%~80%范围内设 3 个~4 个剂量(浓度)水平。每次试验均需设阴性(双蒸水)对照,通常亦需设阳性对照。阳性对照通常使用 MMS、EMS、MMC、CP(环磷酰胺)等。如使用非水溶剂,则亦需设溶剂对照。

5 操作步骤

5.1 培养液和培养条件:含 10% 马血清和适量抗菌素的 RPMI 1640 培养液(96 孔板培养时使用含 20% 马血清的 RPMI 1640 培养液),5% 二氧化碳、37℃、饱和湿度条件下作常规悬浮培养。

5.2 处理:取生长良好的细胞,调整密度为 5×10⁵/mL,按 1% 体积加入受试物,37℃ 震荡处理 3 h。离心,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 2×10⁵/mL。

5.3 PE₀(0天的平板接种效率)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),每个剂量作1块~2块板,37℃,5%二氧化碳,饱和湿度条件下培养12天,计数每块平板有集落生长的孔数。

5.4 表达:步骤(1)所得细胞悬液作2天表达培养,每天计数细胞密度并保持密度在10⁶/mL以下。计算相对悬浮生长(Relative Suspension Growth, RSG)。

5.5 PE₂(第二天的平板接种效率)测定:2天表达培养结束后,取适量细胞悬液,按步骤(2)作梯度稀释并接种96孔板,培养12天后计数每块平板有集落生长的孔数。

5.6 TFT抗性突变频率(tk-MF)测定:2天表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为1×10⁴/mL,加入TFT(三氟胸苷,终浓度为3 μg/mL),混匀,接种96孔板(每孔加0.2 mL,即平均2000个细胞/孔),每个剂量作2~4块板,37℃,5%二氧化碳,饱和湿度条件下培养12天,计数有突变集落生长的孔数。突变集落按大集落(LC:直径≥1/4孔径,密度低)和小集落(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天后计数。

6 数据处理

6.1 平板效率(PE₀和PE₂)

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

式中:

EW——无集落生长的孔数;

TW——总孔数;

1.6——每孔接种细胞数。

6.2 相对存活率(%)

$$\text{相对存活率 } RS(\%) = \frac{PE(\text{处理})}{PE(\text{对照})} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

6.3 相对悬浮生长(RSG)

$$\text{相对悬浮生长 (RSG)} = \frac{\text{处理组表达期间细胞增殖倍数}}{\text{对照组表达期间细胞增殖倍数}} \dots\dots\dots (3)$$

6.4 相对总生长(RTG)

$$RTG = RSG \times RS_2 \dots\dots\dots (4)$$

式中:

RS₂——第二天的相对存活率, %。

6.5 TFT抗性突变频率(MF)

$$MF \times 10^{-6} = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE_2} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

EW——无集落生长的孔数;

TW——总孔数;

n——每孔接种细胞数(2000)。

应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)。

6.6 小集落突变百分率(SCM)

$$\text{小集落突变百分率}(\%) = (S-MF)/(T-MF) \dots\dots\dots (6)$$

7 结果判定

7.1 试验成立的条件

阴性对照和溶剂对照的 $PE_0 = 60\% \sim 140\%$, $PE_2 = 70\% \sim 130\%$, T-MF < 本实验室历史记录的 2 倍 (或 $< 240 \times 10^{-6}$), 小集落突变百分率 = $30\% \sim 60\%$, 阳性对照的 T-MF 与阴性/溶剂对照有显著差异, 或比阴性/溶剂对照高 100×10^{-6} 以上。

7.2 受试物阳性和阴性结果的判定

受试物一个以上浓度组的 T-MF 与阴性/溶剂对照有显著差异, 或比阴性/溶剂对照高 100×10^{-6} 以上, 并有剂量反应关系, 则可判定为阳性。但如仅在相对存活率达 -20% 的高剂量情况下出现阳性, 则结果判为“可疑”。

阴性结果的判定需在相对存活率达 -20% 的情况下未见突变频率增加方可做出。
