



中华人民共和国国家标准

GB 15193.5—2003
代替 GB 15193.5—1994

骨髓细胞微核试验

Bone marrow cell micronucleus test

2003-09-24 发布

2004-05-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准全文强制。

本标准代替 GB 15193.5—1994《骨髓微核试验》。

本标准与 GB 15193.5—1994 相比主要修改如下：

- 在“范围”中增加了受试物的具体内容：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，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；增加不适用范围；
- 在“剂量分组”内容中：将高剂量组的设计方法增加“急性毒性试验给予受试物最大剂量（最大使用浓度和最大灌胃容量）求不出 LD_{50} 时，高剂量组则按以下顺序：a) 10 g/kg 体重；b) 人的可能摄入量的 100 倍；或 c) 一次最大灌胃剂量进行设计”；
- 将“结果评价”统一改为“结果判定”，并增加“一般阴性对照组的微核率 $< 5\%$ ，供参考。但应有本试验室所用实验动物的自发微核率作参考”。

自本标准实施之日起，GB 15193.5—1994 同时废止。

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：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、浙江省卫生防疫站。

本标准主要起草人：徐凤丹、韩驰、赵硕。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

骨髓细胞微核试验

1 范围

本标准规定了微核试验的基本技术要求。

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、生物和物理因素的致突变作用,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。

本标准不适用于有证据表明受试物或其代谢产物不能达到靶组织的情况。

2 原理

微核是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时,仍然留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝粒断片或环。它在末期以后,单独形成一个或几个规则的次核,被包含在细胞的胞质内而形成,由于比核小得多故称微核。这种情况的出现往往是受到染色体断裂剂作用的结果。另外,也可能在受到纺锤体毒物的作用时,主核没有能够形成,代之以一组小核。此时小核往往比一般典型的微核稍大。

3 仪器与试剂

3.1 仪器

解剖器械,生物显微镜,载玻片等。

3.2 试剂

全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

3.2.1 小牛血清,小牛血清滤菌后放入 56℃ 恒温水浴保温 1 h 进行灭活。通常储存于 4℃ 冰箱里。亦可用大、小鼠血清代替。

3.2.2 Giemsa 染液,称取 Giemsa 染液 3.8 g,加入 375 mL 甲醇(分析纯)研磨,待完全溶解后,再加入 125 mL 甘油。置 37℃ 恒温箱保温 48 h 振摇数次。过滤两周后用。

3.2.3 Giemsa 应用液,取 1 份 Giemsa 染液与 6 份磷酸盐缓冲液混合而成。临用时配制。

3.2.4 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8):

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	4.50 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	11.81 g
加蒸馏水至	1 000 mL

3.2.5 甲醇(分析纯)。

4 实验动物

小鼠是微核试验的常规动物,也可选用大鼠。通常用 7 周~12 周龄,体重 25 g~30 g 的小鼠或体重 150 g~200 g 的大鼠。每组用两种性别的动物至少各 5 只。动物购买后适应环境至少 3 天。

5 剂量及分组

受试物应设三个剂量组,最高剂量组原则上为动物出现严重中毒表现和/或个别动物出现死亡的剂量,一般可取 1/2LD₅₀,低剂量组应不表现出毒性,分别取 1/4LD₅₀ 和 1/8LD₅₀ 作为中、低剂量。急性毒

性试验给予受试物最大剂量(最大使用浓度和最大灌胃容量)动物无死亡而求不出 LD_{50} 时,高剂量组则按以下顺序:a) 10 g/kg 体重;b) 人的可能摄入量的 100 倍;或 c) 一次最大灌胃剂量进行设计,再下设中、低剂量组。另设溶剂对照组和阳性对照组。阳性对照物可用环磷酰胺 40 mg/kg 体重经口或腹腔注射(首选经口)给予。

6 操作步骤

6.1 受试物配制

一般用蒸馏水作溶剂,如受试物不溶于水,可用食用油、医用淀粉、羧甲基纤维素等配成乳化液或悬浊液。受试物应于灌胃前新鲜配制,除非有资料表明以溶液(或悬浊液、乳浊液等)保存具有稳定性。

6.2 实验动物的处理

经口灌胃。根据细胞周期和不同物质的作用特点,可先做预试,确定取材时间。常用 30 h 给受试物法。即两次给受试物间隔 24 h,第二次给受试物后 6 h,颈椎脱臼处死动物。

6.3 标本制备

取胸骨或股骨,用止血钳挤出骨髓液与玻片一端的小牛血清混匀,常规涂片,或用小牛血清冲洗股骨骨髓腔制成细胞悬液涂片,涂片自然干燥后放入甲醇中固定 5 min~10 min。当日固定后保存。将固定好的涂片放入 Giemsa 应用液中,染色 10 min~15 min。立即用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液或蒸馏水冲洗、晾干。写好标签,阴凉干燥处保存。

6.4 阅片

选择细胞完整、分散均匀,着色适当的区域,在油镜下观察。以有核细胞形态完好作为判断制片优劣的标准。

本法系观察嗜多染红细胞的微核。用 Giemsa 染色法,嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈粉红色。典型的微核多为单个的、圆形、边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,直径通常为红细胞的 $1/20\sim 1/5$ 。

用双盲法阅片。每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞,观察含有微核的嗜多染红细胞数,微核率以千分率表示。

观察嗜多染红细胞与成熟红细胞(PCE/RBC),可作为细胞毒性指标之一。一般计数 200 个嗜多染红细胞。受试物组未成熟红细胞占红细胞总数的比例不应少于对照组的 20%。

7 数据处理

一般采用卡方检验、泊松分布、或双侧 t 检验等统计方法进行数据处理,并按动物性别分别统计。

8 结果判定

试验组与对照组相比,试验结果微核率有明显的剂量反应关系并有统计学意义时,即可确认为阳性结果。若统计学上差异有显著性,但无剂量反应关系时,则须进行重复试验。结果能重复者可确定为阳性。一般阴性对照组的微核率 $< 5\%$,供参考。但应有本试验室所用实验动物的自发微核率作参考。