

ICS 07.100
C 53



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 氨甲喋呤和 7.5 μg/mL 甘氨酸的 THMG 培养基中处理 24 h,离心、洗涤后在不含氨甲喋呤的 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),氨甲喋呤(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 5×10^5 /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 2×10^5 /mL。