



中华人民共和国国家标准

GB 15193.12—2003
代替 GB 15193.12—1994

体外哺乳类细胞(V79/HGPRT) 基因突变试验

V79/HGPRT 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。

本标准代替 GB 15193.12—1994《体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验》。

本标准与 GB 15193.12—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。

自本标准实施之日起，GB 15193.12—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。

本标准主要起草人：冯继农、高 。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验

1 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

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/或致突变物作用下,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、氨甲喋呤、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 磷酸盐缓冲液(无钙、镁 PBS)

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	200 mg
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ 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℃储存。

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%(体积分数)。

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,例如乙基磺酸酯(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℃储存。

3.8 大鼠肝匀浆 S-9 混合液:按 Ames 试验程序制备。

4 操作步骤

4.1 细胞准备:将5×10⁵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