



中华人民共和国国家标准

GB 15193.8—2014

食品安全国家标准

小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验

2014-12-24 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 15193.8—2003《小鼠睾丸染色体畸变试验》。

本标准与 GB 15193.8—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验”;
- 修改了范围;
- 修改了术语和定义;
- 修改了试验和目的原理;
- 修改了实验动物要求;
- 修改了试验步骤和观察指标;
- 增加了试验报告内容要求。

食品安全国家标准

小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验

1 范围

本标准规定了小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验的基本试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物对小鼠生殖细胞染色体的损伤,根据具体情况选择精原细胞或精母细胞作为靶细胞。

2 术语和定义

2.1 精原细胞

雄性哺乳动物曲细精管上皮中能经过多次有丝分裂增殖并经减数分裂产生精母细胞的干细胞,为原始的雄性生殖细胞。具有体细胞相同的染色体数目。

2.2 精母细胞

精原细胞经减数分裂产生的能最终分化成成熟精子的细胞,分为初级精母细胞和次级精母细胞。次级精母细胞染色体数减半成 $1n$ 。

2.3 染色体结构畸变

在细胞有丝分裂中期,通过显微镜可以直接观察到的染色体结构变化。结构畸变可分为染色体型畸变和染色单体型畸变。

2.4 染色体型畸变

染色体结构损伤,表现为在两个染色单体的相同部位均出现断裂或断裂重接。

2.5 染色单体型畸变

染色体结构损伤,表现为染色单体断裂或断裂重接。

2.6 染色体数目畸变

染色体数目发生改变,不同于正常二倍体核型,包括整倍体和非整倍体。

3 试验目的和原理

经口给予实验动物受试样品,一定时间后处死动物。观察睾丸精原细胞或精母细胞染色体畸变情况,以评价受试样品对雄性生殖细胞的致突变性。

动物处死前,用细胞分裂中期阻断剂处理,处死后取出两侧睾丸,经低渗、固定、软化及染色后制备精原细胞或精母细胞染色体标本,在显微镜下观察中期分裂相细胞,分析精原细胞或精母细胞染色体畸变。

4 仪器和试剂

4.1 实验室常用设备

实验室常用解剖器械、电子天平、冰箱、离心机等。

4.2 试剂

4.2.1 0.1%秋水仙素

置于棕色瓶中,冰箱保存。

4.2.2 1%柠檬酸三钠

取 1 g 柠檬酸三钠(分析纯),加蒸馏水至 100 mL。

4.2.3 60%冰乙酸

取 60 mL 冰乙酸(分析纯),加蒸馏水至 100 mL。

4.2.4 固定液

甲醇:冰乙酸=3:1,现用现配。

4.2.5 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

磷酸氢二钠溶液(1/15 mol/L):磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 ,分析纯)9.47 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

磷酸二氢钾溶液(1/15 mol/L):磷酸二氢钾(KH_2PO_4 ,分析纯)9.07 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

取磷酸氢二钠溶液(1/15 mol/L) 80 mL 与磷酸二氢钾溶液(1/15 mol/L)20 mL 混合,调 pH 至 7.4。

4.2.6 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 °C 恒温箱保温 48 h 振摇数次。过滤两周后用。

4.2.7 Giemsa 应用液

取 1 份 Giemsa 染液与 9 份磷酸盐缓冲液混合而成,现用现配。

5 试验方法

5.1 实验动物

5.1.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。健康成年雄性小鼠,周龄为 7 周~12 周,试验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。动物应随机分组,每组至少包括 5 只可用于分析的动物。如试验设有几个采样的时间点,则要求每个采样时间点都至少有 5 只能用于分析的动物。

5.1.2 动物准备

试验前动物在实验动物房至少应进行 3 d~5 d 环境适应和检疫观察。

5.1.3 动物饲养

实验动物饲养条件应符合 GB 14925、饮用水应符合 GB 5749、饲料应符合 GB 14924 的有关规定。

5.2 受试物配制

应将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中。首选溶媒为水,不溶于水的受试物可使用植物油(如玉米油等),不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物。受试物应现用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

5.3 剂量

5.3.1 对照组

每次试验均应设置相应的阴性(溶媒)和阳性对照,阴性对照组除不使用受试样品外,其他处理与受试物组一致。

阳性对照组应在精原细胞和精母细胞观察到高于背景的染色体畸变的增加。阳性对照组的染毒途径可不同于受试物的给予途径,可仅在一个时间点采样。常用的阳性对照物有环磷酰胺(40 mg/kg 体重,单次腹腔注射)或丝裂霉素 C(1.5 mg/kg 体重~2 mg/kg 体重,单次腹腔注射)。

5.3.2 剂量及分组

受试物应设 3 个剂量组,最高剂量组原则上为动物出现中毒表现和(或)个别动物出现死亡的剂量,一般可取急性经口毒性 LD_{50} 的 50% 作为高剂量,按等比级数 2~4 向下设置中、低剂量,低剂量组不应表现出毒性。急性经口毒性试验无法得出 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;
- c) 一次最大灌胃剂量进行设计,再下设中、低剂量组。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 实验动物的处理

5.4.1.1 精原细胞

经口灌胃给予受试物,一般为一次给予受试物。受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 20 mL/kg 体重。如果给予的剂量较大,也可在 1 d 内分两次给予受试物,其间隔时间最好为 4 h~6 h。高剂量组应于末次给予受试物后的第 24 小时和第 48 小时处死动物采样,中低剂量组的动物均在末次给予受试物后 24 h 处死动物采样。

5.4.1.2 精母细胞

灌胃给予受试物,每天一次,连续 5 d。受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 20 mL/kg 体重。各组均于第一次给予受试物后的第 12 天~第 14 天将动物处死采样。

5.4.2 秋水仙素的使用

动物处死前 3 h~5 h 腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg 体重~6 mg/kg 体重(注射体积:10 mL/kg 体重~

20 mL/kg 体重)。秋水仙素宜当天现用现配。

5.4.3 标本制备

5.4.3.1 取材

用颈椎脱臼法处死小鼠,打开腹腔,取出两侧睾丸,去净脂肪,于低渗液中洗去毛和血污,放入盛有适量 1%柠檬酸三钠或 0.4%氯化钾溶液的小平皿中。

5.4.3.2 低渗

5.4.3.2.1 精原细胞

以眼科镊撕开被膜,轻轻地分离曲细精管,加入 1%柠檬酸三钠溶液 10 mL,用滴管吹打曲细精管,静止 2 min,使曲细精管下沉,将含有许多精子的上清液仔细吸去。留下的曲细精管重新用 10 mL 1%柠檬酸三钠处理 10 min。

5.4.3.2.2 精母细胞

以眼科镊撕开被膜,轻轻地分离曲细精管,加入 1%柠檬酸三钠溶液 10 mL,用滴管吹打曲细精管,室温下静止 20 min。

5.4.3.3 固定

仔细吸尽上清液,加固定液 10 mL 固定。第一次不超过 15 min,倒掉固定液后,再加入新的固定液固定 20 min 以上。如在冰箱(0 °C~4 °C)过夜固定更好。

5.4.3.4 离心

吸尽固定液,加 60%冰乙酸 1 mL~2 mL,待大部分曲细精管软化完后,立即加入倍量的固定液,打匀、移入离心管,以 1 000 r/min 离心 10 min。

5.4.3.5 滴片

弃去大部分上清液,留下约 0.5 mL~1.0 mL,充分打匀制成细胞混悬液,将细胞混悬液均匀地滴于冰水玻片上。每个样本制得 2 张~3 张。空气干燥或微热烘干。

5.4.3.6 染色

用 1:10 Giemsa 应用液染色 10 min(根据室温染色时间不同),用蒸馏水冲洗、晾干。

5.5 阅片

5.5.1 编号

所有玻片,包括阳性对照和阴性对照,在镜检前均要分别编号。

5.5.2 镜检

在低倍镜下按顺序寻找背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相,然后在油镜下进行分析。

5.5.3 染色体分析

注:每个动物至少记数 100 个中期分裂相细胞,每个剂量组至少观察 500 个中期分裂相。当观察到的畸变细胞数

量较多时,可以减少观察的细胞数。由于固定方法常导致染色体的丢失,所以计数的精原细胞应含染色体数为 $2n \pm 2$ 的中期分裂相细胞,计数的精母细胞应含染色体数为 $1n \pm 1$ 的中期相细胞。

5.5.3.1 精原细胞

5.5.3.1.1 确定有丝分裂指数

每只动物至少要观察 1 000 个细胞以确定精原细胞有丝分裂指数。高剂量组精原细胞有丝分裂指数应不低于对照组的 50%。

5.5.3.1.2 染色体数目改变

正常精原细胞中期分裂相中常见到多倍体,因此阐明多倍体的意义时应慎重。

5.5.3.1.3 染色体结构畸变

染色体的结构畸变中,包括断裂、断片、微小体、无着丝点环、环状染色体、双或多着丝点染色体、单体互换等。

5.5.3.2 精母细胞

除了可见到裂隙、断片、微小体外,还要分析相互易位、X-Y 和常染色体的单价体。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

对每个动物记录含染色体结构畸变的细胞数和每个细胞的染色体畸变数,并列表给出各组不同类型的染色体结构畸变数目和频率。试验组与阴性对照组的断片、易位、畸变细胞率、常染色体单价体、性染色体单价体等分别按二项分布进行统计处理,染色体裂隙、单价体应分别记录和报告,一般不计入畸变率。

6.2 结果评价

受剂量组染色体畸变率或畸变细胞率与阴性对照组相比,差别有统计学意义,并有明显的剂量-反应关系,结果可定为阳性。在一个受剂量组中出现染色体畸变率或畸变细胞率差异有统计学意义,但无剂量-反应关系,则需进行重复试验,结果可重复者定为阳性。

7 试验报告

7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。

7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

7.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。

7.4 试验摘要。

7.5 受试物名称、有效成分及其 CAS 号(如已知)、代码(如有)、纯度(或含量)、剂型、生产日期(批号)、外观性状、配制所用溶媒和方法。

7.6 实验动物物种、品系、级别、数量、体重、性别、来源(供应商名称、实验动物质量合格证号、实验动物生产许可证号),检疫、适应情况,饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号),饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。

7.7 试验条件和方法,剂量分组、剂量选择依据、受试物给予途径和方式、受试物配制过程、采样时间点、中期阻断剂的名称、浓度及处理时间、简述标本制备方法、每只动物观察的细胞数、统计方法和判定标准。

7.8 试验结果:每只动物细胞染色体的畸变类型和畸变细胞数,每组动物细胞染色体畸变类型和数量及有畸变的细胞数、剂量反应关系、阴性对照的历史资料及范围。以列表方式报告受试物组、阴性对照组和阳性对照组的染色体畸变类型、数量和畸变细胞率,并写明结果的统计方法。

7.9 试验结论:根据试验结果,对受试物是否有致突变作用,做出结论。
