



中华人民共和国国家标准

GB/T 21786—2008

化学品 细菌回复突变试验方法

Chemicals—Test method of bacterial reverse mutation

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 471(1997 年)《细菌回复突变试验》(英文版)。

本标准作了以下编辑性修改:

- 增加了范围部分;
- 计量单位改成我国法定计量单位;
- 删除了 OECD 的参考文献部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位:北京市疾病预防控制中心、宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:邓瑛、穆啸群、吴维皑、赵超英、龙再浩。

OECD 引言

1. 细菌回复突变试验应用需要氨基酸的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株去检测由 DNA 的一个或数个碱基对的置换、增加或缺失造成的点突变。本试验的原理是检测试验株中存在的回复突变并恢复合成必需氨基酸的能力。发生回复突变的细菌能在缺乏特定必需氨基酸的条件下生长,而亲代菌株则不能生长,故能检出。当营养缺陷型菌株在受试样品作用下发生回复突变后,即恢复了合成特定氨基酸的能力,因此可以在不含该氨基酸的培养基上形成菌落,而那些没有发生突变的菌株和突变菌株的亲代菌株则因无法合成特定氨基酸而不能在不含该氨基酸的培养基上形成菌落。

2. 点突变是人类的很多遗传性疾病的原因,而且,目前已有充足的证据证明,人和实验动物体细胞的癌基因和抑癌基因的点突变与肿瘤发生有关。细菌回复突变试验具有快速、经济和操作相对简便等优点。很多试验菌株还具有某些特征,使其对某类致突变物更加敏感,这些特征包括回复突变位点的应答性 DNA 序列、细胞对大分子物质的通透性增高以及 DNA 修复系统的消除(缺失)或 DNA 易错修复增多等。通过特异性菌株获得的试验结果可为遗传毒性物质诱发的突变类型提供有价值的研究资料。已建立了包含大量不同结构化学物的细菌回复突变试验结果的数据库,可以从中得到所需资料,同时,还为测试不同理化性质的化学物(例如可对挥发性物质)建立了完善的方法。

3. 细菌恢复突变试验应用的是原核细胞,其在吸收、代谢、染色体结构、DNA 修复过程等方面与哺乳动物细胞都有差别。且本试验是体外试验,一般需要加入外源性代谢活化系统。但外源性代谢活化系统不能完全模拟体内代谢条件,因此,本试验的结果不能为受试样品对哺乳动物的致突变性和致癌性提供直接证据。

4. 细菌回复突变试验通常作为遗传毒性初筛试验,尤其适用于对受试样品诱发点突变能力的检测。大量研究数据表明,很多在本试验中获得阳性结果的化学物在其他试验中也具有致突变活性。但也有一些致突变剂在本试验中(结果)为阴性的例子,本试验存在这种缺陷可能是由于检测终点的特殊性质、代谢活化过程不同以及生物利用度的差异等原因造成的。另一方面,一些使本试验灵敏度增加的因素也会造成对致突变活性估计过高。

5. 细菌回复试验不适合评价某些类型的化学物,例如,具有较强杀菌作用的化合物(如某些抗生素)、认为或已知对哺乳动物细胞复制过程有特异性干扰作用的化合物(如拓扑异构酶抑制剂、核苷酸类似物等),这些物质选用哺乳动物的致突变试验更合适。

6. 尽管很多在本试验中获得阳性结果的化学品是哺乳动物的致癌物,但这种相关性并不是绝对的,而是与化学物的种类有关。还有一些致癌物不能用本试验检出,因为这些物质是通过其他的、非遗传致癌机制或受试菌株不具备(存在)的机制引发癌症的。

化学品 细菌回复突变试验方法

1 范围

本标准规定了化学品细菌回复突变试验的范围、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测化学品(有杀菌作用的除外)的致突变性。

2 术语和定义

下列定义和术语适用于本标准。

2.1

回复突变试验 reverse mutation test

在鼠伤寒沙门氏菌(*salmonella typhimurium*)或大肠杆菌(*escherichia coli*)中检测需要氨基酸菌株(分别为组氨酸和色氨酸)的突变,以产生一株不依赖外界提供氨基酸的菌株。

2.2

碱基对置换突变剂 base pair substitution mutagens

能够引起 DNA 碱基改变的物质。在回变试验中,这种改变可发生在原发突变位点,在细菌基因组中也可在第二位点发生突变。

2.3

移码突变剂 frameshift mutagens

能够引起 DNA 中单个或多个碱基对的增加或缺失,继而改变了 RNA 的读码框的物质。

3 试验基本原则

3.1 细菌悬液分别在加入或不加入外源性代谢活化系统的条件下与受试样品接触,在平皿掺入试验中,将上述混合物与顶层琼脂充分混匀,迅速倾入底层琼脂平板(最低营养琼脂)上。在预孵育试验中,先将细菌悬液与受试样品混合进行预孵育,然后再与顶层琼脂充分混匀,迅速倾入底层琼脂平板(最低营养琼脂)上。上述平皿培养 2 d~3 d 后,计数回复菌落数并与溶剂对照组的自发回复菌落数进行比较。

3.2 细菌回复突变试验有数种操作方法,其中最常用的是平皿掺入法、预孵育法、震荡培养法和悬浮培养法等。还有用于检测气体或蒸气的改良方法。

3.3 本标准所描述的主要是平皿掺入法和预孵育法。这两种方法在加入或不加入代谢活化系统的条件下都能进行。有些化学品用预孵育法更有效,包括短链脂族亚硝胺、二价金属、醛类、偶氮染料和重氮化合物、千里光生物碱、烯丙基化合物和硝基化合物。在研究中还发现某些类别的化学品用标准的方法,如平皿掺入法和预孵育法并非总能检出阳性结果,这种情况应视作“特例”,并强烈建议采用其他替代试验程序进行检测。在文献中,已用替代方法对下列“特例”的致突变性进行了鉴定(同时提供了所用试验程序的例子)，“特例”一般包括偶氮染料和重氮化合物,气态或挥发性物质和葡萄糖苷等。对标准方法的改动应有科学依据。

4 试验方法

4.1 试验准备

4.1.1 细菌

4.1.1.1 新鲜的细菌培养物应生长至指数生长晚期或稳定期早期(细菌浓度约为 10^9 个/mL),生长已

达稳定期晚期的培养物不能使用。试验中所用的培养物中的活菌滴度应较高。活菌滴度可根据细菌生长曲线的历史性对照数据确定,或在每次试验时通过滴片测定活菌数。

4.1.1.2 推荐的培养温度:37℃。

4.1.1.3 至少应用5种菌株,包括4个鼠伤寒沙门氏菌株(TA1535;TA1537或TA97a或TA97,TA98和TA100),对这些菌株的检测结果可靠且不同实验室之间有较好的重现性。这四种菌株在初始回复突变位点有GC碱基对,已知它们不能检测某些氧化型致突变物、DNA交联剂和胍类物质。检测这些物质应选用在初始回复突变位点有AT碱基对的大肠杆菌WP2菌株或鼠伤寒沙门氏菌TA102菌株。因此,推荐的菌株组合方案如下:

鼠伤寒沙门氏菌 TA1535 和

鼠伤寒沙门氏菌 TA1537 或 TA97 或 TA97a 和

鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和

鼠伤寒沙门氏菌 TA100 和

大肠杆菌 WP2 uvrA 或大肠杆菌 WP2 uvrA(pKM101)或鼠伤寒沙门氏菌 TA102

为检测DNA交联(突变)剂,最好用鼠伤寒沙门氏菌TA102或加一种擅长修复DNA的大肠杆菌WP2 uvrA或大肠杆菌WP2 uvrA(pKM101)作为受试菌株之一。

4.1.1.4 应按已建立的操作规程对菌种的培养制品进行保存和标记鉴别。每次复苏冻存菌种的培养制品时均应进行氨基酸需求试验(鼠伤寒沙门氏菌需要组氨酸,大肠杆菌需要色氨酸)。同样,还应进行其他的表型鉴定,包括有无R因子质粒[即:TA98,TA100和TA97a或TA97,WP2 uvrA,WP2 uvrA(pKM101)菌株对氨基青霉素的抗性,以及TA102对氨基青霉素和四环素的抗性]和特征性突变的存在(例如:鼠伤寒沙门氏菌的rfa突变使其对结晶紫敏感,大肠杆菌的uvrA突变和鼠伤寒沙门氏菌的uvrB突变使其对紫外线敏感)。这些菌株会产生自发回变,通过平板记数获得自发回变数应在历史对照数据范围内,最好在文献报道的范围内。

4.1.2 培养基

应用适宜的最低营养琼脂(含Vogel-Bonner最低培养基E和葡萄糖)和含有组氨酸和生物素或色氨酸的顶层琼脂,以供少数细胞完成数次分裂。

4.1.3 代谢活化

细菌应在有或无适量代谢活化系统的条件下与受试样品接触。最常用的活化系统是经酶诱导剂处理的,从啮齿类动物肝脏制备的加有辅助因子的后线粒体组分(S9)。所用的酶诱导剂包括Aroclor 1254或苯巴比妥和β-萘黄酮联合诱导。常用的后线粒体组分浓度范围是S9混合液5%~30%(体积分数)。应根据受试样品的类别选择代谢活化系统及其应用条件。在某些情况下,可使用一种以上浓度的S9。对于偶氮染料或重氮化合物,应选择还原性代谢活化系统。

4.1.4 受试样品/准备

在对菌株进行处理前,固体受试样品应该溶解或混悬于合适的溶剂或赋形剂中,如需要可进行适度稀释。液体受试样品可直接加入测定体系或在处理前适度稀释。受试样品应新鲜制备,否则需有资料证明其贮存的稳定性。

4.2 试验条件

4.2.1 溶剂/赋形剂

溶剂/赋形剂不应与受试样品发生化学反应,且对细菌的存活和S9的活性无影响。若选用的不是常用的溶剂或赋形剂,应有资料提供适合的理由。能用水作溶剂或赋形剂的,应首先考虑以水作为溶剂或赋形剂。如受试样品对水不稳定,应选用不含水的有机溶剂或赋形剂。

4.2.2 染毒剂量

4.2.2.1 应根据受试样品对细菌的毒性和在配制的最终混合物中的溶解度确定受试样品所用的最高浓度。建议先进行预试验测定受试样品的毒性和溶解度。可将回变菌落数的减少、背景菌苔体积变小、

或处理后细菌存活率降低等作为细胞毒性的指征。代谢活化系统的存在可改变受试样品的毒性。在实际试验条件下,最终混合物出现肉眼可见的沉淀即判断为不溶。对无细胞毒性的可溶受试样品,建议最高试验浓度应为 5 mg/皿或 5 μ L/皿,对无细胞毒性但溶解度达不到 5 mg/皿或 5 μ L/皿的受试样品,在最终处理混合物中应有一个或多个浓度出现沉淀现象。在低于 5 mg/皿或 5 μ L/皿时即出现细胞毒性的受试样品,最高浓度应达到出现细胞毒性的浓度。沉淀不应影响结果计数。

4.2.2.2 至少应选用 5 个可供分析的试验浓度。在开始试验时,剂量间隔一般为半对数(例如 $\sqrt{10}$),在研究剂量-反应关系时也可以采用更小的剂量间隔。

4.2.2.3 如果受试样品含有可能具有致突变作用的杂质,试验浓度可超过 5 mg/皿或 5 μ L/皿。

4.2.3 对照

4.2.3.1 每次试验均应设置同时进行的阳性和阴性(溶剂或赋形剂)对照,且应在有或无代谢活化系统的条件下分别设置。加入代谢活化系统时,每一次试验选用的阳性物浓度应能证明试验的有效性。

4.2.3.2 为检验所用的代谢活化系统,应根据试验菌株类型选择适宜的阳性物,下列化学品是适合进行代谢活化试验的阳性物:

9,10-二甲基蒽 9,10-dimethylanthracene [CASNo. 781-43-1]

7,12-二甲基苯蒽 7,12-dimethylbenzanthracene [CASNo. 57-97-6]

刚果红 Congo Red [CASNo. 573-58-0]

苯并[α]芘 benzo(a)pyrene [CASNo. 50-32-8]

环磷酰胺(单水)cyclophosphamide (monohydrate) [CASNo. 50-18-0(CASNo. 6055-19-2)]

2-氨基蒽醌 2-aminoanthracene [CASNo. 613-13-8]

2-氨基蒽醌不能单独作为评价 S9 混合物活性的指示剂,如果选用它作为阳性物,对每批 S9 还应另选一种需要微粒体酶代谢活化的致突变物证实其活性,如苯并[α]芘或二甲基苯蒽。

4.2.3.3 对不加代谢活化系统的试验,各菌株特异性的阳性对照物见表 1。

表 1 各菌株特异性对照物表

化学品名称及 CAS 编号	菌株
叠氮钠 sodium azide [CASNo. 26628-22-8]	Ta 1535 和 TA100
2-硝基芴 2-nitrofluorene [CASNo. 607-57-8]	TA98
9-氨基丫啉 9-aminoacridine [CASNo. 90-45-9]或 ICR191 [CASNo. 17070-45-0]	TA 1537、TA97 和 TA97a
异丙基苯过氧化氢 cumene hydroperoxide [CASNo. 80-15-9]	TA 102
丝裂霉素 C mitomycin C [CASNo. 50-07-7]	WP2 <u>uvrA</u> 和 TA102
N-乙基 N-硝基 N-亚硝基胍 N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine [CASNo. 70-25-7]或 4-硝基喹啉 1 氧化物 4-nitroquinoline 1-oxide [CASNo. 56-57-5]	WP2、WP2 <u>uvrA</u> 和 WP2 <u>uvrA</u> (PKM101)
呋喃糠酰胺 furylfuramide (AF-2) [CASNo. 3688-53-7]	含质粒的菌株

4.2.3.4 也可以使用其他适合的阳性物。如可能,可考虑使用化学类别相关的阳性对照物。

4.2.3.5 阴性对照在每次试验时除在试验培养基中只加入溶剂或载体外,其余处理应与各处理组相同。另外,如果没有历史数据证明所用溶剂或载体无毒性作用或致突变作用,还应设空白对照组(不进行任何处理)。

4.3 试验步骤

4.3.1 受试样品处理

4.3.1.1 平皿掺入法:不需代谢活化时,通常将 0.05 mL 或 0.1 mL 受试样品溶液、0.1 mL 新鲜的细

菌培养液(约含 10^8 个细菌)和 0.5 mL 灭菌缓冲液与 2.0 mL 顶层琼脂混合。如需代谢活化系统条件下,通常将 0.5 mL 含适量后线粒体组分(体积约占代谢活化混合液总量的 5%~30%)的代谢活化混合物与细菌和受试物/受试溶液一起与顶层琼脂混合。将上述混合液充分混合后倒在最低营养琼脂上,待顶层琼脂凝固后放入培养箱培养。

4.3.1.2 预孵育法,将受试物/受试溶液与受试菌株(约含 10^8 个细菌)和灭菌缓冲液或代谢活化系统(0.5 mL)在 30°C ~ 37°C 预孵育 20 min 或更长时间,再与顶层琼脂混合,然后倒在最低营养琼脂上。通常用 0.05 mL 或 0.1 mL 受试物/受试溶液、0.1 mL 菌液,0.5 mL S9 混合物或灭菌缓冲液,与 2.0 mL 顶层琼脂混合。在预孵育过程中应将试管放入震荡器中震荡充气。

4.3.1.3 为了评价结果的变异度,每个剂量水平应做三个平行平板,如有科学的理由也可做两个平行平板,偶尔丢失一个平皿的数据不影响结果的可靠性。

4.3.1.4 气态或挥发性物质应采用适当方式测试,例如在封闭的培养皿中进行。

4.3.2 培养

将试验中的所有平皿置于 37°C 培养 48 h~72 h。培养结束后计数每个平皿的回复突变菌落数。

5 试验数据和报告

5.1 数据处理

5.1.1 应列出每个平皿的回复突变菌落数。阴性对照(溶剂对照,有时还有空白对照)和阳性对照组各皿的回复突变菌落数也应记录。

5.1.2 应列出受试样品各组、阴性对照和阳性对照的每皿回复突变菌落数、平均回复突变菌落数和标准差。

5.1.3 对明确的阳性结果无需进行验证试验。可疑结果最好通过改进试验条件进一步试验来澄清。阴性结果需视具体情况决定。如认为阴性结果无需进行验证试验,应说明理由。在随后的试验中应改进试验参数以扩大评价条件范围,改进的参数包括浓度间距、处理方法(平皿掺入或溶液预孵育等)和代谢活化条件。

5.2 结果评价和解释

5.2.1 阳性结果判定有几个标准。如受试样品各组回复突变菌落数的增加呈剂量-反应关系,或至少有一个菌株在有或无代谢活化系统条件下,在一个或几个剂量水平每皿回复突变菌落数出现可重复的增加。应首先考虑结果的生物学意义。统计学方法可用于帮助评价试验结果,但不能作为阳性反应判定的唯一因素。

5.2.2 不符合以上标准的受试样品则被认为在本试验中无致突变性。

5.2.3 尽管多数试验都能给出明确的阳性或阴性的结果,但也不排外极少数试验不能对受试样品活性做出明确判断,例如,无论重复试验多少次,结果仍模棱两可或可疑。

5.2.4 细菌回复突变试验的阳性结果表明受试样品可引起所用鼠伤寒沙门氏菌或大肠杆菌的基因组发生碱基置换或移码突变诱发的点突变。可重复的浓度-反应关系意义较大。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起试验菌株的突变。

5.3 试验报告

试验报告应包括以下信息:

5.3.1 受试样品

- a) 名称和识别码如 CAS 编号(如已知);
- b) 物理性质和纯度;
- c) 与试验实施相关的物理化学特性;
- d) 受试样品稳定性(如了解)。

5.3.2 溶剂/赋形剂

- a) 选择溶剂/赋形剂的理由；
- b) 受试样品在溶剂/赋形剂中的溶解性和稳定性(如了解)。

5.3.3 细菌

- a) 所用菌株；
- b) 每皿加入的细菌数；
- c) 菌株特征。

5.3.4 试验条件

- a) 每皿加入受试样品的量(mg/皿或 μg /皿),剂量选择的依据,每个浓度的平皿数；
- b) 选用的培养基；
- c) 代谢活化系统的类型和成分,包括判断可接受的标准；
- d) 处理过程。

5.3.5 结果

- a) 毒性表现；
- b) 沉淀现象；
- c) 每个平皿的菌落计数；
- d) 每皿平均回变菌落数和标准差；
- e) 剂量-反应关系(如可能)；
- f) 统计学分析(如有)；
- g) 同期阴性(溶剂/赋形剂)和阳性对照数据(包括数据范围、均数和标准差)；
- h) 历史性的阴性(溶剂//赋形剂)和阳性对照资料(包括范围,均数,标准差)。

5.3.6 结果讨论。

5.3.7 结论。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 细 菌 回 复 突 变 试 验 方 法
GB/T 21786—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

*

书号: 155066·1-32187 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21786-2008