



中华人民共和国国家标准

GB XXXX-XXXX

食品安全国家标准 哺乳动物体内碱性彗星试验 (征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

哺乳动物体内碱性彗星试验

1 范围

本标准规定了哺乳动物体内碱性彗星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哺乳动物组织细胞的DNA损伤作用。

2 术语和定义

2.1 彗星

受损DNA片段受到电场作用后产生的拖尾现象，在显微图像下形似“彗星”：彗星头是核DNA，彗星尾由在电场中迁移出核的受损DNA片段组成。

2.2 可评分细胞

有清晰轮廓的彗星头、尾，且未受邻近细胞干扰的细胞。

2.3 “刺猬”状细胞

显微图像下由小或模糊不清的头以及大的弥漫性尾组成的细胞。

2.4 尾部DNA百分比

彗星尾部DNA含量相对于总DNA含量（头、尾之和）的比值。它反映了DNA损伤的相对程度，以百分比表示。

2.5 关键变量

小的改变会对试验结果产生较大影响的试验参数，包括取材时间、裂解条件、电泳时间等。关键变量可以是组织特异性的。

3 试验目的和原理

哺乳动物体内碱性彗星试验可用于检测强碱性条件下（ $\text{pH} \geq 13$ ）DNA单链和双链的断裂，包括受试物直接作用引起的DNA链断裂、碱性不稳定性位点引起的DNA链断裂和DNA切割修复所引起的瞬时DNA链断裂。动物通过适当的途径给予受试物。在实验终点，解剖分离靶组织，制备单细胞/细胞核悬浮液嵌入软琼脂并固定在载玻片上，除去细胞膜和/或核膜后暴露在强碱性条件下（ $\text{pH} \geq 13$ ），使DNA解旋并释放游离的DNA环和片段。核DNA进行琼脂糖凝胶电泳。未损伤的DNA保留在琼脂糖凝胶的原位置形成彗星头部（彗头），由DNA链断裂造成的损伤DNA片段和游离的DNA环向阳极迁移形成彗星尾部（彗尾）。

4 仪器和试剂

4.1 仪器/器械

电子天平、制冰机、离心机、微波炉、水浴锅、磨砂玻片、电泳仪、水平电泳槽、荧光显微镜、彗星成像和图像分析系统等。

4.2 试剂/溶液

4.2.1 1.0%~1.5% (w/v) 基底层标准琼脂糖凝胶：常规熔点琼脂糖经微波炉加热溶于磷酸盐缓冲液 (pH 2~4, 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 和酚红), 制成1.0%~1.5% (w/v) 标准琼脂糖凝胶。

4.2.2 0.5% (w/v) 细胞层和顶层低熔点琼脂糖凝胶：低熔点琼脂糖经微波炉加热溶于磷酸盐缓冲液 (不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 和酚红), 制成 0.5% (w/v) 低熔点琼脂糖凝胶。试验期间置于 37°C~45°C 水浴锅中保温。

4.2.3 裂解液：称取乙二醇四乙酸二钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)和三羟甲基氨基甲烷(分析纯), 用纯水配制成溶液(终浓度为乙二醇四乙酸二钠0.1 mol/L、氯化钠2.5 mol/L、三羟甲基氨基甲烷0.01 mol/L)。调节pH值为10.0, 10°C以下冷藏保存。使用当天加入triton-X 100和二甲基亚砷, 终浓度分别为1% (v/v) 和10% (v/v), 使用前10°C以下冷藏至少30min。

4.2.4 电泳缓冲液：称取乙二醇四乙酸二钠和氢氧化钠(分析纯), 用纯水配制成溶液(终浓度为乙二醇四乙酸二钠 0.001 mol/L、氢氧化钠 0.3 mol/L), 现用现配, 调节 pH 值, 使 $\text{pH} \geq 13$, 使用前 10°C 以下冷藏保存。

4.2.5 中和缓冲液：称取三羟甲基氨基甲烷(分析纯), 用纯水配制成溶液, 终浓度为 0.4 mol/L, 调节 pH 值为 7.5, 使用前 10°C 以下冷藏保存。

4.2.6 剪碎缓冲液：称取乙二醇四乙酸二钠(分析纯), 用 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) (pH 2~4, 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 和酚红) 溶解配制成溶液, 终浓度为 0.02 mol/L, 调节 pH 值为 7.5。临用前加入二甲基亚砷, 终浓度为 10% (v/v), 使用前 10°C 以下冷藏保存。

4.2.7 染色液：DNA链荧光染料 (如SYBR Gold, SYBR Green I、Gelred、碘化丙啶或溴化乙锭等), 制备和使用按照产品要求。

5 试验方法

5.1 受试物

5.1.1 配制方法：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 (如橄榄油、玉米油等), 不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。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。

5.1.2 给予途径：受试物应灌胃给予, 灌胃体积一般不超过10 mL/kg 体重, 如为水溶液时, 最大灌胃体积可达20 mL/kg 体重; 如为油性液体, 灌胃体积应不超过4 mL/kg 体重; 各组灌胃体积一致。

5.2 阳性对照

阳性对照物应能诱导受试物的靶组织 DNA 链断裂, 可选甲基磺酸乙酯 (EMS) 为阳性对照物。阳性对照物的处理方式不一定与受试物相同。阳性对照物及其相应靶组织 (啮齿类动物) 可参考表 1。

表 1 推荐的阳性对照物及其相应靶组织（啮齿类动物）

阳性对照物质	靶组织
甲基磺酸乙酯（EMS, CAS RN 62-50-0）	任一组织
乙基亚硝基脲（ENU, CAS RN759-73-9）	肝脏、胃、十二指肠、空肠
甲基磺酸甲酯（MMS, CAS RN 66-27-3）	肝脏、胃、十二指肠、空肠、肾脏、膀胱、肺脏、睾丸、骨髓、血液
N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍（MNNG, CAS RN:70-25-7）	胃、十二指肠、空肠
1,2-二甲基胍二盐酸盐（DED, CAS RN 306-37-6）	肝脏、肠
N-甲基-N-亚硝基脲（MNU, CAS RN 684-93-5）	肝脏、骨髓、肾脏、胃、十二指肠、脑
注：如果科学合理，可以选择除表 1 之外的其他物质作为阳性对照物。	

5.3 阴性对照

每个采样时间点和采样组织都应有阴性对照，阴性对照组动物与受试物组动物的处理方式相同，且仅用溶媒处理，必要时增加空白对照。

5.4 实验动物

5.4.1 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。选用 SPF 级健康成年啮齿类动物（6~12 周龄），试验开始时，动物体重差异应不超过同种性别平均体重的 $\pm 20\%$ 。

5.4.2 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。

5.4.3 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。自由饮水和摄食。啮齿类动物可按性别分笼群饲（每笼通常不超过 5 只），也可单笼饲养。

5.4.4 动物分组

如果受试物对所用动物种属的毒性和在代谢方面没有明显性别差异，单独彗星试验或整合试验可仅选择单一性别（多用雄性）进行评价，可用于分析的动物数每组至少 5 只。若性别间存在明显的毒性或代谢方面的差异，则应采用两种性别的动物，可用于分析的动物数每组雌雄至少各 5 只。若试验设有几个采样时间点，则要求每组每个采样时间点至少有 5 只实验动物用于分析。

5.5 剂量

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 $1/2 LD_{50}$ ，低剂量组不应表现出毒性，可分别取 $1/4 LD_{50}$ 和 $1/8 LD_{50}$ 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：

- 10 g/kg 体重；
- 人的可能摄入量的 100 倍；
- 一次最大灌胃剂量。

另设溶媒对照组。阳性对照物可用甲基磺酸乙酯 200 mg/kg 体重经口给予。

6 试验步骤

6.1 动物观察

试验期间至少每天（最好同一时间）进行一次与动物健康相关的观察并记录，同时要考虑到给受试物后出现预期效应的高峰时段。动物出现毒性过大的症状或体征，应在试验完成前实施安乐死，一

般不用于彗星分析。

6.2 取材时间

6.2.1 取材时间是一个关键变量，要在DNA链被诱导断裂之后且断裂被去除、修复或细胞死亡之前。通过碱性彗星试验检测到的一些导致DNA链断裂的损伤持续时间可能非常短。如果怀疑存在这种瞬时DNA损伤，应采取措施以减轻DNA损伤的漏检，确保尽早进行组织采样，可能比下面给出的取材时间还要早。

6.2.2 最佳取材时间取决于受试物本身或受试物给予方式。在条件允许的情况下，取材时间应由毒代动力学数据确定[例如达到血浆或组织的峰值浓度(C_{max})、时间(T_{max})或多次给受试物的稳定状态]。在没有毒代动力学数据的情况下，常用受试物(包括阳性对照物)两次(间隔21 h)给予动物法，在末次给予受试物3 h后一次性取材。将碱性彗星试验与重复喂养试验(如28天经口毒性试验)整合时，也同样适用末次给予受试物后3 h一次性取材。

试验还可以有以下两种取材方式：

a) 受试物1次给予动物，在给予受试物后2 h~6 h和16 h~26 h进行两次取材。

b) 受试物在同一天内2次(间隔不超过2 h~3 h)给予动物，用于给予剂量很大的情况。在末次给予受试物后2 h~6 h之间一次性取材。

6.3 靶组织的确定

基于现有受试物的ADME(吸收、分布、代谢、排泄)、遗传毒性、致癌性或其他毒性数据，明确靶组织。肝脏是物质代谢中最活跃的组织，同时也是高频致癌靶组织，因此在没有明确靶组织的情况下，首选肝脏。此外，胃是食物经口暴露的第一个接触位点，也可选为靶组织。碱性彗星试验在技术原理上适用于所有可进行单细胞/核悬浮液分析的组织，还可用于其它组织，如空肠、肾脏、血液、皮肤、膀胱、肺脏等。

6.4 标本的制备

6.4.1 在适当的取材时间点，将动物进行安乐死。迅速摘取、分离靶组织，取一部分用于碱性彗星试验，取样大小应尽量一致。另取一部分置于甲醛溶液或适当的固定剂中用于可能的组织病理学分析(见7.2.1)。将用于碱性彗星试验的组织放入提前预冷的剪碎缓冲液中，充分漂洗以除去残留的血液。肝、肾等也可采用原位灌注的方法去除血液。

6.4.2 用于细胞/细胞核分离的方法包括：肝和肾的组织切碎，胃肠道粘膜刮擦，以及均质化和酶消化等。如6.3.1所述，通过碱性彗星试验检测到的一些导致DNA链断裂的损伤持续时间可能非常短，应在动物安乐死后尽快处理组织，并在低温条件下(如置于冰上)制备单细胞/核悬浮液。单细胞/核悬浮液备用时应保持冰冷，以确保样品间变异最小化以及良好的阳性、阴性对照反应。

6.5 制片

在玻片磨砂面一侧滴加标准琼脂糖凝胶，常规涂片，烤干后备用。取单细胞/核悬浮液加入低熔点琼脂糖凝胶，轻轻吹打混匀，吸取单细胞/核凝胶液，滴加在制备好的标准琼脂糖凝胶层上，室温凝固后滴加低熔点琼脂糖凝胶作为第三层胶。每个标本制备2~3张玻片，放置备用。应在单细胞/核悬浮液制备后1小时内完成制片。

制备玻片时，添加到低熔点琼脂糖(通常为0.5%~1.0% w/v)内的单细胞/核悬浮液的量，不应使低熔点琼脂糖的浓度下降到0.45%以下。最佳细胞密度(细胞没有重叠，便于进行图像分析的浓度)将由彗星评分的图像分析系统确定。

6.6 裂解

裂解条件是一个关键变量，同一次试验中所有玻片的裂解条件应尽可能保持一致。

玻片浸入预冷的细胞裂解液中(裂解液应没过玻片)，2℃~10℃避光裂解至少1 h(或过夜)。裂

解后漂洗玻片以除去残留的洗涤剂 and 盐。漂洗可以使用纯水、中和缓冲液或磷酸盐缓冲液，也可以使用电泳缓冲液。

6.7 解旋与电泳

将玻片随机放置在含有足够电泳缓冲液的水平电泳槽上，电泳缓冲液应没过玻片（每次电泳缓冲液的覆盖深度也应该保持一致）。玻片放置至少 20 min 以使 DNA 解旋，然后设置电泳条件。电势通常为 0.7 V/cm，电泳时间不少于 20 min。电泳时间是一个关键变量，需要优化动态范围。在每个试验中，电压应保持恒定，其他参数应在特定的狭小范围内变化。在整个电泳过程中应保证电泳缓冲液的深度，并记录电泳开始和结束时的电流。解旋和电泳在 2°C~10°C 避光进行。

应平衡设计玻片在电泳槽中的摆放位置，以减轻边缘效应的影响，并最大限度地减少批次间的差异，即在进行每次电泳时，不同剂量组、阴性对照和阳性对照的样本应有相同数量的玻片。

6.8 中和与脱水

电泳结束后，将玻片取出，用预冷的中和缓冲液漂洗至少 5 min，空气中自然干燥或 37 °C 完全干燥。在需要延期阅片的情况下，可将玻片浸入预冻至 -20°C 的无水乙醇中固定 5 min，晾干后室温或冷藏保存。

6.9 DNA染色与阅片

6.9.1 使用适当的 DNA 链荧光染料（如 SYBR Gold、SYBR Green I、Gelred、碘化丙啶或溴化乙锭等）染色。在配有合适的检测器或数字相机（如 CCD）的荧光显微镜下，用适当放大倍数（如 200 倍）阅片。

6.9.2 对所有玻片进行独立编号和盲号阅片。可以观察到由 DNA 链断裂引起的 DNA 片段从细胞的“彗头”移到“彗尾”，彗头为圆形，边缘光滑整齐，彗尾紧随彗头之后，呈散点状拖尾。

6.9.3 彗星显微图像中的细胞可分为三个类别，即可评分细胞、“刺猬”状细胞和其他不可评分细胞（如彗头、彗尾不清晰的或重叠的细胞等），其中只有可评分细胞能够进行尾部 DNA 百分比的分析，避免伪影。每个样本至少对 150 个可评分细胞进行尾部 DNA 百分比分析，并单独记录“刺猬”状细胞的发生频率（见 7.2.2）。应该观察玻片同一密度的几个区域，以确保没有重叠的尾，避免在玻片的边缘进行评分。

6.9.4 碱性彗星试验中的 DNA 链断裂可使用适当的彗星成像和图像分析系统测量，分析指标包括尾部 DNA 百分比，尾长和尾矩等。推荐采用尾部 DNA 百分比用于结果的评估和解释。

7 数据处理和结果评价

7.1 数据处理

计算各组样本尾部 DNA 百分比和“刺猬”状细胞发生频率的均数和标准差，利用适当的统计学方法（如方差分析、卡方检验等）进行分析。

7.2 组织损伤和细胞毒性

7.2.1 碱性彗星试验出现阳性结果可能不仅仅是由于受试物的遗传毒性，对靶组织的毒性也可能导致 DNA 迁移程度增加。已知的遗传毒物也会存在低等或中等的细胞毒性。在单独碱性彗星试验中，不能区分遗传毒性导致的 DNA 迁移与细胞毒性导致的 DNA 迁移（DNA 迁移，是毒性的结果）。因此，当观察到 DNA 迁移程度增加时，应对组织病理学进行检查，诸如观察到炎症、细胞浸润、凋亡或坏死变化都与 DNA 迁移程度增加有关。存在明显细胞毒性证据的情况下，DNA 迁移程度的增加应谨慎解释。

7.2.2 “刺猬”状细胞是严重损伤的细胞，应报告发生频率，并考虑是否是由受试物引起的。

7.3 结果评价与解释

7.3.1 满足以下标准，则可认为试验成立：

a) 阴性对照组数值在实验室预先建立的历史阴性对照数据范围内，且阴性对照组尾部DNA含量百分比值应 $< 8\%$ 。

b) 阳性对照组数值落在实验室预先建立的历史阳性对照数据范围内，且与阴性对照组数值有统计学差异；

c) 有足够数量的细胞和剂量组进行分析。

7.3.2 试验组与平行阴性对照组相比，若尾部DNA含量百分比值增加，有明显的剂量-反应关系并有统计学意义，则认为受试物哺乳动物体内碱性彗星实验结果阳性，认为在本试验体系中，受试物能够诱导靶组织细胞的DNA链断裂；若尾部DNA含量百分比增加，差异有统计学意义，但无剂量-反应关系时，则应进行重复试验。结果能重复可确定为阳性结果；若所有剂量组尾部DNA含量百分比值与阴性对照组差异无统计学意义，则认为受试物呈阴性结果。在本试验体系中，受试物不能诱导靶组织细胞的DNA链断裂。

8 试验报告

8.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。

8.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

8.3 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或授权签字人、签发日期。

8.4 试验摘要。

8.5 受试物：名称、批号、剂型、性状（包括感官、性状、包装完整性、标识）、数量、前处理方法、溶媒、阳性对照物的相关信息。

8.6 实验动物：物种、品系、级别、数量、体重、性别、来源（供应商名称、实验动物生产许可证号），动物检疫、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）。

8.7 试验方法：试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、取材时间点、标本制备方法、观察指标、每只动物观察和分析的细胞数、彗星评分和测量方法、统计学方法和判定标准。

8.8 试验结果：记录每只动物观察和分析的细胞数，以列表方式报告每组动物的尾部DNA百分比和“刺猬”状细胞发生频率，剂量-反应关系以及组织病理检查结果及是否有病理性损伤，给出数据的统计结果。

8.9 试验结论：阳性结果表明，在本试验条件下受试物具有引起哺乳动物靶组织细胞DNA损伤的作用；阴性结果表明，在本试验条件下受试物不引起哺乳动物靶组织细胞DNA损伤。

9 试验的解释

本试验不适用于成熟生殖细胞中DNA链断裂的检测。

本试验不适用于检测DNA-DNA和DNA-蛋白质的交联反应，以及其他碱基修饰如碱基的氧化。

本试验不适用于检测非整倍体诱变剂。

本试验可与其他毒理学研究相结合，如重复剂量毒性研究，也可联合其他遗传毒性试验终点，如哺乳动物体内红细胞微核试验。

本试验要考虑好关键变量改变后对试验结果产生的影响，才能更改关键变量，且要有阳性、阴性对照的支持。关键变量不应随意变更，如发生变更，应在试验报告中列出并提供变更理由。
