

## 1 附 14

## 2 药包材体外哺乳动物细胞 TK 基因突变试验方法

3 本法系在有和无外源代谢活化系统存在的情况下，将一定量的供试品溶液与小鼠淋巴  
4 瘤细胞 L5178Y TK<sup>+</sup>-3.7.2C 共培养，在规定的时间内，观察细胞克隆形成集落的情况，以  
5 判定供试品在试验条件下是否诱导体外小鼠淋巴瘤细胞的 TK 基因突变。

6 **试验用细胞** 应选择使用小鼠淋巴瘤细胞系 (L5178Y TK<sup>+</sup>-3.7.2C)。鉴于细胞性状稳定  
7 性要求，试验细胞系最好新取自冻存细胞。细胞在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下培养，细胞的增殖  
8 周期为 10 小时左右。经过传代培养后，保证细胞呈对数生长状态，细胞持续培养最多不  
9 超过 3 个月。需定期检查细胞系核型和染色体数目的稳定性以及支原体污染情况，否则不  
10 宜使用。

11 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照“药包材生物学评价与试验选择指导原则 (9651)”  
12 中生物学试验的要求制备供试品溶液。除 9651 中提到的提取溶剂，还可选择与试验体系  
13 相容的其他提取溶剂，如二甲基亚砜 (DMSO) 等。

14 **阴性对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂 (不含供试品)，以相同的  
15 方式制备作为阴性对照液。常用的阴性对照物包括水 (或 0.9%氯化钠注射液)、含血清培  
16 养基、二甲基亚砜 (DMSO) 等。通常二甲基亚砜 (DMSO) 在培养液中的终浓度不应超  
17 过 1.0%，水 (或 0.9%氯化钠注射液) 不应超过 10%。供试品溶液和阴性对照液应在制备后  
18 24 小时内使用，在试验前应平衡至室温，确保充分混匀。

19 **阳性对照液** 阳性对照物举例见表 1，如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。  
20 阳性对照应现用现配。

21 表 1 体外小鼠淋巴瘤试验阳性对照物质举例

代谢活化条件	阳性对照物	CAS No.
无外源性代谢 活化系统	甲磺酸甲酯	66-27-3
	丝裂霉素 C	50-07-7
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5

	苯并(a)芘	50-32-8
有外源性代谢 活化系统	环磷酰胺	50-18-0
	环磷酰胺一水化合物	6055-19-2
	7,12-二甲基苯蒽	57-97-6
	3-甲基胆蒽	56-49-5

## 22 试验方法

23 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测试过程应  
24 同时进行。其中，代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子和微粒  
25 体部分的测试系统。

26 对于无细胞毒性的供试品溶液，可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯  
27 度稀释。如果 100%浓度的供试品溶液出现细胞毒性，则应以供试品溶液原液作为最高浓度  
28 组进行梯度稀释，最高的试验浓度为细胞相对总生长 (RTG) 在 10%~20%的浓度，梯度稀  
29 释宜包括从中到小或无细胞毒性的浓度范围。

30 在总体积为 10mL 的试验体系中，有外源活化系统组分别加入 1mL 代谢活化系统、供  
31 试品溶液以及细胞悬液（细胞总数为  $6 \times 10^6$  个），置于培养箱（ $37^\circ\text{C}$ ， $5\%\text{CO}_2$ ）中振荡培养  
32 （3~4）小时；无活化系统组分别加入 1mL PBS、供试品溶液以及细胞悬液（细胞总数为  
33  $6 \times 10^6$  个），置于培养箱（ $37^\circ\text{C}$ ， $5\%\text{CO}_2$ ）中分别振荡培养（3~4）小时和 24 小时（24 小时  
34 组额外添加生长培养基/供试液至 20mL）。培养结束后用培养基洗涤细胞两次，调整细胞浓  
35 度为  $3 \times 10^5$  个/mL，在 20mL 生长培养基中继续培养 2 天，每天对细胞浓度计数并按公式 1  
36 计算悬浮生长数 (SG)。

$$37 \quad \text{SG} = \frac{\text{day}2_a}{\text{day}1_b} \times \frac{\text{day}3_a}{\text{day}2_b} \dots \dots \dots (1)$$

38 式中：

39 SG——悬浮生长数

40 a——表达期计数细胞浓度

41 b——细胞初始/调整细胞浓度，若不存在细胞毒性干扰的情况下，应为  $3 \times 10^5$  个/mL。

42 注：当计算 24h 组悬浮生长数时，需延长 1d 计算 SG。

43 表达培养 2d 结束后，取适量细胞悬液，用含 20%血清的培养基梯度稀释至细胞浓度为  
44 8 个/mL，取 200 $\mu$ L 细胞悬液接种至 96 孔板；同时取适量细胞悬液，调整细胞浓度至  $1 \times 10^4$   
45 个/mL，加入三氟胸苷 (TFT，终浓度为 3 $\mu$ g/mL) 混匀，取 200 $\mu$ L 细胞悬液接种至 96 孔板。  
46 将全部平板置于培养箱 (37C $^\circ$ ，5%CO $_2$ ) 中，培养 10 天 ~ 12 天。平板内细胞培养结束后，  
47 通过目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数平板中集落生长的孔数。分别根据公式 2  
48 与公式 3，计算出细胞的克隆效率 (CE) 与突变频率 (MF)。注：突变集落按大集落 (LC：  
49 直径 $\geq 1/4$  孔径，呈薄层分布，密度低) 和小集落 (SC：直径 $< 1/4$  孔径，呈块状，密度高)  
50 分别计数，极小集落可再继续培养 3 天后计数。

51

$$52 \quad CE = \frac{-\ln(EW/TW)}{N} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

53 式中：

54  $CE$  —— 克隆效率；

55  $EW$  —— 无细胞集落孔数；

56  $TW$  —— 平板总孔数；

57  $N$  —— 每孔平均细胞数

$$58 \quad MF = \frac{CE_M}{CE_V} \dots\dots\dots (3)$$

59 式中：

60  $MF$  —— 总突变频率；

61  $CE_m$  —— TFT 选择培养基细胞克隆效率；

62  $CE_v$  —— 生长培养基细胞克隆效率；

63 注：当计算大集落突变频率 (L-MF) 和小集落突变频率 (S-MF) 时， $EW$  分别指无大  
64 集落生长和无小集落生长的孔数。

65 细胞相对总生长 (RTG) 由公式 4 和公式 5 计算得出。

$$66 \quad RSG = SG_S / SG_C \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

67

68 式中：

69 RSG——相对悬浮增长率

70  $SG_S$ ——供试品组悬浮生长数；

71  $SG_C$ ——对照组悬浮生长数。

72

$$73 \quad RTG = RSG \times RCE \dots\dots\dots (5)$$

74 式中：

75 RTG——相对总生长

76 RSG——相对悬浮增长率；

77 RCE——相对克隆效率。

## 78 结果判断

79 阴性对照满足克隆效率 (CE) 在 65%~120%，突变频率 (MF) 在  $50 \times 10^{-6}$ ~ $170 \times 10^{-6}$ ，  
80 或在实验室历史数据范围内，同时短期处理组 (3 小时~4 小时) 的悬浮生长数应在 8~32  
81 倍，长期处理组 (24 小时) 的悬浮生长数应在 32~180 倍；阳性对照总突变频率绝对增加，  
82 比阴性对照突变频率增加  $300 \times 10^{-6}$  以上，其中小集落突变频率应占 40% 以上，或阳性对照  
83 的小集落突变频率比阴性对照高  $150 \times 10^{-6}$  以上，则试验系统成立。

84 在试验成立的前提下，当供试品溶液的 MF 值高于阴性对照且超过总评价因子 (GEF，  
85  $126 \times 10^{-6}$ )，则判定试验结果呈阳性，该供试品具有诱导体外哺乳动物细胞 TK 基因突变的  
86 潜能；否则试验结果为阴性。