



中华人民共和国国家标准

GB 15193.11—2015

食品安全国家标准 果蝇伴性隐性致死试验

2015-08-07 发布

2015-10-07 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 15193.11—2003《果蝇伴性隐性致死试验》。

本标准与 GB 15193.11—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 果蝇伴性隐性致死试验”;
- 修订了“范围”中受试物的具体内容:本标准适用于评价受试物的遗传毒性作用;
- 增加了“术语和定义”、“试验报告”和“结果解释”;
- 修订了“原理”中的部分内容。

食品安全国家标准

果蝇伴性隐性致死试验

1 范围

本标准规定了果蝇伴性隐性致死试验的基本技术要求。
本标准适用于评价受试物的遗传毒性作用。

2 术语和定义

2.1 致死突变

基因组中发生的一种改变,当它表达时,引起携带者死亡。

2.2 隐性突变

只在纯合子或半合子条件下被表达的基因组中的一种改变。

2.3 伴性基因

存在于性染色体(X或Y)上的基因。在此仅指位于X染色体上的基因。

3 试验目的和原理

隐性基因在伴性遗传中具有交叉遗传特征,即雄蝇的X染色体传给 F_1 代雌蝇,又通过 F_1 代雌蝇传给 F_2 代雄蝇。位于X染色体上的隐性基因在 F_1 代雌蝇为杂合性,不能表达,而能在半合型 F_2 代雄蝇表现出来。据此,利用眼色性状由X染色体上的基因决定,并与X染色体的遗传相关联的特征来作为观察在X染色体上基因突变的标记,故以野生型雄蝇(红色圆眼,正常蝇)染毒,与Basc(Muller-5)雌蝇(淡杏色棒眼,在两个X染色体上各带一个倒位以防止 F_1 代把处理过的父系X染色体和母系X染色体互换)交配,如雄蝇经受试物处理后,在X染色体上的基因发生隐性致死,则可通过上述两点遗传规则于 F_2 代的雄蝇中表现出来,并籍眼色性状为标记来判断试验的结果。即根据孟德尔分类反应产生四种不同表型的 F_2 代,有隐性致死时在 F_2 代中没有红色圆眼的雄蝇。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

电热恒温干燥箱、生化培养箱、立体解剖显微镜、放大镜、空调机、麻醉瓶、果蝇培养管、试管盘及架、白瓷板、海绵垫、毛笔、海绵塞。

果蝇饲养用具洗净后于120℃干燥消毒2h后备用。

4.2 试剂

乙醚、75%乙醇、丙酮、吐温。

4.3 培养基的制备

4.3.1 蔗糖 26 g、酵母粉 4 g,加水 150 mL。

4.3.2 玉米粉 34 g、酵母粉 4 g,加水 150 mL。

4.3.3 步骤:先将 4.3.1 所述的培养基成分混合煮沸溶解后,再将 4.3.2 的成分依次倒入混匀、煮沸,最后加丙酸 2 mL,搅匀,分装于果蝇培养管内,备用。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应溶解或悬浮于合适的溶媒中,溶媒应为无毒物,不与受试物发生化学反应。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可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等,然后在给样前用蔗糖水稀释。受试物应新鲜配制,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

5.2 实验动物

黑腹果蝇。雄蝇用 3 日龄~4 日龄的野生型黑腹果蝇(*Drosophila Melanogaster*),雌蝇用 Basc (Muller-5)品系 3 日龄~5 日龄的处女蝇。观察 2 d~3 d 有无卵或早龄幼虫孵出,以检查是否有非处女蝇混入。

5.3 剂量

按常规方法求出果蝇 LC_{50} 或 LD_{50} 值。然后按 $1/2 LC_{50}$ 或 LD_{50} 为高剂量, $1/4 LD_{50}$ 为中剂量, $1/8 LD_{50}$ 为低剂量,另设阴性(或溶媒)及阳性[2 mmol/L 甲基甲烷磺酸酯(MMS)]对照组。如果受试物毒性较小,受试物加入培养基的最大剂量可占培养基的 5%。阳性对照物可用甲基磺酸乙酯、甲基磺酸甲酯、N-亚硝基二甲胺。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 接触受试物

受试物接触方法为经口给予。新配制的培养基冷却到 55 °C 时,倒入受试物,快速磁搅拌 2 min,放入经饥饿 4 h 的雄蝇进行喂饲,接触受试物时间 3 d。

5.4.2 交配程序及方法

为检测受试物对哪一期生殖细胞最敏感,将雄蝇在接触受试物后按 2—3—3 d 间隔(分别表示对精子、精细胞和精母细胞的效应)与处女蝇交配。即每一试管以 1 只经处理过的雄蝇按上述程序顺次与 2 只处女蝇交配,再以所产 F_1 代按雌与雄(1:1 或 1:2)进行 F_1 — F_2 交配。12 d~14 d 后观察 F_2 代,孵育温度为 25 °C。用乙醚对果蝇施行麻醉后可进行分组及 F_1 代的性别分离。

每一个试验组至少应有 3 000 个样本数。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

根据受试染色体数(即 F_1 代交配的雌蝇数减去不育数和废管数)与致死阳性管数求出致死率,按

式(1)计算。

$$\text{致死率} = \text{致死管数} / \text{受试染色体数} \times 1000\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

运用适合于试验设计的统计学检验方法对对照组和试验组的致死率进行统计分析。结果评价时应
对试验结果的生物学意义和统计学意义同时予以考虑。

6.2 结果评价

受试物诱发的致死率明显增加,与阴性对照组相比有统计学差异,并且有剂量—反应关系时判为阳性;如无剂量—反应关系时,应至少有一时间点的阳性致死可重复并有统计学意义上的增加,也可判为阳性。

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 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、有效期、保存条件、配制所用溶媒和方法以及阴性、阳性对照物的相关信息。
- 7.6 果蝇品系、昆虫日龄、性别、来源、检疫、孵育温度。
- 7.7 试验条件和方法、剂量分组、剂量选择依据、染毒途径和方式、受试物配制过程、交配程序和比例、处理的雄性数、不育的雄性数、已建立的 F₂ 培养群的数目、没有后代的 F₂ 培养群的数目、所测试的染色体数、在每一生殖细胞期检测的带有致死基因的染色体数、统计方法和判定标准。
- 7.8 试验结果:以列表方式报告受试物组、阴性对照组和阳性对照组的被试验的染色体数、无生育力的雄性果蝇数、致死染色体数、致死率,并写明结果的统计方法。
- 7.9 试验结论:根据试验结果,对受试物是否能引起果蝇生殖细胞突变做出结论。

8 试验的解释

果蝇伴性隐性致死试验阳性结果表明在该试验条件下受试样品引起果蝇生殖细胞突变;阴性结果表明在该试验条件下受试样品对果蝇生殖细胞属非致突变物。

对 F₂ 代结果的判断标准如下:

- a) 每一试管在多于 20 个子代中没有红色圆眼的野生型雄蝇为阳性,属致死突变。如有 2 只以上的红色圆眼的野生型雄蝇者为阴性。
- b) 每一试管如确少于 20 个子代或只有一只野生型雄蝇的可疑管,需进行 F₃ 代的观察。
- c) 不育:仅存雄、雌亲本而无仔蝇者。

