

13 睾丸生殖细胞染色体畸变试验

Testicle Cells Chromosome Aberration Test

1 范围

本规范规定了哺乳动物睾丸生殖细胞染色体畸变试验的基本原则、要求和方法。
本规范适用于化妆品原料的遗传毒性检测。

2 试验目的

检测雄性动物生殖细胞染色体损伤,以评价受试物在生殖细胞诱导可遗传的致突变的可能性。

3 定义

3.1 染色体型畸变 chromosome-type aberration

染色体结构损伤,表现为两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重接。

3.2 染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色体结构损伤,表现为染色单体断裂或染色单体断裂重接。

3.3 染色体数目畸变 numerical-type aberration

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。

4 试验的基本原则

通过适当的途径使动物接触受试物,一定时间后处死动物,动物处死前用细胞分裂中期阻断剂处理,处死后制备睾丸初级精母细胞染色体标本,在显微镜下观察染色体畸变。
本方法特别适用于需考虑体内代谢活化后的染色体畸变分析。
若有证据表明待测物或其代谢产物不能到达睾丸,则不适用于本方法。

5 仪器和器械

生物显微镜、离心机、解剖剪、镊子、离心管、平皿、注射器、灌胃针头、载玻片、盖玻片(24mm×50mm)等。

6 试剂

6.1 0.04%秋水仙素:取 40mg 秋水仙素,加生理盐水至 100mL。

6.2 1%柠檬酸三钠:取 1g 柠檬酸三钠,加蒸馏水至 100mL。

6.3 0.075mol/L 氯化钾溶液:取氯化钾 5.59g,加蒸馏水至 1000mL。

6.4 甲醇/冰醋酸(3:1, v/v)固定液:临用现配。

6.5 60%冰乙酸:取 60mL 冰乙酸,加蒸馏水至 100mL,均宜新鲜配制。

6.6 pH6.8 磷酸盐缓冲液

1/15mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)

4.50 g

- | | |
|--|---------|
| 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 11.81 g |
| 加蒸馏水至 | 1000mL |
- 6.7 姬姆萨染液
- 姬姆萨 (Giemsa) 染液
- 成分: Giemsa 染料 3.8g
- | | |
|----|-------|
| 甲醇 | 375mL |
| 甘油 | 125mL |
- 配制: 将染料和少量甲醇于乳钵里仔细研磨, 再加入甲醇至 375mL 和甘油, 混合均匀, 放置 37℃ 恒温箱中保温 48h。保温期间, 振摇数次, 促使染料的充分溶解, 取出过滤, 两周后用。
- 姬姆萨应用液: 取 1mL 储备液加入 10mL pH6.8 磷酸缓冲液。
- 6.8 生理盐水、甲醇。

7 实验动物和饲养环境

适宜的雄性啮齿类动物均适用于本实验。推荐使用小鼠, 6 周—8 周龄, 体重为 30g—35g。动物在实验室中至少应适应 5 天, 实验开始时动物的体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。

8 剂量分组

受试物至少设三个剂量组。分别取 1/2、1/5、1/10 或 1/20LD₅₀ 剂量。当受试物的 LD₅₀ 大于 5g/kg 体重时, 可取 5g/kg 体重为最高剂量。另外设阴性 (溶剂) 对照组和阳性物对照组。阳性对照组用环磷酰胺 (40mg/kg 体重) 或丝裂霉素 C (1.5mg/kg 体重—2mg/kg 体重), 腹腔注射。每组至少有 5 只存活动物。

根据受试物的理化性质 (水溶性和/或脂溶性) 确定受试物所用的溶剂, 通常用水、植物油或食用淀粉等。

9 染毒途径和方式

染毒途径视实验目的而定, 建议采用经口灌胃方式。每天 1 次染毒 (如剂量过大时, 一天内染毒数次也是可以的, 但每次应间隔数小时), 连续 5d。于第 1 次染毒后的第 12d—14d 将受试动物处死。处死动物前 6h, 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液, 剂量为 4mg/kg 体重。

10 试验方法

10.1 取材

取出两侧睾丸, 去净脂肪, 于生理盐水中洗去毛和血污, 放入盛有适量 1% 柠檬酸三钠或 0.075mol/L 氯化钾溶液的小平皿中。

10.2 制片

10.2.1 低渗: 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 10mL, 用滴管吹打曲细精管, 室温下静止 20min。

10.2.2 固定: 仔细吸尽低渗液, 加固定液 (甲醇: 冰乙酸=3:1) 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 20min 以上。如在冰箱 (0℃-4℃) 过夜固定更好。

10.2.3 离心：吸尽固定液，加 60% 冰乙酸 1—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 1000 r/min 离心 10 min。

10.2.4 滴片：弃去大部分上清液，留下约 0.5—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—3 张。空气干燥或微热烘干。

10.2.5 染色：用 1:10 Giemsa 液 (PH 6.8) 染色 10min (根据室温染色时间不同)，用蒸馏水冲洗、晾干。

10.3 封片

用滤纸及时擦干染片背面的水滴，再用双层滤纸轻轻按压染片，以吸附染片上残留的水分，再在空气中晃动数次，以促其尽快晾干，然后放入二甲苯中透明 5min，取出滴上适量光学树脂胶，盖上盖玻片，写好标签。

10.4 阅片

10.4.1 阅片要求

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。由于低渗等机械作用的破坏，会导致处于中期的染色体发生丢失，所以，观察的中期相染色体数目应是 n 对双价体，每只动物至少分析 100 个中期分裂相的初级精母细胞。计数的细胞应含染色体数为 $1n+1$ 的中期相细胞。有对于畸变细胞还应记录显微镜视野的坐标位置及畸变类型。

10.4.2 染色体分析

除了可见到裂隙、短片、微小体外，还要分析互相易位、X-Y 和常染色体的单价体

11 数据处理和结果判断

所得各组染色体畸变率用 χ^2 检验，或其他适当的显著性检验方法进行统计学处理。当各剂量组与阴性(溶剂)对照组相比，畸变细胞率有显著性意义的增加，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有显著性意义的增加，经重复试验证实后，可判为试验结果阳性。

12 结果解释

阳性结果证明受试物具有引起该种动物睾丸生殖细胞染色体畸变的能力。

阴性结果表明在本试验条件下受试物不引起该种动物睾丸生殖细胞染色体畸变。