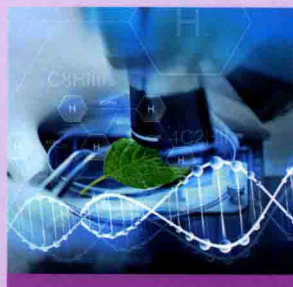




高等职业教育“十三五”规划教材



SHENGWU JIANCE  
JISHU

# 生物检测技术

(第二版)

李自刚 李鸣晓 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

高等职业教育“十三五”规划教材

# 生物检测技术

## (第二版)

李自刚 李鸣晓 主 编



中国轻工业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

生物检测技术/李自刚, 李鸣晓主编. —2 版. —北京: 中国轻工业出版社, 2016. 8

高等职业教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-5184-0990-7

I. ①生… II. ①李…②李… III. ①生物工程—检测—高等职业教育—教材 IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 138491 号

责任编辑: 江 娟

策划编辑: 江 娟 责任终审: 唐是雯 封面设计: 锋尚设计

版式设计: 宋振全 责任校对: 晋 洁 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 北京君升印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2016 年 8 月第 2 版第 1 次印刷

开 本: 720 × 1000 1/16 印张: 19.25

字 数: 380 千字

书 号: ISBN 978-7-5184-0990-7 定价: 39.00 元

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: [club@chlip.com.cn](mailto:club@chlip.com.cn)

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

150585J2X201ZBW

## 本书编委会

- 主 编** 李自刚（河南牧业经济学院）  
李鸣晓（中国环境科学研究院）
- 副主编** 黄雅琴（信阳农林学院）  
贾 璇（北京工商大学）  
姬向波（河南牧业经济学院）  
林小晖（山东省济南市食品药品检验检测中心）
- 参 编**（按姓氏笔划排序）  
王保营（河南牧业经济学院）  
卢芳芳（河南牧业经济学院）  
申绯翡（新乡医学院）  
刘士伟（河南牧业经济学院）  
李新峰（河南牧业经济学院）  
李 菲（河南牧业经济学院）  
苏铁青（河南牧业经济学院）  
宋卫生（河南牧业经济学院）  
杨荣跃（洛阳职业技术学院）  
张方方（河南牧业经济学院）  
张东峰（广东轻工职业技术学院）  
张 岩（河南牧业经济学院）  
郑高锋（河南牧业经济学院）  
苗红涛（河南牧业经济学院）  
屈贞财（河南牧业经济学院）  
郝 艳（中国环境科学研究院）

## 序 言

随着生物技术的发展，与生物技术有关的新产品也越来越融入到人们的日常生活之中。随之，生物安全也越来越引起人们的关注。近几年来，我国大部分高校都开设了生物类、生物工程类或与之相关的学科（专业）。因此，与生物安全相伴而生的生物检测技术也就成为生物、生物工程、食品药品安全等领域的核心技术之一。

生物检测学科（技术）是近年来高速发展的学科（技术）之一。本书以现代生物安全检测技术为主线，系统介绍了生物安全分析检测的原理、技术、手段、方法、应用及发展；主要包括生物安全检测的基本操作知识与技能、常用的手段与方法、生物安全性评价等的分析检测技术，以及最近发展起来的新的生物检测技术，如生物传感器和生物芯片检测技术等，内容系统、新颖，具有较强的集成性和实用性。

第二版的改动包括部分结构的调整和相关内容的更新，去除了第一版中与其他学科交叉并且与现代生物检测技术及相关理论无关的内容，使教材结构更合理、内容更精练、重点更突出。同时，第二版还引入了近年来生物检测技术领域发展的新理论、新技术，在注重现代生物检测技术基础理论和基础知识介绍的同时，使学生了解和学习最新进展和相关内容。

本书可作为以高等职业教育为主的高职高专学生教材用书，也可用作综合性院校、农林院校、师范院校、医学院校等相关专业的本科生、研究生的教学参考书，也可作为相关科研和教学工作者的参考用书。

# 目 录

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| 第一章 生物安全性评价与检测 .....         | 1   |
| 第一节 生物安全性评价的基本方法 .....       | 1   |
| 第二节 生物安全实验室的安全防护 .....       | 11  |
| 第三节 几种主要生物制品的安全性评价 .....     | 19  |
| 第四节 生物产品的质量安全认证 .....        | 26  |
| 第二章 生物化学实验与检测技术 .....        | 30  |
| 第一节 碳水化合物的代谢实验 .....         | 30  |
| 第二节 氨基酸和蛋白质的代谢实验 .....       | 36  |
| 第三节 碳源和氮源利用试验 .....          | 39  |
| 第四节 酶类试验 .....               | 42  |
| 第五节 抑菌试验 .....               | 47  |
| 第六节 血清学试验 .....              | 49  |
| 第七节 其他试验 .....               | 53  |
| 第三章 免疫学检测技术 .....            | 56  |
| 第一节 免疫学检测基本原理 .....          | 56  |
| 第二节 免疫凝集试验 .....             | 61  |
| 第三节 免疫沉淀技术 .....             | 66  |
| 第四节 免疫印迹技术 .....             | 71  |
| 第五节 酶联免疫检测技术 .....           | 79  |
| 第四章 病原学检测技术 .....            | 88  |
| 第一节 病原学检测技术的应用与发展 .....      | 88  |
| 第二节 病原微生物学检测的特点和影响因素 .....   | 88  |
| 第三节 病原微生物学检测实验室设施与设备要求 ..... | 91  |
| 第四节 病原体分离培养与接种技术 .....       | 103 |
| 第五节 检测标本制作技术 .....           | 123 |
| 第六节 显微镜检测技术 .....            | 127 |
| 第七节 病原体染色技术 .....            | 129 |
| 第八节 不染色标本检查 .....            | 138 |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| 第九节 细菌 L 型检查 .....             | 139        |
| 第十节 常见致病性细菌的培养和鉴定 .....        | 141        |
| 第十一节 常见致病性真菌的培养和鉴定 .....       | 161        |
| <b>第五章 电泳检测技术 .....</b>        | <b>168</b> |
| 第一节 电泳检测技术总论 .....             | 168        |
| 第二节 琼脂糖凝胶电泳 .....              | 169        |
| 第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....            | 174        |
| 第四节 蛋白质双向电泳 .....              | 180        |
| 第五节 纸电泳 .....                  | 187        |
| 第六节 毛细管电泳 .....                | 191        |
| <b>第六章 细胞生物学检测技术 .....</b>     | <b>203</b> |
| 第一节 细胞培养技术 .....               | 203        |
| 第二节 显微观察技术 .....               | 213        |
| 第三节 常见细胞检测技术 .....             | 223        |
| 第四节 染色体的核型和分带 .....            | 233        |
| 第五节 流式细胞技术 .....               | 242        |
| <b>第七章 分子生物学检测技术 .....</b>     | <b>251</b> |
| 第一节 PCR 检测技术 .....             | 251        |
| 第二节 实时荧光定量 PCR .....           | 259        |
| 第三节 核酸分子杂交概述 .....             | 267        |
| 第四节 生物芯片技术 .....               | 273        |
| <b>第八章 微生物鉴定的自动化和微型化 .....</b> | <b>284</b> |
| 第一节 微生物数码鉴定法原理 .....           | 284        |
| 第二节 使用自动化鉴定仪的局限性 .....         | 285        |
| 第三节 常用的微生物自动培养系统 .....         | 285        |
| <b>第九章 微生物检验的质量控制 .....</b>    | <b>290</b> |
| 第一节 室内质量控制 .....               | 290        |
| 第二节 室间质量控制评价 .....             | 298        |
| <b>参考文献 .....</b>              | <b>300</b> |

# 第一章 生物安全性评价与检测

## 【知识目标】

掌握生物安全性评价与检测领域的一些基本常识。

掌握生物安全性评价的基本方法。

掌握生物安全防护常识。

掌握生物产品的质量安全认证的常用体系。

## 【能力目标】

为生物检测技术能力的培养奠定一定的知识与理论基础。

培养生物安全性评价的基本能力。

培养学生生物安全的基本操作能力与安全防护习惯。

熟悉几种主要生物制品的安全性评价方法。

对生物材料或生物制品进行有效性和安全性评价是生物材料或生物制品进入应用（特别是临床应用）的关键环节。从细胞和组织的水平，利用形态学的检测方法观察生物材料或生物制品与机体短期和长期的相互作用关系是以往评价生物材料或制品的主要内容和手段。

新型生物材料或制品近年来迅猛发展，材料的组成、形态、植入部位及用途日趋复杂，因此，对材料或制品的评价相应提出了更高的要求，发展快速、特异、系统的评价体系至关重要。

近几年来，大量分子生物学的先进检测手段的应用使生物材料或制品的评价向细胞和分子水平迈进。RT-PCR、核酸/蛋白质杂交技术可以从分子的层面寻找材料和机体相互作用的重要的分子标记，而显微探测技术（如 CON-FUCAL）等的应用通过对图像的三维重建而达到对材料-细胞、材料-组织、细胞-组织相互作用清晰而透彻的观察。

本章重点阐述生物安全性评价的基本方法，如免疫毒性试验、生殖毒性试验、遗传毒性试验、长期毒性试验、急性毒性试验、亚急性毒性试验、慢性毒性试验、致癌试验、致突变试验。

## 第一节 生物安全性评价的基本方法

为保证生物材料或生物制品使用的安全性，在其投入实际应用以前都要进行生物安全性评价。生物安全性评价与管理是保护人类健康和动植物、微生物安

全，保护生态环境的重要保障。生物安全性评价与生物毒性试验的正确进行密切相关。

毒性试验分为急性毒性、蓄积毒性、亚急性毒性和慢性毒性试验，也包括特殊毒性试验，如致畸、致癌试验，免疫毒性、生殖毒性、遗传毒性及神经毒性试验，是制订食品、水、空气中化学物质卫生标准所必需的。毒性试验常选用不同种系的实验动物（大鼠、家兔、狗、猴等），采用经口、涂布皮肤或吸入等途径染毒，定期检测各项指标，获得可靠的毒性资料。其指导原则中规定了标准毒性试验方法，包括设计方案、染毒途径、剂量分组、动物品种、数量、观察内容和染毒期限等要求。它可推动毒性试验方法的统一和规范化，获得符合管理部门所需毒性资料。中国对药物、食品、化妆品和农药的安全性评价已制定了相应的毒性试验指导原则。

## 一、免疫毒性试验

免疫毒性试验是观察药物对试验动物免疫系统产生的不良影响和研究其影响机理。通过试验观察动物的免疫功能是否受到抑制或产生免疫缺陷，是否降低了机体抵抗力，是否产生变态反应以及可能引起这些反应的原因。具体包括以下几种试验。

T 淋巴细胞增殖反应：来源于外周血或脾脏的 T 细胞在对特异性抗原的反应中能够产生母细胞激化增殖。混合淋巴细胞反应（MLR）实验：MLR 实验用来评价 T 细胞识别同源淋巴细胞上外来抗原的能力，因此是一种检测细胞介导的识别移植器官或肿瘤细胞是否为异物的能力的间接方法。细胞毒 T 淋巴细胞（CTL）介导的试验：CTL 介导的试验能够确定 CTL 溶解致敏的同源性靶细胞或特异性靶细胞的能力。迟发型变态反应（DTH）又称“迟发型超敏反应”，属于 IV 型变态反应，是由 T 淋巴细胞介导的一种超敏反应。为表达 DTH 的炎症反应，免疫系统必须能够识别及处理抗原，促进 T 细胞的母细胞化及增殖，使记忆 T 细胞向抗原暴露的激发部位迁移，继而产生炎症调节因子和淋巴因子，引起炎症反应。因此，通过检测针对某种抗原的 DTH 反应，就可以对细胞免疫的传入（抗原识别及处理）和传出（产生淋巴因子）两种功能状态进行评价。

## 二、生殖毒性试验

生殖毒性试验是评价受试物对哺乳动物（啮齿类大鼠为首选）生殖的影响，与其他的药理学、毒理学研究资料综合比较，以推测受试物对人的生殖可能产生的毒性或危害性。

大鼠一般生殖毒性试验：按受试品剂量分组皮下注射给药，给药时间为交配前，雄大鼠 60d，雌大鼠 14d，每天一次，连续给药；雌大鼠交配后继续给药至妊娠后 20d。

观察受试品各剂量组对大鼠的一般状况、体重变化、受孕率、死胎数、活胎数、活胎重量、外观、内脏及骨骼的影响，并与生理盐水对照组比较。

大鼠致畸敏感期毒性试验：按受试品剂量分组，对雌性大鼠受孕后的第 6 ~ 15 天连续给药。观察受试品对胎仔外观、体重、身长、尾长、内脏和骨骼等的影响，并与生理盐水对照组比较。

大鼠围产期毒性试验：按受试品剂量分组皮下注射给药，给药时间为孕鼠妊娠 15d 开始至分娩后 28d，观察受试品大、中、小三个剂量组，对大鼠胚胎后期生长发育、母鼠分娩以及新生 F1 代大鼠的生理发育指标、神经反射发育指标和生殖功能，并与生理盐水对照组比较。

### 三、遗传毒性试验

遗传毒性试验能检出 DNA 损伤及其损伤的固定。以基因突变、较大范围染色体损伤、重组和染色体数目改变形式出现的 DNA 损伤的固定，一般被认为是可遗传效应的基础，并且是恶性肿瘤发展过程的环节之一（这种遗传学改变仅在复杂的恶性肿瘤发展变化过程中起了部分作用）。

染色体数目的改变还与肿瘤发生有关，并且可提示生殖细胞发生非整倍体的潜在性。在检测这些类别损伤的试验中呈阳性的化合物为潜在人类致癌剂和/或致突变剂。

由于在人体中已建立了某些化合物的暴露和致癌性之间的关系，而对于遗传性疾病尚难以证明有类似的关系，故遗传毒性试验主要用于致癌性预测。

但是，因为已经确定生殖细胞突变与人类疾病有关，所以对可能引起可遗传效应的化合物与可能引起癌症的化合物应引起同样的关注；此外，这些试验的结果可能还有助于致癌性试验分析。

遗传毒性研究在药物研发中处于比较重要的位置，尤其是在药物筛选阶段，在很大程度上遗传毒性试验结果将影响到药物开发的进程。

一般而言，根据其检测的遗传学终点可分为 4 种类型：检测基因突变；检测染色体畸变；检测染色体组畸变；检测 DNA 原始损伤。

### 四、长期毒性试验

长期毒性试验一般是在急性毒性试验结果的基础上，观察评价动物反复给予受试物后，机体产生毒性反应的特征及其毒性损害的严重程度，以及主要毒性靶器官及其损害的可逆性。

受试物长期毒性试验的目的是提供受试物的无毒性反应剂量和临床主要检测指标，为制定人用安全剂量提供参考资料。

因此长期毒性试验的设计最好能包括神经病理学、生理学、生物化学及相关的形态学指标的监测，还应注意受试物在组织中可能的蓄积，以及通过其他机制

产生的延缓毒性作用等。

## 五、急性毒性试验

急性毒性是指机体（人或实验动物）一次（或 24h 内多次）接触外来化合物之后所引起的中毒效应，甚至引起死亡。

需指出化合物使实验动物发生中毒效应的快慢和剧烈的程度可因所接触的化合物的质与量不同而异。有的化合物在实验动物接触致死剂量的几分钟之内就可发生中毒症状甚至死亡。而有的化合物则在几天后才显现中毒症状和死亡，即迟发死亡。此外，实验动物接触化合物的方式或途径不同，“一次”的含义也有所不同。凡经口接触和各种方式的注射接触，“一次”是指在瞬间将受试化合物输入实验动物的体内。而经呼吸道吸入与经皮肤接触，“一次”是指在一个特定的期间内实验动物持续地接触受试化合物的过程，所以“一次”含有时间因素。

急性毒性试验是指一次或 24h 内多次染毒的试验，是毒性研究的第一步。要求采用啮齿类或非啮齿类两种动物。通常对小鼠或大鼠经口吸入或经皮染毒途径。急性毒性试验主要测定半数致死量（浓度），观察急性中毒表现，经皮肤吸收能力以及对皮肤、黏膜和眼有无局部刺激作用等，以提供受试物质的急性毒性资料，确定毒作用方式、中毒反应，并为亚急性和慢性毒性试验的观察指标及剂量分组提供参考。

急性毒性试验的基本操作如下。

### （一）实验动物选择

在卫生毒理学领域中，体内试验以实验动物为研究对象，最终是为了阐明受试外来化合物对人的急性危害性质和危害强度。所以选择实验动物时，要求在其接触化合物之后的毒性反应，应当与人接触该化合物的毒性反应基本一致，选择实验动物的原则非常重要，利用任何一种或几种实验动物的急性毒性结果都必须十分慎重。

实验动物物种的选择应以哺乳动物为主，目前实际应用中主要以大鼠和小鼠为主，尤以大鼠使用最多。需要指出的是大鼠并非对外来化合物都最敏感。家兔常用于研究化合物的皮肤毒性，包括对黏膜的刺激。猫、狗也用于急性毒性试验，但因价高不宜大量使用。猪为杂食动物，对一些化合物的生物效应表现与人有相似之处，尤其是皮肤结构与人较近似。但因体大、价高，不便大量使用。

在进行化合物急性毒性研究中，选择实验动物的原则是：尽量选择对化合物毒性反应与人近似的动物；易于饲养管理，试验操作方便；易于获得、品系纯化且价格较低的动物。为了有利于预测化合物对人的危害，要求选择两种以上的实验动物，最好一种为啮齿类，一种为非啮齿类，分别求出其急性毒性参数。

一般研究外来化合物急性毒性，需雌雄两性动物同时分别进行，每个剂量组两性动物数相等。急性毒性使用小鼠体重以 18 ~ 25g、大鼠 180 ~ 240g、豚

鼠 200 ~ 250g、家兔 2 ~ 2.5kg、猫 1.5 ~ 2.0kg 为宜。

### （二）实验动物喂养环境

实验动物喂养室室温应控制在  $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$ ，家兔可控制在  $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ ，相对湿度 30% ~ 73%，无对流风。每笼动物数以不干扰动物个体活动及不影响试验观察为度，必要时需单笼饲养。饲养室采用人工昼夜为好，早 6 点至晚 6 点进行 12h 光照，其余 12h 黑暗，一般食用常规试验室饲料，自由饮水。

### （三）实验动物染毒方法

经口（胃肠道）接触目的是研究外来化合物能否经胃肠道吸收及求出经口接触的半数致死剂量（ $\text{LD}_{50}$ ）等。由于外来化合物可以污染饮水及食物，因此，此种染毒方式在卫生毒理学中占有重要地位。

灌胃是将液态受试化合物或固态、气态化合物溶于某种溶剂中，配制成一定浓度，装入注射器等定量容器，经过导管注入胃内。

在每一试验系列中，同物种实验动物灌胃体积最好一致，即以单位体重计算所给予的毫升数应一致，即  $\text{mL/kg}$  或  $\text{mL/g}$  计。这是因为成年实验动物的胃容量与体重之间有一定的比例。按单位体重计算灌胃液的体积，受试化合物的吸收速度相对较为稳定。小鼠一次灌胃体积在  $0.2 \sim 1.0\text{mL/只}$  或  $0.1 \sim 0.5\text{mL/10g}$  体重较合适，大鼠一次灌胃体积不超过  $5\text{mL/只}$ （通常用  $0.5 \sim 1.0\text{mL/100g}$  体重），家兔不超过  $10\text{mL/2kg}$  体重，狗不超过  $50\text{mL/10kg}$  体重。

## 六、蓄积毒性试验

蓄积毒性对试验动物多次给予小剂量的药物，当给予药物的时间间隔和剂量使药物进入机体的速度或总量超过机体的代谢转化速度和排泄能力时，导致药物在体内逐渐增加并滞留，这种现象称为药物的蓄积作用，由此引起的毒性作用称为蓄积毒性作用。蓄积作用与剂量的大小和给予药物的间隔时间密切相关。当给予药物的剂量较大，间隔时间较短，会有较多的药物呈现蓄积作用；相反，剂量较小，间隔时间较长，一般不易出现蓄积作用。

外来化合物的生物蓄积（功能性蓄积和物质性蓄积）是蓄积毒性的基础。可利用蓄积毒性试验初步评价外来化合物的蓄积毒性，主要是进行亚慢性毒性、慢性毒性的毒理动力学研究来阐明蓄积毒性。

功能性蓄积是指毒物随其剂量、活性强度、接触次数增加所致有害作用逐次累加现象而导致适应或中毒。

物质性蓄积是指毒物在组织器官内随机体反复接触毒物而增加。如果某一物质的染毒间隔时间（ $\Delta$ ）小于生物半减期（ $T_{1/2}$ ），则  $\Delta/T_{1/2}$  比值愈小，其蓄积出现愈快，假如某一物质的生物半减期很长，便可在体内蓄积，产生危害。

蓄积毒性的检测与评价方法如下。

蓄积毒性的检测有两类方法，一类是理化方法，一类是生物学方法。理化方

法就是利用化学分析或同位素技术测定毒物进入机体后，在体内含量变化的过程。该法可以确定毒物的半衰期，所以可以检测物质蓄积。生物学方法是将多次染毒与一次染毒所产生的效应进行比较，故不能区分是物质蓄积还是功能蓄积。生物学方法又分为蓄积系数法和残留率测定法。在实际工作中常用蓄积系数法。

蓄积系数法是一种以生物效应为指标，用蓄积系数评价蓄积作用的方法。这种方法的基本原理是在一定期限内，以低于致死剂量的受试物每日给予实验动物，直至出现某种预期的毒性效应为止。计算达到此种效应的累积剂量，求此累积剂量与一次染毒该化学物质产生相同效应的剂量的比值，此比值即蓄积系数  $K$ 。

## 七、亚急性毒性试验

亚急性毒性试验是指染毒期不长（一般为 3 个月），或接触毒物时间不长（数十天乃至数月）对机体引起功能和（或）结构的损害。常以毒性反应、毒性剂量、受损靶器官、无作用水平及病理组织学变化等描述亚急性毒性。一般由亚急性毒性试验结果提供这类资料。

亚急性毒性是介于急性毒性与慢性毒性之间的一种毒性表现，有时也难以划定明确的界限。

一般用半致死剂量的  $1/20 \sim 1/5$ ，每天投毒，连续半个月到三个月左右，主要了解该毒性是否有蓄积作用和耐受性。

## 八、慢性毒性试验

慢性毒性试验是考察少量受试物质（添加剂）长期作用机体所呈现的毒性，以确定其最大无作用量和中毒阈剂量。慢性毒性试验在毒理研究中十分重要，对于确定受试物质能否作为食品添加剂具有决定性意义。慢性毒性试验原则上是以寿命较短的敏感的动物的一生为一个试验阶段，通常是用大白鼠试验 2 年或用小白鼠试验 1.5 年。最大无作用量（MNL），也称最大耐受量、最大安全量或最大无效量，是机体长期摄入受试验物质（添加剂）而无任何中毒表现的每日最大摄入剂量，单位为  $\text{mg/kg}$  体重。它是食品添加剂长期（终生）摄入对本代健康无害，并对下代生长无影响的重要指标。

中毒阈剂量是最低中毒量，即能引起机体某种最轻微中毒的最低剂量。

## 九、致癌试验

致癌试验是检验外来化合物及其代谢物是否具有诱发癌或肿瘤作用。致癌试验检验的对象包括恶性肿瘤（癌）和良性肿瘤。能诱发恶性或良性肿瘤的物质，称为致癌物。

判断对人群有致癌作用的环境因素或环境致癌物，必须有人群流行病学调查和动物实验的研究资料。致癌实验的工作，目前还是通过整体动物实验来完成的。

致癌试验一般可分为长期致癌试验和短期快速筛检法。

长期致癌试验：多于哺乳动物中进行，一般多用大鼠、小鼠等啮齿动物，如条件许可，尚可于狗和猴等一种非啮齿动物中进行。用完整哺乳动物进行的长期致癌试验结果可靠，但试验过程较长，不能在较短时间内得出结论，费用也较高，故近年来有许多短期快速方法正在发展。

短期快速筛检法（较常用方法）如下。

### 1. 致突变试验法

在许多致突变试验方法中艾姆斯法最为常用，其理论根据为体细胞突变是致癌作用的基础。根据艾姆斯法试验结果，证实至少有 80% 的已知致癌物具有致突变作用，但也有不致突变的致癌物（如石棉纤维）和不致癌的致突变物。由于本法简便、灵敏，结果较为可靠，是目前最普遍使用的一种致癌物快速筛检法。

### 2. 哺乳动物细胞体外转化试验

将哺乳动物细胞株于体外与受试物接触，如受试物有致癌作用，可使正常细胞在形态与生理特性方面发生变化并与癌细胞相似。此种过程称为转化，已发生转化的细胞称为转化细胞。细胞转化并非形成肿瘤，但表示受试物可能具有致癌作用，并可用于致癌物的筛检。根据目前经验将艾姆斯试验与细胞体外转化试验结合使用，可筛检出 98% 以上的致癌物。

### 3. DNA 修复合成试验

常用方法有程序外 DNA 合成试验。

## 十、致突变试验

致突变试验即化学致突变物的检测试验，是指对致癌物质进行初筛，是人类预防癌症的重要手段，其中以细菌致突变试验应用最为广泛。

致突变试验通常包括以下三种试验方法。

### （一）基因突变试验

#### 1. 鼠伤寒沙门菌回复突变试验

鼠伤寒沙门菌回复突变试验又称 Ames 试验，检测受试物诱发鼠伤寒沙门菌组氨酸营养缺陷型突变株（ $his^-$ ）回复突变成野生型（ $his^+$ ）的能力。试验菌株都有组氨酸突变（ $his^-$ ），不能自行合成组氨酸，在不含组氨酸的最低营养平皿上不能生长，回复突变成野生型后能自行合成组氨酸，可在最低营养平皿上生长成可见菌落。计数最低营养平皿上的回复突变菌落数来判定受试物是否有致突变性。标准试验菌株有四种：TA97 和 TA98 检测移码突变、TA100 检测碱基置换突变、TA102 对醛、过氧化物及 DNA 交联剂较敏感。这四个试验菌株除了含有  $his^-$  突变，还有一些附加突变，以提高敏感性。

试验方法有点试验（预试验）和掺入试验（标准试验）两种。在掺入试验

中，受试物最高剂量为 5mg/皿或出现毒性及沉降的剂量，至少有五个剂量点，并有阴性（溶剂）对照和阳性对照。将受试物、试验菌株培养物和 S9 混合液加到顶层培养基中，混匀后铺在最低营养平皿上，37℃ 培养 48h，计数可见菌落数。判断阳性结果的标准是，如每皿回复突变菌落数为阴性对照的每皿回复突变菌落数的两倍以上，并有剂量 - 反应关系，即认为此受试物为鼠伤寒沙门菌的致突变物。

S9 混合液是用多氯联苯诱导的大鼠肝匀浆 9000 × g 上清液（S9）加上 NADP 及 6 - 磷酸葡萄糖等辅助因子，作为代谢活化系统。如不加 S9 混合液得到阳性结果，说明受试物是直接致突变物；加 S9 混合液才得到阳性结果，说明该受试物是间接致突变物。只要一种试验菌株得到阳性结果，即认为受试物是致突变物；仅当四种试验菌株均得到阴性结果，才认为受试物是非致突变物。

## 2. 哺乳动物细胞基因突变试验

哺乳动物体外培养细胞的基因正向突变试验常用的测试系统有小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞、中国仓鼠肺 V79 细胞和卵巢 CHO 细胞的三个基因位点的突变，即次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT）、胸苷激酶（TK）及  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶（OUA）位点。HGPRT 和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶位点突变可用于上述三种细胞，OUA 位点突变仅适用于 CHO 细胞，HGPRT 和 TK 可分别使 6 - 硫代鸟嘌呤（6 - TG）转移上磷酸核糖及使 5 - 溴脱氧尿苷磷酸化，它们的代谢产物可掺入 DNA 引起细胞死亡，因此正常细胞在含有这些碱基类似物的培养基中不能生长，在致突变物作用下此两个位点发生突变的细胞对这些碱基类似物具有抗药性，可以增殖成为克隆（细胞集落）。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶是细胞膜上的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  泵，鸟本苷可抑制此酶活性引起细胞死亡，当致突变物引起该位点突变后， $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶对鸟本苷的亲合力下降，而酶活性不变，故对培养基中的鸟本苷产生抗药性，并可增殖为克隆。

## （二）染色体畸变试验

### 1. 染色体分析

观察染色体形态结构和数目改变称为染色体分析。在国外常称为细胞遗传学检验，但这一名称有时广义地包括微核试验和 SCE 试验，因为这两个试验同样也是在显微镜下观察细胞染色体的改变。

对于结构畸变，一般只观察到裂隙、断裂、断片、微小体、染色体环、粉碎、双或多着丝粒染色体和射体。对于缺失，除染色单体缺失外，需做核型分析。即染色体摄影拍片后，再排列进行细微观察或用电子计算机进行图像分析。对于相互易位，除生殖细胞非同源性染色体相互易位外，倒位、插入、重复等均需染色体显带才能发现。

对于数目畸变，需在染毒后经过一次有丝分裂才能发现。但是经过一次有丝分裂后，一些结构畸变可能因遗传物质的丢失而致细胞死亡，因此不能发现。所

以应安排多次收获时间，以便分别检查断裂剂的作用。收获时间的安排还应考虑外来化合物可能在细胞周期的不同时期产生作用，以及延长细胞周期的作用。

体细胞的染色体分析可做体内或体外试验，体内试验多观察骨髓细胞，体外试验常用中国仓鼠肺细胞（CHL），以及中国仓鼠卵细胞（CHO）和 V79 等细胞系，但任何细胞系的染色体皆不稳定，不能准确地观察非整倍体，故在体外试验中，如考虑进行染色体数目观察，应当使用原代或早代细胞，例如人外周淋巴细胞。体内试验与人体实际接触情况相似，但应注意受试物或其活性代谢产物有可能不易在骨髓中达到足够的浓度。体外试验由于受试物与细胞直接接触，故往往比体内试验灵敏。

## 2. 微核试验

经致突变物作用后，染色体无着丝点断片或因纺锤体受损伤而丢失的整个染色体在细胞分裂的后期仍留在子细胞的胞质内，成为一个或几个规则的次核，称为微核。常用啮齿类动物骨髓嗜多染红细胞（PCE）微核试验。PCE 是红细胞成熟的一个阶段，此时红细胞的主核已排出，微核容易辨认，PCE 胞质含 RNA 染色与成熟红细胞易于区别，故为骨髓微核试验的首选细胞群。常用小鼠，至少设两个处理组，最高剂量为  $LD_{50}/7$  的 80%（ $LD_{50}/7$  为在 7d 内使半数动物死亡的剂量），另一组为  $LD_{50}/7$  的 40%，灌胃或腹腔注射，同时设阴性和阳性对照组，每组至少 8 只动物，雌雄各半。给毒方案有多种，如连续 4 天，每天一次。第 5 天处死，取骨髓，涂片，固定，染色。每鼠计数 1000 个 PCE 的微核出现率。当经适当的统计学分析，处理组微核率显著高于阴性对照组，并呈现剂量 - 反应关系时，可认为受试物对该试验动物的骨髓细胞有致染色体损伤的作用。

## （三）DNA 损伤试验

### 1. 姐妹染色单体交换（SCE）试验

SCE 是染色体同源座位上 DNA 复制产物的相互交换，SCE 可能与 DNA 的断裂和重接有关，提示 DNA 损伤。SCE 试验可分为体外试验、体内试验和体内、体外结合试验。体外 SCE 试验可采用贴壁生长的细胞，如 CHO、V79、CHL 等，也可用悬浮生长的细胞，如人外周血淋巴细胞。细胞在含 5 - 溴脱氧尿苷（BrdU）的培养液中生长两个周期。由于 BrdU 是嘧啶类似物，可于合成期中掺入 DNA 互补链，所以在下一个中期所见染色体姐妹染色单体之间各有一条互补链掺入了 BrdU，于是 BrdU 对姐妹染色单体造成同等的干扰，其染色并无区别。但到了第二个周期中期相，每个染色体中只有一条染色单体保留了原来不带 BrdU 的模板链，而另一条染色单体则是上一周期带 BrdU 的互补链成为模板链。于是经两个周期的 BrdU 掺入互补链可使两姐妹染色单体所含 BrdU 量不相等，从而出现染色差别。如果 BrdU 仅在第 1 周期掺入，第 2 周期不掺入，则第 2 中期相时可见姐妹染色单体染色有差别。如果 DNA 单链发生了断裂，而且在修复过程中发生重排，在第 2 周期可见姐妹染色单体同位节段的相互交换。经差别染色后，可观察

到两条明暗不同的染色单体。若两条染色单体间发生等位交换，可根据每条染色单体内出现深浅不同的染色片段进行识别和计数。

## 2. 程序外 DNA 合成试验

基本方法是测定 S 期以外 3H - 胸苷掺入胞核的量，这一掺入量可反映 DNA 损伤后修复合成的量。由于此种合成发生在 DNA 正常复制合成主要时期以外，故称为程序外 DNA 合成试验或 DNA 修复合成试验。一般使用人淋巴细胞或啮齿动物肝细胞等不处于正在增殖的细胞较为方便，否则就需要人为地将细胞阻断于 G1 期，使增殖同步化。然后在药物的抑制下使残存的半保留 DNA 复制降低到最低限度，才能避免掺入水平很高的半保留复制对掺入水平很低的程序外 DNA 合成的观察效果，此可通过放射自显影法和液闪计数法确定 3H - 胸苷掺入量。

### （四）致突变试验结果

各种致突变试验都有其特定的观察终点，但实验结束后都面临一个共同的问题，即所取得的数据表示阳性结果或表示阴性结果。

在评定阳性或阴性之前，应首先检查实验的质量控制情况。致突变试验的质量控制是通过盲法观察和阴性对照及阳性对照的设立。盲法观察是观察人员不了解所观察的标本的染毒剂量或组别，可免除观察人员对实验数据产生主观影响。阴性对照是指不加受试物的空白对照，有时则是加入为了溶解受试物所用溶剂的溶剂对照。阳性对照是加入已知突变物的对照，对于体外试验应包括需活化的和不需活化的两种已知致突变物。空白对照应和溶剂对照的结果一致，如有显著差异则可能表明有实验误差，如溶剂对照结果显著高于空白对照则可能溶剂具有致突变性。阴性对照和阳性对照结果都应和文献报道或本实验室的历史资料一致。如差异较大也说明可能有实验误差。发现这些质量控制指标存在任何疑问时，均应查清存在的问题，并加以解决后，重新进行实验。

#### 1. 阳性结果

阳性结果应当具有剂量反应关系，即剂量越高，致突变效果越大，并在一组或多组的观察值与阴性对照之间有显著差异。如果低剂量组或低、中两剂量组与对照组之间的差异有显著性，而高剂量组差异无显著性，则阳性结果不可信或无意义。此时应检查影响实验的因素，在排除影响因素后，应考虑是否为剂量反应关系曲线的特殊形式所致，即曲线上升至一定程度后下降。如怀疑及此，应当在零剂量与最高观察值的剂量之间重新设计染毒剂量。

#### 2. 阴性结果

阴性结果的判定条件是：①最高剂量应包括受试物溶解度许可或灌胃量许可的最大剂量。如该剂量毒性很大，则体内试验和细菌试验应为最大耐受量，使用哺乳动物细胞进行体外试验，常选  $LD_{50}$  或  $LD_{80}$  为最大剂量。溶解度大，毒性低的化学物，在细菌试验中往往以 5mg/皿作为最高剂量。②各剂量的组间差距不应过大，以防漏检仅在非常狭窄范围内才有突变能力的某些外来化合物。