

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第323号—26—2020

转基因生物及其产品食用安全检测 外源蛋白质大鼠28 d经口毒性试验

Food safety detection of genetically modified organisms and derived
products—28-day oral toxicity test of foreign proteins in rats

2020-08-04 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业农村部科技发展中心、中国农业大学、天津市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：黄昆仑、李夏莹、钱智勇、张秀杰、贺晓云、车会莲、许文涛、罗云波。

转基因生物及其产品食用安全检测 外源蛋白质大鼠 28 d 经口毒性试验

1 范围

本标准规定了转基因生物外源蛋白质 28 d 经口毒性试验的基本试验方法、数据处理和结果判定。本标准适用于评价转基因生物外源蛋白质的重复经口暴露毒性作用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 14922.2 实验动物 微生物学等级及监测
- GB 14924.3 实验动物 配合饲料营养成分
- GB 14925 实验动物环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

28 d 经口毒性 28-day oral toxicity

实验动物连续 28 d 经口给予受试物后引起的健康损害效应。

3.2

未观察到有害作用剂量 no observed adverse effect level, NOAEL

通过动物试验,以现有的技术手段和检测指标未观察到与受试物有关的毒性作用的最大暴露剂量。

3.3

最小观察到有害作用剂量 lowest observed adverse effect level, LOAEL

在规定的条件下,受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

3.4

靶器官 target organ

受试物直接发挥毒作用的器官或组织。

3.5

外源蛋白质 foreign protein

从转基因生物中提取的通过基因工程技术转入生物中的外源基因所表达的蛋白质产物,或者将转基因植物中的外源基因转入微生物中所表达的与植物中的外源蛋白质具有实质等同性的蛋白质产物。

3.6

对照蛋白质 control protein

与受试蛋白质等同或同源的天然来源的蛋白质,具有高度同源的氨基酸序列及相似的生物学功能。

4 原理

确定在 28 d 内连续经口给予外源蛋白质后引起的毒性效应,了解外源蛋白质毒性效应的剂量-反应关系和靶器官,确定 28 d 经口最小观察到有害作用剂量(LOAEL)或未观察到有害作用剂量(NOAEL),初步判断受试蛋白质经口暴露的毒性及作用特点。

5 试剂

5.1 主要试剂

甲醛、二甲苯、乙醇、苏木素、伊红、石蜡、血球分析仪稀释剂、生化分析试剂、凝血分析试剂、尿液分析试剂等。

5.2 溶媒

根据外源蛋白质的特点可以选择水、羧甲基纤维素等溶媒。如果选用其他溶媒,需说明理由。

6 主要仪器

电子天平、代谢笼、生物显微镜、检眼镜、生化分析仪、血细胞分析仪、血凝分析仪、尿液分析仪、离心机、石蜡切片机等。

7 实验动物

7.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.2 的有关规定,选用雌、雄两种性别的大鼠,4 周龄~6 周龄。试验开始时,每个性别动物体重差异不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。

7.2 动物准备

试验开始前,在实验动物房给予常规基础饲料喂养 3 d~5 d,以适应环境并进行检疫观察。

7.3 动物饲养

7.3.1 实验动物饲养条件应符合 GB 14925 的要求,饮用水应符合 GB 5749 的要求,饲料应符合 GB 14924.3 的要求。试验期间,动物自由饮水和摄食。

7.3.2 根据实验动物的空间要求确定每笼动物只数,每笼动物数一般不超过 2 只。

7.3.3 试验期间每组动物非试验因素死亡率应小于 10%,濒死动物应尽可能进行血液、生化指标检测、大体解剖以及组织病理学检查,每组生物标本损失率应小于 10%。

8 操作步骤

8.1 动物分组

8.1.1 试验设受试蛋白质组和溶媒对照组。

8.1.2 如果可以获得等同或同源的天然来源的蛋白质,推荐采用与同等剂量的天然来源对照蛋白质作为对照蛋白质。

示例:评价转基因植物表达的人乳铁蛋白的安全性时,可以采用人源的乳铁蛋白作为天然来源对照蛋白。

8.1.3 试验动物随机分配至各组,每组至少 20 只大鼠,雌雄各半。

8.2 剂量设计

8.2.1 主要依据人体暴露量进行剂量设计,高剂量组应至少达到人体可能暴露量的 300 倍。通常情况下设 2 个剂量组,组间距为 2 倍~4 倍。应尽可能包含人体可能暴露量的 100 倍。

8.2.2 如为灌胃法,应结合受试蛋白质溶解情况和动物最大灌胃体积予以考虑。

8.2.3 如添加到饲料中,应替代标准饲料中的蛋白质成分,配制后进行饲料成分测定,保持饲料能量、营养素的平衡,并符合 GB 14924.3 的要求。

8.3 受试蛋白质的处理

8.3.1 受试蛋白质应溶解或悬浮于适宜的溶媒中。

8.3.2 首选溶媒为水,配置成溶液。也可使用羧甲基纤维素等配成混悬液或糊状物等。

8.3.3 受试蛋白质应新鲜配制,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

8.3.4 对照蛋白质与受试蛋白质采用同样的溶媒,使用前配置成与受试蛋白质相同的浓度。

8.4 受试蛋白质的给予

8.4.1 受试蛋白质经口灌胃给予或添加到饲料中,连续给予 28 d。如为灌胃给予,每日在同一时段灌胃,每周称量体重 2 次,根据体重调整灌胃体积。

8.4.2 灌胃体积一般不超过每千克体重 10 mL,如为水溶液时,最大灌胃体积不超过每千克体重 20 mL,各组灌胃体积一致。

8.5 指标检测

8.5.1 一般临床观察

试验期间至少每天观察一次实验动物的一般临床表现,并记录动物出现的中毒症状、程度、持续时间和死亡情况。观察内容包括被毛、皮肤、眼、黏膜、分泌物、排泄物、呼吸系统、神经系统、自主活动(流泪、竖毛、瞳孔大小、异常呼吸)和行为表现(步态、姿势、对刺激的反应、有无强直性或阵挛性活动、刻板反应、反常行为等)。对异常动物应进行隔离,濒死和死亡动物应及时解剖。

8.5.2 眼部检查

试验前和试验结束时,对所有实验动物进行眼部(角膜、虹膜、球结膜)检查。

8.5.3 体重和摄食量

每周记录动物体重、摄食量,计算食物利用率;试验结束时,计算动物体重增长量、总摄食量、总食物利用率。

8.5.4 尿液检查

试验结束后,用代谢笼收集尿液,进行尿液常规检查。检测指标包括尿蛋白、相对密度、pH、葡萄糖和潜血等。必要时,可进行尿沉渣镜检、细胞分析等。

8.5.5 血液学检查

试验结束后,空腹采血,取抗凝血用于血液学检查。推荐检测指标:白细胞计数及分类(至少三分类)、红细胞计数、血红蛋白浓度、血小板计数、红细胞压积、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)等。必要时,加测网织红细胞、骨髓涂片细胞学检查。

8.5.6 血生化检查

试验结束后,空腹采血,取非抗凝血,分离血清,用于血生化检查。测定指标应包括电解质平衡,糖、脂和蛋白质代谢,肝(细胞、胆管)、肾功能等方面。检测指标应包括:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(AKP)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、钠、钾、氯。必要时可检测钙、磷、尿酸(UA)、胆碱酯酶、山梨醇脱氢酶、总胆汁酸(TBA)、高铁血红蛋白、激素等指标。

8.5.7 大体解剖和组织病理学检查

8.5.7.1 大体解剖

试验结束后,对所有动物进行解剖,肉眼观察各脏器异常表现,包括体表、颅、胸、腹腔及其脏器。称量心脏、胸腺、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸/卵巢的重量,计算相对重量(脏器重量/体重)。

8.5.7.2 组织病理学检查

可先对最高剂量组和对照组动物进行以下脏器组织病理学检查,发现病变后再对较低剂量组相应器官及组织进行检查。检查脏器应包括脑、甲状腺、胸腺、心脏、肝、脾、肾、肾上腺、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胰、肠系膜淋巴结、睾丸/卵巢、膀胱。必要时,可增加相关组织器官检查。对肉眼可见的病变或可疑病变组织进行病理组织学检查,出具组织病理学检查报告,病变组织给出病理组织学照片。

8.5.8 其他指标

根据受试蛋白质可能的毒性特点,增加其他检测指标,如神经毒性、免疫毒性、内分泌干扰作用等相关指标。

9 结果分析与表述

9.1 数据处理

9.1.1 将所有数据和结果以表格形式进行总结。列出各组试验开始时的动物数、试验期间动物死亡数及死亡时间、出现毒性反应的动物数,列出所见的毒性反应,包括出现毒效应的时间、程度及持续时间。

9.1.2 对动物体重、摄食量、食物利用率、血液学指标、血生化指标、尿液指标、脏器重量和脏体比值、病理检查等结果以适当的方法进行统计学分析。

9.1.3 计量资料采用方差分析,进行试验组与对照组之间均数比较;分类资料采用 Fisher 精确分布检验、卡方检验、秩和检验;等级资料采用 Ridit 分析、秩和检验等。

9.2 结果判定

9.2.1 根据受试蛋白质组和对照组动物在临床观察、生长发育情况、血液学检查、血生化检查、尿液检查、大体解剖、脏器重量和脏体比值、病理组织学检查等各项结果的差异,初步判断受试蛋白质是否具有毒作用及毒性作用的特点、程度、靶器官、剂量-反应关系、剂量-效应关系。

9.2.2 与溶媒对照组和对照蛋白组比较,综合分析得出 28 d 经口毒性最小观察到有害作用剂量(LOA-EL)或未观察到有害作用剂量(NOAE),初步判断受试蛋白质毒性及作用特点。



中华人民共和国
国家标准
转基因生物及其产品食用安全检测
外源蛋白质大鼠 28 d 经口毒性试验
农业农村部公告第 323 号—26—2020

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

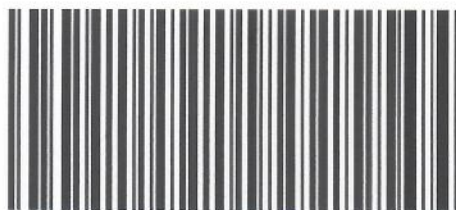
2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8249

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第 323 号—26—2020