**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

### 

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

微生物诱变育种致遗传物质损伤强度检测

FACS-umu测试法

**Quantification of microbial DNA damage caused by mutagenesis**

**FACS-umu-test**

（征求意见稿）



发布

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

微生物诱变育种致遗传物质损伤强度测定 umu法

1 范围

本标准规定了微生物诱变育种致遗传物质损伤强度测定umu法的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果分析。

本标准适用于物理诱变源和化学诱变源造成的微生物遗传物质损伤测定。

2 规范性引用文件

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

YY/T 0588 流式细胞仪

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

诱变 mutagenesis

通过人为的措施诱导遗传基因产生变异的过程。

注：常用的诱变方法包括物理诱变和化学诱变等。

3.2

遗传物质损伤 DNA damage

化学或物理诱变源对遗传物质分子结构的改变。

3.2

遗传物质损伤强度 DNA damage strength

当细胞受到DNA损伤时会发生应急修复（SOS修复），使其以突变为代价继续存活下去。

4 原理

在DNA发生损伤时，细菌通过lexA和recA的共同作用，引起体内的SOS响应。DNA损伤程度越高，SOS响应越强。通过将SOS系统调控基因与指示基因相融合，检测指示基因编码蛋白活性或信号强度，即可得到SOS基因的表达强度，表征DNA损伤强度和环境致癌物质浓度。在*umu*测试中，将编码DNA聚合酶V中重要组分的*umuC*基因与编码β-半乳糖苷酶的*lacZ*基因融合，导入到*Salmonella typhimurium*中，通过显色法检测β-半乳糖苷酶活性来测定SOS诱导强度。然而，由于诱变过程会造成细胞的死亡，死细胞会对测试诱变损伤能力的评估造成影响。为排除这一影响，FACS-umu测试方法利用流式细胞分选技术测定活细胞遗传物质损伤强度，其测试原理为：荧光素-2-β-D-半乳糖苷（FDG）本身不具有荧光，其被β-半乳糖苷酶水解后的产物荧光素具有荧光。碘化丙啶（Propidium iodide，PI）是一种DNA荧光染料，只能进入失去细胞膜选择通透性的细胞，即死细胞中，因此可以用于区分活死细胞。采用FDG作为β-半乳糖苷酶的荧光底物，利用PI作为死细胞染料，通过采用流式细胞仪测定诱变后活细胞的β-半乳糖苷酶活性，从而得到活细胞的DNA损伤强度。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T6682二级。

5.2 菌种：鼠伤寒沙门氏菌（Salmonella typhimurium），包含表达umuC’-’lacZ基因和氨苄青霉素抗性基因的pSK1002质粒。

5.3 TGA培养基

称取胰蛋白胨10 g，氯化钠5 g，HEPES 11.9 g，加入980 ml 水溶解，pH调整为7.0 ± 0.2，定溶到1000 ml。121℃，15 min高压灭菌。溶解2g葡萄糖在20ml去离子水中单独灭菌。灭菌后按等比例混合两个溶液，无菌条件下每升冷却的TGA培养基中加入50mg 氨苄青霉素。改溶液可以在-20℃保存4周。

5.4 10×TGA培养基

包含10倍浓度的TGA溶液，可以在4℃保存14天。

5.5 荧光素-2-*β*-*D*-吡喃半乳糖苷（Fluorescein di-*β*-*D*-galactopyranoside，FDG）溶液

在10 ml含体积比为1% DMSO和1%乙醇的水中溶解13.13 mgFDG，FDG终浓度为2mM，分装后保存在-20℃冰箱中。使用前在37 ℃预热15 min以上。

5.6 碘化丙啶（Propidium iodide，PI）溶液

在10 mlPBS溶液中溶解6.68 mgPI，配成浓度为1mM的PI溶液。用移液枪吸取10 ul浓度为1 mM的PI储备液，溶于10 mlPBS溶液中，配成浓度1 uM的PI溶液，作为PI工作液。于4℃保存，使用前在冰上放置预冷。

6 仪器设备

6.1 恒温水浴锅（37±1）℃；

6.2 pH计；0.1；

6.3 电子天平；0.01；

6.4 高速离心机；

6.5 流式细胞仪；

6.6 恒温震荡摇床，温度可实现（28±1）℃和（37±1）℃，转速在125r/min到150r/min；

7 测定步骤

7.1 测试菌过夜培养物制备

在三角瓶中装入2 0ml TGA培养基用透气无菌瓶塞封口，灭菌储存；融化冻存的测试菌，在冻存管中加入1 ml TGA培养基，3 000 g离心冻存管中的测试菌10 min，丢弃上清液，用1 mLTGA培养基重悬测试菌，用0.5 ml测试菌重悬液接种到含TGA培养基的三角瓶中，在（37±1）℃摇动培养过夜（不超过12 h）。

7.2 诱变测试微生物样品制备

用新鲜的TGA培养基（37℃）将过夜培养的测试菌稀释10倍。继续在37±1）℃摇动培养1.5天。在（600±20）nm用1 cm比色皿检测光密度，以TGA培养基作为空白对照，诱变测试微生物样品应处于对数生长期。

7.3 诱变

7.3.1 化学诱变

根据测试需求，宜通过文献等资料或设置预实验，确定化学诱变剂的种类和浓度。

将10 ul不同浓度的化学诱变剂加入到1 ml诱变样品（9.2）中，置于1.5 ml的EP管，在37±1℃，200 r/min震荡培养箱中培养2 h。对照为在1ml TGA培养基中加入10ul DMSO。

7.3.2 物理诱变

根据测试需求，宜通过文献等资料或设置预实验，确定物理诱变条件。

取100 ul 接种物（9.2）进行物理诱变处理，对照为没有进行物理诱变处理的样品。处理后的样品和对照转移到1.5 ml EP管中，在37±1℃，200 r/min震荡培养箱中培养2 h。

7.4 FDG和PI染色

取化学或物理诱变后的测试样品50 μl置于1.5 ml的EP管中，在37 ℃预热5 min，加入37 ℃预热的FDG溶液50 ul，迅速温和混匀后，置于37 ℃水浴中2 min，使FDG渗透进入细胞。之后迅速加入500 μl的PI溶液，将混合液放置于冰上反应1 h，在进行流式细胞测定前一直置于冰上。

7.5 流式细胞仪测定

使用流式细胞仪对染色后样品进行流式分析。采用激发波长为488 nm，对于FDG水解产物荧光素的荧光强度测定接收波长为525±30 nm（FL-1通道），PI染色荧光测定接收波长为670 nm（FL-2通道）。测定细胞总数为5000到10000个细胞。

8 结果分析

8.1阈值设定

通过前向角散射光FSC和侧向角散射光SSC圈出目标菌体，以去除多细胞粘连对结果的影响。通过单独的PI染色，测定FL-1通道和FL-2通道的荧光值，其FL-1通道荧光值作为背景值，即为FDG染色阴性细胞。通过单独的FDG染色，测定FL-1通道和FL-2通道的荧光值，其FL-2通道荧光值作为背景值，即为PI染色阴性细胞。对于FDG和PI同时染色的样品，选取FDG染色和PI染色阳性为目标细胞群，用于后续数据处理。

8.2 结果计算

按照式（1）进行计算：

……………………………………………………………（1）

式中：

Fi——SOS诱导系数；

*Am*——诱变源处理样品的平均FDG水解产物荧光素相对荧光值；

*Ac*——对照样品的平均FDG水解产物荧光素相对荧光值。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_