

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2242—2008

自然杀伤细胞活性试验

Natural killer cell activity assay

2008-11-18 发布

2009-06-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由中国国家认证认可监督管理委员会归口。

本标准负责起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位：中化化工标准化研究所、江南大学和天津市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：吕刚、张园、赵黎华、冯智劼、于智睿、赵琢。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

自然杀伤细胞活性试验

1 范围

本规范规定了自然杀伤细胞活性试验的测定方法、试验数据和评价。

本规范适用于检测实验动物一次或多次接触化学物质后,对 NK 细胞活性的影响。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准

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标准。

3.1

自然杀伤细胞 natural killer cell, NK

在无抗原刺激下能够杀伤多种有核细胞的淋巴细胞, NK 细胞是一种能表达“天然细胞毒作用”的独特细胞, NK 细胞存在于血液和淋巴组织中,也存在于无胸腺个体的血液和淋巴组织中,它是抗自发性肿瘤细胞和病毒感染细胞的第一道防线,在免疫监视中起重要作用。

4 测定方法

4.1 乳酸脱氢酶(LDH)测定法

4.1.1 材料及仪器

靶细胞 K562 或 YAC-1、Hanks 液、RPMI1640 培养液、青霉素、链霉素、谷胺酰胺、二巯基乙醇、乳酸锂或 L 乳酸钠、硝基氯化四氮唑(INT)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)、氧化辅酶 I (NAD)、0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液、可调微量加样器、96 孔平底板、CO₂ 培养箱、酶标仪、LDH 基质液的配置见表 1。

表 1 LDH 基质液的配制

试 剂	浓度/(mol/L)
乳酸锂	5×10^{-2}
硝基氯化四氮唑	6.6×10^{-4}
吩嗪二加酯硫酸盐	2.8×10^{-4}
氧化型辅酶	1.3×10^{-3}
将上述试剂溶于 0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)	

4.1.2 操作方法

4.1.2.1 动物选择

选择健康 6 周龄~8 周龄,雌性 CBA、C3H 或 BALB/C 小鼠,试验前应在动物室适应 7d。试验动物的饲养和环境设施应符合 GB 14924.1 和 GB 14925。

4.1.2.2 动物分组

按随机方法将动物分为对照组及染毒组,各组动物 10 只。

4.1.2.3 染毒

染毒剂量,染毒组一般设为 3 个剂量组,高剂量为 $1/5LD_{50} \sim 1/10LD_{50}$,低剂量以不引起任何免疫毒性,在低、高剂量中设中剂量组。组间距通常为 5 倍或 2 倍。

4.1.3 试验程序

4.1.3.1 靶细胞制备

试验前 24 h 将靶细胞(K562 或 YAC-1 细胞)进行传代培养,用以前 Hanks 液洗三次,1 000 r/min 离心 10 min,悬浮在一定体积的 Hanks 液中,计数细胞,用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /mL。

4.1.3.2 效应细胞的制备

- 经染毒后,将各组动物包括对照组用颈椎脱臼法处死小鼠,取出脾脏,制备脾细胞悬液,整个操作在 4 ℃下进行,以保持 NK 细胞的活性;
- 离心 1 000 r/min,10 min,在 4 ℃下进行;
- 弃上清液,将细胞悬浮在 5 mL 冷的 RPMI1640 完全培养液中;
- 计数细胞并检查细胞的活力(台酚蓝拒染法);
- 用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度,如效应细胞与靶细胞之比按 1 : 50,则效应细胞浓度为 5×10^6 /mL。

4.1.3.3 NK 细胞活性检测

- 取靶细胞和效应细胞各 100 μ L,加入 U 型 96 孔培养板中;靶细胞自然释放孔,加靶细胞和 1%NP 各 100 μ L,上述各项均设 3 个复孔;
- 将培养板置 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 4 h~6 h;
- 将培养板在水平离心机上,1 500 r/min 离心 5 min;
- 每孔吸取上清液 100 μ L,置于 96 孔平底培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μ L,反应 3 min。每孔加入 1 mol/L 的 HCl 30 μ L,立即在酶标仪 490 nm 处测定 OD 值。

4.1.3.4 结果计算

结果计算见式(1):

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{批应孔 OD} - \text{靶细胞自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{靶细胞自然释放孔 OD}} \times 100\% \quad \dots\dots(1)$$

4.2 同位素⁵¹Cr 释放法

4.2.1 材料和仪器

靶细胞 K562 或 YAC-1、Hanks 液、RPMI1640 培养液、效应小鼠脾淋巴细胞、Na₂⁵¹CrO₄ 比活性 $(3.7 \sim 5.5) \times 10^6$ Bq,放射强度为 $(3.7 \sim 7.4) \times 10^7$ Bq,96 孔培养板(U 型), γ 测定仪,可调微量加样器和二氧化碳培养箱。

4.2.2 操作方法

同 4.1.2。

4.2.3 试验程序

4.2.3.1 靶细胞标记

- 将靶细胞(K562 或 YAC-1)进行传代,24 h 后用台酚蓝拒染法检测细胞活力,细胞活力应 $\geq 95\%$;
- 细胞悬浮在 RPMI1640 完全培养液中,计数细胞,将细胞用 RPMI1640 完全培养液调整成 4×10^6 /mL;
- 将调整好的细胞与 Na₂⁵¹CrO₄ 充分混合,置 37℃ 含 5% CO₂ 温箱培养 45 min~60 min;

- 用 Hanks 液洗 3 次, 1 000 r/min, 10 min;
- 计数细胞并用 RPMI1640 完全培养液调细胞浓度为 1×10^5 /mL。

4.2.3.2 效应细胞的制备

同 4.1.3.2。

4.2.3.3 NK 细胞活性检测

- 将效应细胞分装到 96 孔 U 型培养板中, 100 μ L/孔, 并加入靶细胞 100 μ L/孔, 使效靶之比为 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, 同时设 ^{51}Cr 标记靶细胞最大释放孔, 靶细胞和 1% NP 各 100 μ L/孔。上述各项均设 3 个复孔。
- 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% 二氧化碳的培养箱中培养 4 h~6 h。
- 离心后, 每孔取上清液 200 μ L, 放入测定管中。
- 在 γ 计数仪上测定 CPM。

4.2.3.4 计算结果

结果计算见式(2):

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{(\text{效应细胞} + \text{靶细胞}) \text{自然释放孔 CPM}}{\text{最大释放孔 CPM} - \text{自然释放孔 CPM}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

5 试验数据

以表格方式列出每只动物编号、性别, (效应细胞+靶细胞)孔 OD 值或 CPM 值, 自然释放孔的 OD 值或 CPM 值及最大释放孔的 OD 值或 CPM 值, 通过公式计算 NK 细胞活性。

6 试验记录

- 试验开始、结束时间, 实验室名称, 试验负责人及参加试验者;
- 动物品、系、来源、饲养条件, 动物室环境;
- 受试物的理化性质及配置方法, 染毒时间, 染毒途径;
- 靶细胞来源、保存、传代及制备方法;
- 动物处死时间及方法;
- 动物开始时体重, 结束时体重;
- 根据测定的 OD 值或 CPM 值, 计算 NK 细胞活性;
- 统计分析方法;
- 结果评价。

7 评价及解释

外源化学物对动物 NK 细胞活性的影响, 多数能引起人体 NK 细胞活性的变化, 但需要人 NK 细胞活性检测加以证实。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
自然杀伤细胞活性试验
SN/T 2242—2008

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548

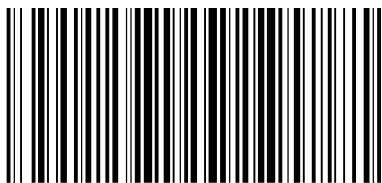
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 7千字
2009年2月第一版 2009年2月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-19531 定价 6.00 元



SN/T 2242-2008