

ICS xx.xx.xx
Pxx

团 体 标 准

T/CUWA 6005X—202X

饮用水毒性检测技术标准 第 1 部分 总则

Technique Standards for Toxicity Detection of Drinking Water
Part 1 General rule

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国城镇供水排水协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 实验室与仪器设备要求.....	2
4.1 实验室环境.....	2
4.2 仪器设备与试材.....	3
4.3 试验试剂与耗材.....	3
5 样品采集与前处理.....	4
5.1 样品采集.....	4
5.2 样品前处理.....	4
6 质量保证和质量控制.....	5
6.1 实验分析人员自我质量保证.....	5
6.2 检测仪器与设备.....	5
6.3 采样与分析步骤质控.....	5
7 废物处理.....	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能直接或间接涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任，对所涉专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

本标准可能涉及必不可少的专利，编制单位承诺已确保专利权人或者专利申请人同意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该标准时实施其专利。

本标准由中国城镇供水排水协会标准化工作委员会归口。

本标准主编单位：XXXX

本标准参编单位：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要起草人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要审查人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

饮用水毒性检测技术标准

第 1 部分 总则

1 适用范围

本标准规定了饮用水体外生物毒性检测需要的实验室环境与仪器试材要求、样品采集与前处理、质量保证和质量控制、毒性当量计算、废物处理等基本要求。本标准所指的饮用水毒性检测技术包括饮用水细胞毒性测试、饮用水雌激素受体干扰效应测试和饮用水 DNA 损伤效应测试。

本标准适用于饮用水的体外细胞毒性检测、雌激素受体干扰效应检测、DNA 损伤效应检测所需的实验室环境与仪器试材要求、样品采集与前处理、质量保证和质量控制、废物处理等工作。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。凡未注明日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 5750.2-2006 生活饮用水标准检验方法 水样的采集和保存

3 术语和定义

3.1

饮用水 Drinking Water

供人生活的饮水和生活用水

3.2

细胞毒性 Cytotoxicity

是指由样品提取物引起的单纯细胞杀伤事件，不依赖于凋亡或坏死的细胞死亡机理。

3.3

半抑制浓度 half maximal inhibitory concentration

对指定的生物过程（或该过程中的某个组分比如酶、受体、细胞等）抑制一半时所需的样品或者抑制剂的浓度，用 IC_{50} 来表示。

3.4 半数效应浓度 concentration for 50% of maximal effect

当试验不以死亡作为试验生物对毒物的反应指标，而是观察测定毒物对生物的某一影响，常用有效浓度即 EC（effective concentration）来表示毒物对试验生物的毒性。半最大效应浓度（即 EC_{50} ）是指能引起 50% 最大效应的浓度。

3.5

雌激素效应 estrogenic effect

与天然雌激素具有相似的结构，可在生物体内发挥相似的功能，作用于靶器官而产生的生理改变或结构变化。

3.6

抗雌激素效应 anti-estrogenic effect

可与雌激素类物质产生拮抗，抑制或减弱雌激素作用的效果。

3.7

雌激素受体 estrogen receptor, ER

雌激素受体可位于细胞膜、细胞质或细胞核。经典的核受体位于细胞核，其蛋白质在翻译后短暂位于胞浆，故可在细胞质检测到。扩散到细胞核的雌激素与其核受体结合后引发基因调控机制，调节下游基因的转录。

3.8

遗传毒性 genetic toxicity

引起有机体遗传毒性物质（DNA 和（或）染色体）结构和（或）数量改变的性质。

3.9

SOS 反应 SOS response

SOS 反应又称应急反应，是机体遭遇能造成 DNA 损伤或抑制复制的处理时所引起的一系列复杂的诱导效应。在原核和真核生物体内，与 SOS 反应相对应的大约有 20 个基因，包括 *umuC*、*umuD* 和 *sfiA* 等。

4 实验室与仪器设备要求

4.1 实验室环境

具有相互独立的细胞培养实验房间和细菌培养实验房间，分别用于进行体外细胞毒性测试实验和细菌酵母测试实验。房间内干净整洁，实验进行期间需要每天打扫，并在实验前后用紫外灯照射进行 15-30 分钟灭菌。各项测试中使用的培养箱应定期清洗、灭菌，及时更换无菌水，实验前后保持无菌台洁净。防止细菌滋生容易使细胞、细菌培养过程受到污染。

4.2 仪器设备与试材

4.2.1 百级超净工作台。

4.2.2 二氧化碳细胞培养箱：37℃，5% CO₂ 浓度，可控湿度。

4.2.3 多功能酶标仪。

4.2.4 分光光度计：带 420 nm 和 600 nm 滤光片。

4.2.5 恒温空气浴振荡摇床。

4.2.6 恒温 96 孔平板摇床。

4.2.7 高压蒸汽灭菌器。

4.2.8 单通道移液器：2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 mL、5 mL。

4.2.9 多通道移液器：宜选用 8 或 12 通道移液器，量程范围为 1~10μL、10 μL~100 μL 和 50 μL~300 μL。

4.2.10 涡旋混合仪。

4.2.11 过滤装置：带滤膜支架的微滤系统。

4.2.12 固相萃取装置：可通过无水真空气泵调节流速，流速范围 1 mL/min ~20 mL/min。

4.2.13 浓缩装置：旋转蒸发仪和氮吹仪。

4.2.14 微孔板振荡器。

4.2.15 倒置显微镜。

4.3 试验试剂与耗材

试验中所需试剂除特殊说明外，一般为分析纯试剂。

本标准中所用方法为体外生物测试方法，因此在细胞或细菌培养和暴露过程中应严格保证所用试剂材料的无菌和灭菌。各类培养基试剂存放应低温贮存，且应在无菌操作台中进行取液等操作。

5 样品采集与前处理

5.1 样品采集

采样容器的选取和洗涤、水样采集和保存方法按照 GB/T 5750.2-2006 《生活饮用水标准检验方法——水样的采集与保存》所规定的内容进行。采用棕色玻璃瓶采集水样，由于离体生物测试需要的样品量大，建议采集 20 L 饮用水进行前处理。每次采样均须设有基质加标样，10~20 个测试样品同时完成一组质量控制样品的测试。过滤富集应在采样后 6 h 内进行。否则应在 2~5 °C 下避光密封保存，但不超过 24 h。

5.2 样品前处理

5.2.1 通用要求

本标准中水样的样品前处理采用固相萃取方法，由于具有不同生物毒性效应的有机污染物的化学性质（比如极性）差异较大，因此本标准针对细胞毒性、遗传毒性、雌激素受体干扰效应三类毒性效应的测试分别制定了相配套的样品前处理方法。前处理流程都包括水样粗滤、固相萃取柱活化、水样富集、水样洗脱与浓缩等步骤，整体流程如下所示：

（对于每种生物测试，固相萃取柱和洗脱剂的选择有所不同，将在标准的第 2-4 部分分别说明。）

5.2.2 水样粗滤

使用过滤装置和微孔滤膜进行过滤，过滤后的水样应在 2 °C~5 °C 下保存。

5.2.3 固相萃取柱活化

将固相萃取柱（SPE 柱）固定在固相萃取装置上，按极性由低到高依次加入洗脱剂包含的有机溶剂、甲醇、超纯水各 6 mL 进行 SPE 柱的预冲洗与活化（若洗脱剂中包含甲醇则不用重复加入），让其以缓慢流速（约 5 mL/分钟）通过 SPE 柱，达到活化柱子的目的。

5.2.4 水样富集

将水样通过样品管连接至活化好的固相萃取柱，每根固相萃取柱富集水样 4 L，调节真空度（真空度应小于 20 毫米汞柱），使水样过柱的流速恒定在 10 mL/min。富集完毕后，将水抽干，用氮气吹干 20 min 或使用高速离心机甩干。此时，已将水样中有机物质富集在固相萃取柱上。如不能马上洗脱应将小柱用铝箔包裹，编号，-20 °C 避光保存，并宜尽快洗脱。

5.2.5 水样洗脱与浓缩

将 5.2.3 中吹干后的固相萃取柱置于固相萃取装置上，下面用干净玻璃管承接，以约 12 mL 洗脱剂分两次（6 mL、6 mL）进行洗脱，抽干后保持相同真空度 30 min。

洗脱液通过无水硫酸钠填充的小柱进行脱水，脱水后洗脱液收集于 K-D 浓缩管中，在氮吹装置上用高纯度氮气吹至近干，加入 DMSO 进行溶剂置换并根据需要的浓缩倍数定容至适当体积，饮用水推荐浓缩 10 万倍，即由 20 L 富集至 200 μ L DMSO，-20 $^{\circ}$ C 保存。

6 质量保证和质量控制

6.1 实验分析人员自我质量保证

分析人员在首次使用本标准规定的测试方法时，应进行测试方法的验证；在更换不同批次的试验生物、试剂、实验室条件等检测条件发生变化时，应检查并确认测试方法在变化条件后符合检测分析的要求。在检测过程中，检测人员应按方法要求进行设备校准、标准物质或平行样、阴性（溶剂）对照、空白对照或加标样等检测，对检测过程进行自我质量控制。当分析人员发现自我质量控制未达到要求时，应查找原因；对实验差错造成的失控样品（不包括计算错误），应进行复测。

6.2 检测仪器与设备

在检测过程中使用到的所有仪器和设备应该定期维护保养，必要时应制定仪器与设备操作作业指导书，使用或维护时做好仪器与设备使用记录维护记录，保证仪器与设备处于完好状态。每台仪器与设备均应有责任人负责日常管理。

6.3 采样与分析步骤质控

6.3.1 样品采集

设置平行样、基质加标样品或空白加标样。平行样采集 2 份样品，平行样分析至少占整个样品的 10%。

6.3.2 样品暴露浓度设置

每次测试的样品暴露环节均需要设置阴性对照组（一般为 DMSO）、阳性对照组、以及样品组。样品组每个样品需要设置至少 6 个浓度梯度（稀释浓度差一般为 1/2 或 1/4），阳性对照标准曲线需要设置 8-14 个浓度梯度。每组设置 3 个平行作为技术重复。每个测试重复 2~3 次实验作为生物学重复。

对于细胞和酵母暴露，二甲基亚砜（DMSO）的终浓度控制在 0.5% 以下，以避免对细胞产生不良影响；对于细菌暴露，DMSO 终浓度控制在 1% 以下。

6.3.3 受试细胞系与受试微生物

6.3.3.3.1 受试细胞系

为了保证不同批次实验间细胞的纯度、稳定性、均一性，需要注意以下方面：

- a. 只从厂商、细胞平台等可信的来源获取状态良好、无杂菌污染的细胞；
- b. 保持操作和培养空间的无菌环境，杜绝细菌、真菌、支原体等污染；
- c. 实验尽量使用传代次数少的细胞，降低长期传代过程中性状改变和基因变异的可能。推荐使用从购买后传代次数在 10 代以内的细胞用于测试。
- d. 每次测试使用相同的细胞铺板密度，以得到良好的可重复性和平行性。

2) 重组雌激素核受体基因双杂交酵母

为了保证双杂交酵母双质粒转染的性状在实验和传代过程中不丢失，在酵母培养方面需要采取营养缺陷型筛选方法进行质控，具体如下：

a. 酵母细胞的复苏和培养均采用营养缺陷型培养基 SD/-Trp/-Leu，冻存使用添加了 15% 的无菌甘油的 SD/-Trp/-Leu；

b. 酵母的传代次数大于 5 代后，或冻存时间大于 3 个月-半年，可能出现性状丢失或者活性降低，需要涂布在 SD/-Trp/-Leu 固体培养基平板上，于 30℃ 培养 2-4 天，再挑取直径大于 2 mm 的单克隆于 SD/-Trp/-Leu 液体培养基中继续培养、并重新冻存。

3) 鼠伤寒沙门氏菌 TA1535/pSK1002

为了保证 SOS/umu 测试用菌鼠伤寒沙门氏菌 TA1535/pSK1002 的性状在实验和传代过程中不丢失，在菌株培养方面需要使用添加抗生素的 LB 培养基筛选法进行质控，具体如下：

a. TA1535/pSK1002 菌株的复苏和培养均采用添加氨苄西林的 LB 培养基，冻存使用添加了 10% DMSO 的 LB 培养基；

b. 细菌的传代次数大于 5 代后，或冻存时间大于 3 个月-半年，可能出现性状丢失或者活性降低，需要涂布在添加了氨苄西林的固体 LB 培养基平板上，于 37 °C 培养 1-2 天，再挑取直径大于 2 mm 的单克隆于添加了氨苄西林的液体 LB 培养基中继续培养、并重新冻存。

6.3.4 标准曲线检验

由于生物测试的稳定性主要取决于检测人员的实验操作和受试细胞、微生物的状态，因此需要经常进行阳性化合物的标准曲线的测定，以检验测试流程是否有问题，以及菌株活性是否良好。本标准根据每个生物测试的阳性化合物标准曲线的实验室历史数据，得出相应的阳性标准物质 IC₅₀、EC₅₀、IR_{1.5} 等值的范围，作为测试结果的质量控制标准，将在第 2-4 部分分别说明。平行样品的误差范围应该在 20% 之内。

7 废物处理

含实验细菌或细胞的废液排放前需要在高压蒸汽灭菌器中灭活。

使用的含有标准物质、有机溶剂等有毒有害物质的废液不能随意排入环境中，需要单独存放，并委托有资质的单位进行处置

ICS xx.xx.xx
Pxx

团 体 标 准

T/CUWA 6005X—202X

饮用水毒性检测技术标准 第 2 部分 饮用水 体外细胞毒性的测定 中性红摄取法

Technique Standards for Toxicity Detection of Drinking Water
Part 2 Drinking water —— In vitro cytotoxicity —— Neutral red uptake assay

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国城镇供水排水协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 方法原理.....	1
4 试剂与材料.....	1
5 样品采集与前处理.....	2
6 分析步骤.....	3
6.1 哺乳动物细胞复苏、培养与冻存.....	3
6.2 细胞接种.....	3
6.3 样品暴露.....	3
6.4 中性红检测.....	3
7 结果计算与表示.....	4
8 质量保证和质量控制.....	4
附 录 A.....	5

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能直接或间接涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任，对所涉专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

本标准可能涉及必不可少的专利，编制单位承诺已确保专利权人或者专利申请人同意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该标准时实施其专利。

本标准由中国城镇供水排水协会标准化工作委员会归口。

本标准主编单位：XXXX

本标准参编单位：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要起草人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要审查人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

饮用水毒性检测技术标准

第 2 部分 饮用水 体外细胞毒性的测定 中性红摄取法

1 适用范围

本标准规定了饮用水体外细胞毒性的检测方法—中性红摄取细胞法，包括试剂材料、样品前处理、分析步骤、结果计算与表示、质量保证与质量控制等基本步骤和方法。

本文件适用于由有机污染物引起的饮用水的细胞毒性的检测。

离体生物测试需要的浓度范围：各种饮用水样品均可以经过浓缩进行测定。本文件提供的待测样品检出限为： 205.77 ± 46.38 mg 苯酚 /L（离体测试的暴露浓度），该数值是本测试阳性化合物苯酚的标准曲线的 IC_{10} 浓度，也相当于最低可见效应浓度（LOEC）。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准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标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）适用于本标准。

GB/T 16886.5-2017 医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验

3 方法原理

正常情况下，细胞能够吸收生物活性染料（如中性红），并在溶酶体中积累。当细胞受到损伤甚至死亡后，吸收生物活性染料的能力降低，因此通过中性红摄入量的不同，就可以确定细胞的存活率情况。

4 试剂与材料

4.1 试验细胞

优先采用已建立的细胞系并应从认可的贮源获取，试验应只能使用无支原体污染细胞，并定期检查细胞的形态、倍增时间等。且宜选择易贴壁生长且增殖旺盛的哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢细胞系（Chinese hamster ovary cells，简称 CHO 细胞）等。

本标准以中国仓鼠卵巢细胞 K1 亚株（简称 CHO-K1）[来源：中国协和医科大学基础医学研究所基础医学细胞中心]为例进行阐述，选用其他细胞需要配置相应的不影响细胞生长状态的细胞培养基。

4.2 细胞培养基：F12 细胞培养基，4℃保存，有效期：一年。

CUWA/T xx-xxxx

4.3 胎牛血清。

4.4 双抗：10000 IU/mL 青霉素-链霉素溶液。

4.5 细胞完全培养基：含 10%胎牛血清（PAN）、1%青霉素-链霉素溶液（10,000 U/mL）和 0.1%两性霉素溶液 B（2.5 mg/mL, Amresco）的 F12 培养基，置于 4℃ 保存，可保存 2 周。

4.6 0.05%胰酶溶液。

4.7 磷酸盐缓冲液（PBS）：配制 0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 与 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 混合溶液，过膜除菌备用。

4.8 中性红储备溶液：取 40 mg 中性红溶于 10 mL 超纯水，室温黑暗环境中保存备用，可保存 2 个月。

4.9 中性红培养基：将中性红储备溶液（4.8）用与细胞培养基（4.2）按体积比 1:80 的比例配制成中性红培养基，预温至培养温度，现配现用。

4.10 解吸附溶液：即 1% 醋酸和 50%乙醇的溶液，将 1 mL 醋酸加入 50 mL 无水乙醇中，用超纯水定容到 100 mL。该溶液现用现配，储存时间不宜超过 1 h。

4.11 二氯甲烷、甲醇：色谱级。

4.12 二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，简称 DMSO）：农残级。

4.13 细胞培养瓶：25 cm^2 。

4.14 96 孔细胞培养板：简称 96 孔板，无菌，无色透明。

4.15 采样瓶：棕色玻璃瓶（带螺口盖），瓶身宜用铬酸洗液浸泡过夜，用自来水和超纯水洗净，烘干冷却至室温，盖塞备用。

4.16 微孔滤膜：玻璃纤维滤膜， $\phi 142$ mm，孔径 0.8 μm ~1.2 μm ，450 °C 烘烤 3 h。

4.17 固相萃取柱：HLB 固相萃取柱（6 cc、200 mg），填料为 N-乙烯吡咯烷酮和亲脂性的二乙烯基苯的聚合物。

4.18 K-D 浓缩管。

4.19 锥形瓶、烧杯、量筒、酒精灯等常用玻璃器皿。

注 1：本方法所使用试剂除另有说明外，均应为符合国家标准的分析纯试剂。实验用水为超纯水。

注 2：所用玻璃仪器均以 10% 的稀硝酸浸泡过夜，再以重铬酸钾洗液润洗浸泡 20 min 以上，分别用自来水、蒸馏水冲洗干净，在烘箱中 110 °C 烘干。

5 样品采集与前处理

用于饮用水细胞毒性测试的样品采集与前处理参照总则中第 5 节规定的步骤进行。其中固相萃取柱采用 HLB 柱（500 mg，6 cc），洗脱剂采用二氯甲烷/甲醇（体积比为 9:1）分两次（6 mL、6 mL）进行洗脱，其余步骤相同。

6 分析步骤

6.1 哺乳动物细胞复苏、培养与冻存

详见资料性附录 A。

6.2 细胞接种

由于细胞暴露时间比较长，为了避免 96 孔板的边缘效应，将细胞完全培养基用多通道移液器吸取 100 μ L 加至 96 孔板 A 的外围孔中，不使用边缘孔作为实验处理。

将汇合率达到 80% 的 CHO-K1 细胞用 0.05% 胰酶溶液（4.6）消化后，加入细胞完全培养基（4.5）稀释细胞悬液至 7×10^4 个/mL 细胞，将细胞悬液用单通道移液器或多通道移液器加入 96 孔板 A 中，每孔加细胞悬液 100 μ L，在培养箱中继续培养 24 h 以形成半汇合单层，在此培养期间确保细胞恢复、贴附至指数增长。并在倒置显微镜下检查每个孔，确保 96 孔板各孔细胞增长相对相等。

6.3 样品暴露

24 h 后，在 96 孔板 B 中将一系列不同浓度的样品、阴性对照、阳性对照用细胞完全培养基稀释 200 倍（DMSO 的体积占比小于 0.5%），并混匀，配制成备用暴露液。然后，用多孔道移液器将 96 孔板 A 中的旧培养基吸出，换上 96 孔板 B 中相应的暴露液，每孔 100 μ L。在细胞培养箱中培养 24 h。

6.4 中性红检测

检测步骤参考“GB/T 16886.5-2017 医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验 附录 A 中性红摄取细胞毒性试验”，从细胞培养箱中取出暴露培养 24 h 的 96 孔板 A，并按照 GB/T 16886.5-2017 附录 A2.3.6 方法，在显微镜下检查每个孔板，判断细胞接种系统误差和对照与试验组细胞的生长特性。记录试验样品细胞毒性作用导致的细胞形态学方面的改变，但这些记录不用于最高允许剂量的计算或任何其他细胞毒性的定量测定。对照细胞的不良生长特性可表明实验误差，并且可能会由此放弃该实验。

可以继续试验的孔板，则将暴露液弃去，加入预温的 100 μ L PBS（4.7）轻柔冲洗细胞一次。每孔加入 100 μ L 中性红培养基（4.9），放入细胞培养箱孵育 3 h。

孵育后，将 96 孔 A 内溶液弃掉，用 100 μ L PBS（4.7）轻柔迅速冲洗细胞一次。弃掉预冲洗液后，在每孔中加入 150 μ L 中性红解吸附液（4.11）以析出染色，在微孔板振荡器上用 900 rpm 震荡 10 min，以使中性红从细胞内提取出来形成均匀溶液。

将 96 孔板 A 放入酶标仪，在 540 nm 下测量吸光度，记为 OD₅₄₀。

7 结果计算与表示

$$SR (\%) = \frac{OD_{540,s} - OD_{540,b}}{OD_{540,DMSO} - OD_{540,b}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

细胞存活率 (SR) 按照公式 (1) 进行计算,

式中:

SR ——细胞存活率 (Survival Rate);

*OD*_{540,b} ——空白对照在 540 nm 下吸光度;

*OD*_{540,s} ——样品在 540 nm 下吸光度;

*OD*_{540,DMSO} ——阴性对照在 540 nm 下吸光度;

将细胞存活率 *SR* (%) 对受试样品浓度作图, 计算 *IC*₅₀ 和置信限, 也可使用其他合适的方法。可参考国标 GB/T 16886.5-2017 附录 A2.4。

8 质量保证和质量控制

参考总则第 6 节规定的内容进行。阳性化合物推荐使用苯酚, 或者是其他具有明显细胞毒性的化合物。根据中性红摄取法细胞毒性测试阳性对照化合物苯酚的实验室历史数据, 分别得出苯酚对 CHO-K1 细胞的 *IC*₅₀ 范围可供参考, 建议对照试验结果符合如下要求, 结果方为有效, 否则应查明原因后重新进行试验: *IC*₅₀ = 421.71±58.65 mg/L。

附录 A

(资料性)

CHO-K1 细胞复苏、培养、冻存方法

A.1 细胞复苏

将保存于液氮罐中的细胞冻存管取出立即置于预先准备好的 37 °C 温水中水浴解冻，避免从管口缝隙进水。解冻后于无菌操作台中打开冻存管，吸出冻存液至 50 mL 离心管中，以 2 min 10 ml 的速率滴加 10 mL 完全培养基，先慢后快，一般 10% DMSO 的冻存液应 20 倍稀释。

移液管吸取 5 ml 稀释后的细胞液至 25 cm² 细胞培养瓶中，放入二氧化碳培养箱培养 24 h 左右，细胞贴壁后进行换液，更换为新的完全培养基，避免培养液中的低浓度 DMSO 对细胞产生影响。

A.2 细胞传代

1) 细胞培养期间每 2 天进行一次换液，细胞汇合率达到 80% 左右进行传代，或接种到 96 孔板中用于测试。及时观察细胞状态是否健康，若有异常则需要检查原因终止实验。

2) 细胞汇合率达到 80% 后，将 1-2 mL 预温的 PBS 加入培养瓶中轻柔冲洗一下，再去除预洗液。

3) 加入 -4 °C 胰蛋白酶 (1-2 mL)，确保胰蛋白酶完全覆盖细胞层，静置 15s。随后立起培养瓶，确保单层细胞未脱落，然后吸走大部分胰酶，只留数滴。

4) 将培养瓶在 37 °C 的细胞培养箱中孵育 1~3 min，注意不要消化时间过长，也不要再在细胞尚未消化好时强制将细胞吹下来。以显微镜下观察细胞形状变圆，细胞间出现空隙为准。

5) 加入培养液 3 mL，反复以吸管吹打培养细胞面以分散细胞使细胞脱落，制备成细胞悬液

6) 用血球计数板计数，细胞浓度应至少保证大于 5×10^5 /ml。

7) 细胞悬液经过稀释后接种浓度应在 4×10^4 /ml~ 1×10^5 /ml 之间，理想情况下，在相同的接种浓度下，传代间隔亦相同，可以通过控制传代比例来保证较为理想的传代间隔时间。

A.3 细胞计数

1) 准备血球计数板：用 70% 的乙醇清洗计数板表面，注意不要划伤半银层。在盖玻片的边缘沾水，然后将盖玻片压倒计数板的凹槽和半银的计数区域上。当出现干扰图像（“牛顿环”）时，说明盖玻片已被正确放置，计数小室的深度也已经被确定。

2) 用移液器混合细胞悬液后，立即吸取 10 μ l 样品移到血细胞计数板小室的边缘，一次性缓慢挤出细胞悬液（避免溢出），利用毛细作用使之充满计数板和盖玻片的空隙。小室内的液体以液体刚好流到计数板凹槽的边缘为准。完成后，再将计数板的另外一个小室也用细胞悬液充满。显微镜下观察细胞数量：

a. 当 1 mm² 范围内，细胞数 ≤ 50 个时，需要重新制备细胞悬液；

b.当 1 mm^2 范围内，细胞数 >50 个， ≤ 100 个时，计数血球计数板对角线上最外的 4 个 4×4 小格的 1 mm^2 视野中所有细胞，每 ml 细胞悬液的细胞数 $c=n/4\times 10^4$ ；

c.当 1 mm^2 范围内，细胞数 >100 个， ≤ 1000 个时，计数血球计数板最中间全由三线边界构成的 5×5 小格的 1 mm^2 视野所有细胞，每 ml 细胞悬液的细胞数 $c=n\times 10^4$ ；

d.当 1 mm^2 范围内，细胞数 >1000 个时，计数血球计数板最中间最中间全由三线边界构成的 5×5 小格的 1 mm^2 视野中对角线上 5 个小方格内的细胞，每 ml 细胞悬液的细胞数 $c=n\times 10^4$ 。

A.4 细胞冻存

按标准方法进行细胞消化，制备单细胞悬液， 25 cm^2 细胞培养瓶 80%覆盖率时，消化后配制成 1 mL 细胞浓缩悬液，然后再配制成细胞冻存液（各成分比例为 20%FBS、10%DMSO、70%培养基）。冻存密度约为 $5\sim 10\times 10^6/\text{ml}$ 。将 1 毫升细胞冻存液转移至冻存管中（冻存管需标记细胞名称、实验人员、冻存时间、细胞密度、冻存液体积）。然后迅速按如下两种方式进行冻存：

a.在 -4°C 冰箱放置 30 min，再在 -20°C 冰箱放置 30~60 min（勿超过 1 h），转移至 -80°C 冰箱过夜，最后转移至液氮罐中；

b.采用细胞冻存盒，使用前冻存盒需要在室温下放置，确认其中的异丙醇在常温状态下，异丙醇冻存 5 次后就需要更换。将细胞冻存管放入冻存盒中，直接平放于 -80°C 冰箱过夜，第二天转移至液氮罐中。

ICS xx.xx.xx
Pxx

团 体 标 准

T/CUWA 6005X—202X

饮用水毒性检测技术标准 第 3 部分 饮用水 类/抗雌激素受体干 扰物的测定 重组人 α -雌激素受体 (h-ER) 基因双杂交酵母法

Technique Standards for Toxicity Detection of Drinking Water
Part 3 Drinking water—Detection of (anti-) estrogen receptor disruptors —
—Two-hybrid recombinant h-ER gene yeast assay

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国城镇供水排水协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 适用范围.....	1
2 方法原理.....	1
3 试剂与材料.....	2
4 样品采集与前处理.....	3
5 分析步骤.....	3
5.1 酵母菌的保存和复苏培养.....	3
5.2 酵母菌悬液的制备.....	3
5.3 类雌激素效应测定暴露方法.....	4
5.4 抗雌激素效应测定暴露方法.....	4
5.5 β -半乳糖苷酶的酶活测定.....	4
6 结果计算与表示.....	4
6.1 β -半乳糖苷酶的酶活性计算.....	4
6.2 诱导率 IR 计算.....	5
6.3 阳性结果判断.....	5
6.4 雌二醇当量 (EQ _{E2}) 计算.....	5
6.5 他莫昔芬当量 (EQ _{OHT}) 计算.....	5
7 质量保证和质量控制.....	6
附 录 A.....	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能直接或间接涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任，对所涉专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

本标准可能涉及必不可少的专利，编制单位承诺已确保专利权人或者专利申请人同意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该标准时实施其专利。

本标准由中国城镇供水排水协会标准化工作委员会归口。

本标准主编单位：XXXX

本标准参编单位：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要起草人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要审查人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

饮用水毒性检测技术标准

第3部分 饮用水类/抗雌激素受体干扰物的测定

重组人 α -雌激素受体(h-ER)基因双杂交酵母法

1 适用范围

本标准规定了饮用水中类/抗雌激素受体干扰物效应的检测技术——重组人 α -雌激素受体(h-ER)基因双杂交酵母测试方法，包括试剂材料、样品前处理、分析步骤、结果计算与表示、质量保证与质量控制等基本步骤和方法。

本文件适用于由有机污染物引起的饮用水类雌激素受体干扰效应和抗雌激素受体干扰效应的测定。

测定浓度范围：各种饮用水样品均可经过浓缩进行测定。本文件提供的方法样品检出限为：12.77 ng E₂ /L，该数值是本测试阳性化合物雌二醇（E₂）诱导效应标准曲线的 EC₁₀ 浓度，也相当于最低可见效应浓度（LOEC）。

2 方法原理

重组人 α -雌激素受体基因双杂交酵母试验基于现代配体-受体相互作用理论，检测重组人 α -雌激素受体基因双杂交酵母产生 β -半乳糖苷酶的变化，用于评价受试样品中类雌激素物质对酵母细胞的报告基因表达产生 β -半乳糖苷酶可能产生的影响，以表明受试样品的类雌激素或抗雌激素效应。

包括雌激素在内的天然激素和配体可与细胞核内其受体的配体结合域（ligand-binding domain, LBD）相互作用，形成配体—受体复合物并发生构象改变；此复合物进一步结合共激活因子，从而导致下游报告基因的转录和激活，发挥激素效应。根据此配体—受体—共激活因子的作用机制，当有雌激素和类雌激素存在于重组人 α -雌激素受体基因双杂交酵母细胞中时，雌激素-ER 复合物和共激活因子相互作用，使结合了 ER-LBD 的 GAL4 基因蛋白的 DNA 结合域（GAL4 DNA-BD）和结合了共激活因子的 GAL4 基因蛋白转录激活结构域（GAL4 DNA-AD）在空间上相互接近，启动下游报告基因 *Lac-Z* 基因表达出产物 β -半乳糖苷酶。而雌激素和类雌激素不存在时，GAL4 DNA-BD 和 GAL4 DNA-AD 蛋白不能在空间上接近，报告基因无法表达。因此，通过测定表达产物酶活性，就可定量表示受试样

品的类雌激素效应。在受试样品与阳性物质共暴露的情况下，测试阳性物质诱导的产物酶活性受样品抑制的下降程度，就可定量表示受试样品的抗雌激素效应。

3 试剂与材料

3.1 试验菌种

重组人 α -雌激素受体基因双杂交酵母：转化雌激素受体（ER）配体结合域和共激活因子的 Y187 酵母菌株。

3.2 二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide, DMSO）：农残级。

3.3 SD/-Trp/-Leu 培养基：酵母培养采用 SD/-Trp/-Leu 培养基，即缺少色氨酸和亮氨酸的双缺 SD 培养基，具体配制方法见附录 A。

3.4 基础缓冲液：取 21.51 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、6.22 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.75 g KCl 和 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 定容于 1 L 超纯水，充分溶解，4 °C 保存。

3.5 十二烷基磺酸钠（SDS）溶液：称取 0.1 g SDS 加入 100 mL 超纯水中使其溶解，4 °C 保存。

3.6 β -巯基乙醇。

3.7 测试缓冲液：每 100 mL 基础缓冲液（3.4）中加入 3.33 mL SDS 溶液（3.5）和 270 μL β -巯基乙醇（3.6），现用现配。

3.8 17 β -雌二醇（ E_2 ）储备液：称量 27.38 mg 17 β -雌二醇加到 10 mL 容量瓶中，用 DMSO 溶解定容至刻度，配成浓度为 1×10^{-2} mol/L 的母液，分装到 2 mL 棕色样品瓶中，-20 °C 保存。

3.9 17 β -雌二醇（ E_2 ）阳性对照使用液：将 E_2 储备溶液（3.8）用 DMSO 浓度梯度稀释至 4×10^{-8} mol/L，于 -20 °C 保存。

3.10 4-羟基他莫昔芬（4-OHT）储备液：称量 38.75 mg 4-羟基他莫昔芬加到 10 mL 容量瓶中，用 DMSO 溶解定容至刻度，配成浓度为 1×10^{-2} mol/L 的母液，分装到 2 mL 棕色样品瓶中，-20 °C 保存。

3.11 4-羟基他莫昔芬（4-OHT）阳性对照使用液：将 4-OHT 储备溶液（3.10）用 DMSO 10 倍稀释至浓度为 1×10^{-3} mol/L，作为抗雌激素效应阳性对照，-20 °C 保存。

3.12 邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷（ONPG）溶液：将 20 mg ONPG 溶于 5 mL 基础缓冲液中，现用现配。

3.13 碳酸钠溶液：称取 10.6 g 碳酸钠加蒸馏水稀释至 100 mL，4 °C 保存。

- 3.14 丙三醇溶液：取 85 mL 丙三醇加入 15 mL 超纯水，配成体积分数 85% 的丙三醇溶液，121 °C、20 min 灭菌，4 °C 保存。
- 3.15 甲基叔丁基醚、甲醇、三氯甲烷：色谱级。
- 3.16 离心管：1.5 mL。
- 3.17 96 孔板：无菌，透明，底部耐腐蚀。
- 3.18 微孔滤膜：玻璃纤维滤膜， ϕ 142 mm，孔径 0.8 μ m ~1.2 μ m，450 °C 烘烤 3 h。
- 3.19 固相萃取柱：Kinesisi Telos ENV (200 mg, 6 cc) 固相萃取柱，填料为苯乙烯-二乙烯苯共聚物。
- 3.20 K-D 浓缩管
- 3.21 采样瓶：棕色玻璃磨口瓶，铬酸洗液过夜浸泡，用自来水和超纯水洗净，烘干冷却至室温。
- 3.22 锥形瓶、烧杯、量筒等常用玻璃器皿。

注 1：本方法所使用试剂除另有说明外，均应为符合国家标准的分析纯试剂。实验用水为超纯水。

注 2：所用玻璃仪器均以 10% 的稀硝酸浸泡过夜，再以重铬酸钾洗液润洗浸泡 20 min 以上，分别用自来水、蒸馏水冲洗干净，在烘箱中 110 °C 烘干。

4 样品采集与前处理

用于饮用水细胞毒性测试的样品采集与前处理按照总则中第 5 节规定的步骤进行。其中固相萃取柱采用 Kinesisi Telos ENV 柱 (200 mg, 6 cc)，洗脱剂采用甲醇分两次 (6 mL、6 mL) 进行洗脱，其余步骤相同。

5 分析步骤

5.1 酵母菌的保存和复苏培养

复苏时，将低温冻存的酵母菌株 37 °C 快速溶解后，3000 rpm 离心 1 min，弃上清，将菌体接种到 15 ml SD/-Trp/-Leu 培养基 (3.3) 中，置于 150 rpm、30 °C 恒温 96 孔平板摇床中培养 24 小时。以 SD/-Trp/-Leu 培养基为空白，测定稀释十倍培养液在 600 nm 的吸光度 (记为 OD₆₀₀)，读数必须处于 0.15~0.5 之间。

冻存时，用 SD 培养液调整酵母原液光密度到 0.75，再加入 15% 的丙三醇溶液 (3.14)，以 1 ml 分装于 1.5 mL 离心管，保存于 -80 °C 或 -196 °C 液氮中。

5.2 酵母菌悬液的制备

取培养 24 h 的酵母菌液，用 SD/-Trp/-Leu 培养基稀释，调节菌密度使其 OD₆₀₀ 值位于 0.2~0.8 之间（常用 0.75）。

5.3 类雌激素效应测定暴露方法

将待测水样样品、DMSO 溶剂对照样品、E₂ 阳性对照样品（3.9）分别与酵母悬液混合配制成溶剂 DMSO 浓度在 0.5% 以下的暴露液，即稀释 200 倍，将以上溶液各 200 μL 依次转移到 96 孔板中，宜不少于 3 个平行，置于恒温平板摇床上于 800 rpm，30 °C 振荡培养 4 h。

5.4 抗雌激素效应测定暴露方法

将待测水样样品、4-OHT 阳性对照样品（3.11）分别与酵母悬液及一定浓度的 E₂ 阳性样品（终浓度为最高活性对应的暴露浓度，参考值为 2.5×10^{-10} mol/L）混合配制成溶剂 DMSO 浓度在 0.5% 以下的暴露液，即稀释 200 倍。E₂ 阳性对照、DMSO 溶剂对照样品分别仅与酵母悬液混合配制成溶剂 DMSO 浓度在 0.5% 以下的暴露液。将以上溶液各 200 μL 依次转移到 96 孔板中，宜不少于 3 个平行，置于恒温平板摇床上于 800 rpm，30 °C 振荡培养 4 h。

5.5 β-半乳糖苷酶的酶活测定

培养结束后首先取出 150 μL 测定 OD₆₀₀，注意酵母菌是否有沉淀，若有，则应混匀后再测。

将测完 OD₆₀₀ 的菌液吸出 50 μL 到 96 孔板 B 中，加入 120 μL 测试缓冲液（3.7）和 20 μL 三氯甲烷（3.15），在 30 °C 的恒温平板摇床上 1300 rpm 破碎细胞 10 min。

再加入 40 μL ONPG 溶液（3.12）启动酶反应，30 °C 800 rpm 下振荡 60 min。

加入 100 μL 碳酸钠溶液（3.13）终止反应，30 °C 300 rpm 振荡 10 min。

取上清液 200 μL 至 96 孔板 C 中，置于酶标仪中测 OD₄₂₀ 值，计算 β-半乳糖苷酶的酶活性。

6 结果计算与表示

6.1 β-半乳糖苷酶的酶活性计算

$$U = \frac{OD_{420,s} - OD_{420,b}}{t \times V \times OD_{600}} \times D \dots\dots\dots (1)$$

β-半乳糖苷酶的酶活性按照公式（1）进行计算，

式中：

U ——β-半乳糖苷酶诱导活性；

*OD*_{420,s} ——样品在 420 nm 下吸光度；

$OD_{420,b}$ ——空白对照在 420 nm 下吸光度;

OD_{600} ——600 nm 下吸光度;

t ——酶反应时间, 即 60 min;

V ——测试时取的反应液的体积, 0.2 mL;

D ——反应菌液的稀释倍数, 6.6。

6.2 诱导率 IR 计算

为了消除不同实验批次酵母数量、状态不同的影响, 需要计算样品相对于阳性对照的诱导率 (induction ratio, IR), 再以暴露浓度对诱导率作图得到剂量-效应曲线, 诱导率计算方法见公式 (2)。

$$IR (\%) = (U_s - U_D) / (U_p - U_D) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

IR ——相对诱导率 (%);

U_D ——阴性对照样品诱导产生的 β -半乳糖苷酶活性;

U_s ——测试样品诱导产生的 β -半乳糖苷酶活性;

U_p —— E_2 阳性对照诱导产生的最大 β -半乳糖苷酶活性。

6.3 阳性结果判断

酶活性值随着受试样品浓度增大而增加, 在酵母存活率接近 100% 的前提下, 宜有一个以上浓度处理下的酶活性值大于由阳性对照酶活性值的 10% ($U > 0.1U_{\max}$), 判断为样品呈阳性。

6.4 雌二醇当量 (EQ_{E_2}) 计算

$$EQ_{E_2} = EC_{10,E_2} \times REC_{10,样品} \dots\dots\dots (3)$$

样品的雌激素诱导效应即类雌激素效应通常以相当于标准诱导剂雌二醇的当量来表示, 雌二醇当量计算方法见公式 (3), 式中:

EQ_{E_2} ——受试样品的诱导效应相当于雌二醇的诱导效应的值;

EC_{10,E_2} ——阳性物质 E_2 的 β -半乳糖苷酶活性 (U 值) 对暴露浓度作图, logistic 拟合得到 E_2 产生 10% 效应时的浓度 EC_{10} ;

$REC_{10,样品}$ ——受试样品的诱导效应与 E_2 的最大诱导效应的百分比 (%) 对样品暴露浓度 (稀释倍数) 作图, logistic 拟合, 根据剂量效应曲线推出样品诱导效应为 E_2 最大诱导效应的 10% 时的浓度 REC_{10} (稀释倍数)。

6.5 他莫昔芬当量 (EQ_{OHT}) 计算

$$EQ_{OHT} = EC_{10,OHT} \times REC_{10,样品} \dots\dots\dots (4)$$

样品的雌激素抑制效应即抗雌激素效应通常以标准抑制剂他莫昔芬的当量的大小来表示，他莫昔芬当量当量（EQ_{OHT}）计算方法见公式（4），

式中：

$EC_{10,OHT}$ ——阳性物质 4-OHT 与 E₂ 共暴露的 β -半乳糖苷酶活性（U 值）对暴露浓度作图，logistic 拟合得到 4-OHT 产生 10% 抑制效应时的浓度 EC₁₀；

$REC_{10,样品}$ ——受试样品的抑制效应与 4-OHT 的最大抑制效应的百分比（%）对样品暴露浓度（稀释倍数）作图，logistic 拟合，据剂量效应曲线推出样品抑制效应为 OHT 最大抑制效应的 10% 时的浓度（稀释倍数）。

7 质量保证和质量控制

参考总则第 6 节规定的内容进行。根据诱导效应阳性对照 E₂ 标准曲线的实验室历史数据，得出阳性对照物质的 EC₅₀ 范围可供参考，建议对照试验结果符合如下要求，结果方为有效，否则应查明原因后重新进行试验：E₂ 的 EC₅₀ 平均值 = 23.87 ± 4.34 ng/L。

附 录 A

(资料性)

SD/-Trp/-Leu 培养基

培养重组人雌激素双杂交酵母宜选用 SD/-Trp/-Leu 培养基，配制方法见下表。

营养成分	CAS	储备液中的质量浓度 (g/L)	取用体积/mL	最终定容体积/mL
储备液 1: 氨基酸溶液				1000
L-精氨酸盐酸盐	1119-34-2	0.2	100	
L-组氨酸盐酸盐	1007-42-7	0.2		
L-异亮氨酸盐酸盐	17694-98-3	0.3		
L-赖氨酸盐酸盐	657-27-2	0.2		
甲硫氨酸	59-51-8	0.2		
苯丙氨酸	673-31-4	0.5		
苏氨酸	72-19-5	2		
酪氨酸	60-18-4	0.3		
尿嘧啶	66-22-8	0.2		
缬氨酸	7004-3-7	1.5		
储备液 2: 硫酸腺嘌呤溶液				
硫酸腺嘌呤	321-30-2	20	15	
储备液 3: 葡萄糖溶液				
葡萄糖	58367-01-4	400	50	1000
储备液 3: 酵母氮碱溶液				
酵母氮碱	/	33.5	200	

ICS xx.xx.xx
Pxx

团 体 标 准

T/CUWA 6005X—202X

饮用水毒性检测技术标准 第 4 部分 饮用水 DNA 损伤效应的测定 SOS/umu 法

Technique Standards for Toxicity Detection of Drinking Water
Part 4 Drinking water —— Detection of DNA damage effect ——SOS/umu assay

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国城镇供水排水协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 适用范围	1
2 规范性引用文件.....	1
3 方法原理	1
4 试剂与材料.....	2
5 样品采集与前处理.....	3
6 分析步骤	4
6.1 鼠伤寒沙门氏菌前培养.....	4
6.3 受试物质暴露过程.....	4
6.4 β -半乳糖苷酶的酶活测定	4
7 结果计算与表示.....	4
7.1 β -半乳糖苷酶的酶活计算	4
7.2 诱导率 IR 计算.....	4
7.3 阳性结果判断.....	5
7.4 4-NQO 当量 (TEQ _{4-NQO}) 计算.....	5
8 质量保证和质量控制.....	5

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能直接或间接涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任，对所涉专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

本标准可能涉及必不可少的专利，编制单位承诺已确保专利权人或者专利申请人同意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该标准时实施其专利。

本标准由中国城镇供水排水协会标准化工作委员会归口。

本标准主编单位：XXXX

本标准参编单位：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要起草人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

本标准主要审查人员：XXX、XXX、XXX、XXX。

饮用水毒性检测技术标准

第 4 部分 饮用水 DNA 损伤效应的测定 SOS/*umu* 法

1 适用范围

本标准规定了饮用水中 DNA 损伤效应的检测技术——SOS/*umu* 测试方法，包括试剂材料、样品前处理、分析步骤、结果计算与表示、质量保证与质量控制等基本步骤和方法。

本标准适用于由有机污染物引起的饮用水体外遗传毒性效应的测定。

离体生物测试需要的浓度范围：各种饮用水样品均可以经过浓缩进行测定。本文件提供的待测样品检出限为：1.95 μg 4-NQO/L（离体测试的暴露浓度），该数值是本测试阳性化合物 4-硝基喹啉-1-氧化物（4-NQO）标准曲线的最低可见效应浓度（LOEC）。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件或其中的条款。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）适用于本标准。

ISO 13829-2000 Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *umu*-test.

3 方法原理

SOS/*umu* 试验用于评价受试样品对鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA1535/pSK 1002 的 DNA 可能产生的影响，以表明受试样品的 DNA 损伤效应。

SOS/*umu* 试验是基于 DNA 损伤物诱导 SOS 反应而表达 *UmuC* 基因的能力，在鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* TA 1535 中导入携带 *UmuC-LacZ* 嵌合体的特异性质粒 pSK1002，该质粒携带 *umu* 操纵子、*umuD* 基因和 *UmuC-LacZ* 融合基因的启动子及四环素和氯霉素耐药基因，新构建的细菌称为 *S. typhimurium* TA 1535/pSK 1002。*UmuC* 基因在正常情况下被 *LexA* 基因产物——阻遏蛋白所封闭，一旦受试物使细菌的 DNA 受损，细菌即产生 SOS 反应，菌体 *RecA* 基因产物被激活，成为具有活性的蛋白水解酶，此酶可切除阻遏蛋白，使受封闭的 *UmuC* 操纵子启动，并带动 *UmuC-LacZ* 融合基因转录、翻译，表达出有 β -半乳

糖苷酶活性的融合蛋白。通过检测该酶被诱导的活性，即可判断受试物引起 DNA 损伤的程度，若加入大鼠肝微粒体酶（S9）混合，则可以检测受试样品是否经代谢活化生成损害 DNA 的产物。

4 试剂与材料

4.1 实验菌株：鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA1535/pSK 1002，由 SOS/umu 方法创建人日本 Oda Yoshimitsu 教授提供。菌株的冻存液配制与保存方法按照国际标准 ISO 13829-2000 Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test 5.1.2 节。

4.2 二甲基亚砜（DMSO）：农残级。

4.3 氨苄青霉素储备液：25 mg/mL，称取 50 mg 氨苄青霉素加超纯水至 2 mL，过膜除菌后 4 °C 保存备用。

4.4 LB 培养基：称取 20 g Luria-Bertani (L-B) 固体粉末，加入超纯水定容至 1 L，121 °C、20 min 高温灭菌。冷却后，加入 (4.3) 氨苄青霉素使其终浓度为 50 mg/L。

4.5 基础缓冲液：21.51 g Na₂HPO₄·12H₂O、6.22 g NaH₂PO₄·2H₂O、0.75 g KCl 和 0.25 g MgSO₄·7H₂O 定容于 1 L 超纯水，充分溶解，高温高压灭菌后 4 °C 保存。

4.6 十二烷基磺酸钠（SDS）溶液：称取 0.1 g SDS 加入 100 mL 超纯水中使其溶解，2~5 °C 保存。

4.7 β-巯基乙醇。

4.8 测试缓冲液：每 100 mL 基础缓冲液 (4.5) 中加入 3.33 mL SDS 溶液 (4.6) 和 270 μL β-巯基乙醇 (4.7)，4 °C 保存。

4.9 4-硝基喹啉-N-氧化物 (4-NQO) 标准储备溶液：将 4-NQO 用 DMSO (4.2) 溶解配成浓度为 10 mg/mL 的母液，-20 °C 避光保存。

4.10 4-硝基喹啉-N-氧化物 (4-NQO) 标准使用溶液：用 DMSO 将 4-NQO 标准储备溶液 (4.9) 稀释 100 倍为 100 mg/L，作为标准系列浓度的最大浓度，往后依次用 DMSO 半倍稀释 13 个浓度作为 4-NQO 标准使用溶液梯度。暴露液浓度为工作液的 1/100，暴露浓度分别为：1 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、1.25×10⁻¹ mg/L、6.25×10⁻² mg/L、3.12×10⁻² mg/L、1.56×10⁻² mg/L、7.8×10⁻³ mg/L、3.9×10⁻³ mg/L、1.9×10⁻³ mg/L、9.76×10⁻⁴ mg/L、4.88×10⁻⁴ mg/L、2.44×10⁻⁴ mg/L、1.22×10⁻⁴ mg/L。

4.11 4-硝基喹啉-N-氧化物 (4-NQO) 阳性对照溶液：将 4-NQO 标准使用溶液 (4.10) 中 0.5 mg/mL 4-NQO 标准使用溶液用 DMSO 10 倍稀释，得到 5×10⁻⁶ mg/mL 的 4-NQO 溶液

(也可以略高于此浓度, 保证细菌存活率在 50%以上即可), 作为遗传毒性测试阳性对照, -20 °C 保存。

4.12 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 溶液: 将 20 mg ONPG 溶于 5 mL 基础缓冲液 (4.5) 中, 现用现配。

4.13 碳酸钠溶液: 称取 10.6 g 碳酸钠加蒸馏水稀释至 100 mL, 4 °C 保存。

4.14 S9 溶液: 0.2 M 缓冲液 5 mL、0.5M G-6-P 0.1 mL、0.1M NADP 0.4 mL、MgCl₂-KCl 0.2 mL、S9 1mL, 加入 3.3 mL 无菌水, 现用现配。

4.15 三氯甲烷: 色谱级。

4.16 二氯甲烷: 色谱级。

4.17 甲醇: 色谱级。

4.18 离心管: 1.5 mL。

4.19 96 孔板。

4.20 微孔滤膜: 玻璃纤维滤膜, φ142 mm, 孔径 0.8~1.2 μm, 450 °C 烘烤 3 h。

4.21 固相萃取柱: HLB 固相萃取柱 (500 mg, 6 cc), 填料为 N-乙烯吡咯烷酮和亲脂性的二乙烯基苯的聚合物。

4.22 K-D 浓缩管。

4.23 采样瓶: 棕色玻璃磨口瓶, 铬酸洗液过夜浸泡, 用自来水和超纯水洗净, 烘干冷却至室温。

4.24 锥形瓶: 50 mL、100 mL。

4.25 烧杯: 50 mL、100 mL、200 mL。

4.26 量筒: 100 mL、200 mL。

注 1: 本方法所使用试剂除另有说明外, 均应为符合国家标准分析纯试剂。实验用水为超纯水。

注 2: 所用玻璃仪器均以 10% 的稀硝酸浸泡过夜, 再以重铬酸钾洗液润洗浸泡 20 min 以上, 分别用自来水、蒸馏水冲洗干净, 在烘箱中 110 °C 烘干。

5 样品采集与前处理

用于饮用水细胞毒性测试的样品采集与前处理按照总则中第 5 节规定的步骤进行。其中固相萃取柱采用 HLB 柱 (4.21), 洗脱剂采用二氯甲烷/甲醇 (体积比为 9:1) 分两次 (6 mL、6 mL) 进行洗脱, 其余步骤相同。

6 分析步骤

6.1 鼠伤寒沙门氏菌前培养

取 20 mL 37 °C 预热的 LB 培养基（4.4）和适量冻存菌液，调节初始菌密度，使其 595 nm 处的吸光度为 0.0040 至 0.0080 之间，在恒温空气浴振荡摇床中 37 °C、175 rpm 振荡培养 2 h。

6.3 受试物质暴露过程

96 孔板（4.19）A 每孔加入用 DMSO 稀释的样品 2 μL（设置阴性对照、阳性对照、以及待测样品），不需代谢活化时加中菌液 198 μL；需外源活化代谢体系时加菌液和 S9 溶液（4.14）的混合液（比例为 4.8:1）198 μL，恒温 96 孔平板摇床 37 °C、900 rpm 振荡暴露培养 4 h。

6.4 β-半乳糖苷酶的酶活测定

将暴露培养后的菌液 150 μL 于 595 nm 波长下测定吸光度，记为 A_{595} （先测空白板，扣除本底）。取测定完成后的菌液 20 μL 至另一个 96 孔板 B 中，加入 210 μL 测试缓冲液（4.8），5 μL 三氯甲烷（4.15），平板摇床 1000 rpm 振荡。5 min 后加入 40 μL ONPG 溶液（4.12），于 37 °C 800 rpm 条件下振荡反应 20 min。最后，加入 30 μL 碳酸钠溶液（4.13）终止反应。

吸取终止反应后的上清液 150 μL 于 96 孔板 C 中，分别于 420 nm 和 550 nm 波长下测定吸光度（先分别测空白板，扣除本底值），记为 OD_{420} 和 OD_{550} 。

7 结果计算与表示

7.1 β-半乳糖苷酶的酶活计算

$$U = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}}{t \times v \times OD_{595}} \times 1000 \dots \dots \dots (1)$$

β-半乳糖苷酶的酶活性按照公式（1）进行计算，

式中：

U ——β-半乳糖苷酶诱导活性；

OD_{420} ——420 nm 下吸光度；

OD_{550} ——550 nm 下吸光度；

OD_{595} ——595 nm 下吸光度；

v ——反应时菌液的稀释比例，0.0667；

t ——加入反应底物后的反应时间，即 20 min。

7.2 诱导率 IR 计算

为了消除不同实验批次受试菌数量、状态不同的影响，用 U 值与 DMSO 阴性对照相比得到相对诱导率（induction ratio, IR），再以暴露浓度对 IR 作图得到剂量-效应曲线。

$$IR = U_{sample} / U_{control} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

IR——受试物质的诱导率；

U_{sample}——受试样品的 β-半乳糖苷酶诱导活性；

U_{control}——溶剂对照的 β-半乳糖苷酶诱导活性。

7.3 阳性结果判断

为了避免由于急性毒性对细菌的影响带来的假阳性结果，遗传毒性的评价一定要在受试细菌存活率大于 50%的条件下进行。对于化合物，umu 测试的阳性判定标准是：在细菌存活率大于 50%的暴露浓度下，IR 值随着受试样品的浓度的增加而显著性升高，并且至少在一个浓度下 IR 值大于 1.5，说明具有潜在的遗传毒性。

但是对于水样，如果 IR 值与暴露浓度具有剂量效应关系，那么提高样品的浓缩倍数，IR 值一定会大于 1.5，因此，对于水样的 umu 测试阳性结果的判定标准推荐使用如下方式：若 IR 值随着受试水样样品的浓缩倍数的增加而显著性升高，就说明水样中存在潜在的遗传毒性污染物。

7.4 4-NQO 当量 (TEQ_{4-NQO}) 计算

$$TEQ_{4-NQO} = b_{sample} / b_{4-NQO} \dots \dots \dots (3)$$

b_{4-NQO} ——阳性物质（4-NQO）的 IR 值对其暴露浓度（单位：μg/孔）作图，拟合得到直线的斜率；

b_{sample} ——受试样品的 IR 值对水样浓度（单位：L/孔）作图，拟合得到直线的斜率。

8 质量保证和质量控制

参考总则第 6 节规定的内容进行。根据 umu 测试阳性对照 4-NQO 标准曲线的实验室历史数据，分别得出 4-NQO 的 IR_{1.5} 范围可供参考，建议对照试验结果符合如下要求，结果方为有效，否则应查明原因后重新进行试验：IR_{1.5} = 5.83 ± 4.78 μg/L。

