

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 243—2013

单细胞凝胶电泳用于受照人员 剂量估算技术规范

Specification of dose estimation for the radiation victims
in the early stage using single cell gel electrophoresis

2013-03-14 发布

2013-07-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

中 华 人 民 共 和 国
国家职业卫生标准
单细胞凝胶电泳用于受照人员
剂量估算技术规范
GBZ/T 243—2013

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 8 千字
2013 年 4 月第一版 2013 年 4 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-24359 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本标准。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由卫生部放射性疾病诊断标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准起草单位：中国医学科学院放射医学研究所、中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所、山东省医学科学院放射医学研究所。

本标准起草人：刘强、赵欣然、刘青杰、邓大平、姜恩海、杜利清、王彦。

单细胞凝胶电泳用于受照人员 剂量估算技术规范

1 范围

本标准规定了基于单细胞凝胶电泳方法检测电离辐射导致人外周血淋巴细胞脱氧核糖核酸(DNA)损伤的剂量-响应曲线和时间-响应曲线的建立方法。

本标准适用于检测低传能线密度(LET)射线(X或 γ 射线)一次性急性外照射导致的早期(72 h以内)DNA损伤。

本标准不适用于高LET和慢性职业受照人群、非均匀照射和内照射受照人群的生物剂量及事故性受照者远期随访。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

单细胞凝胶电泳 single cell gel electrophoresis

彗星分析 comet assay

在单细胞分子水平上定量分析各种因素导致的细胞DNA残留损伤水平的一种方法。

2.2

Olive尾矩 olive tail moment; OTM

尾部DNA百分含量与头、尾部重心间距离的乘积。

2.3

剂量-响应曲线 dose-response curve

当机体受照后引起的反应与受照剂量存在某种定量关系,可用适当的数学模式表达,可绘制出相应的刻度曲线,用其估算受照剂量。

2.4

时间-响应曲线 time-response curve

机体受照后DNA损伤修复很快启动,残余的DNA损伤与受照剂量之间存在某种时相定量关系,用适当的数学模式表达,以绘制出相应的刻度曲线,估算受照剂量时与剂量-响应曲线结合应用,以减少DNA损伤修复对估算结果的影响。

3 单细胞凝胶电泳方法

3.1 淋巴细胞分离

预先在0.5 mL离心管中加入0.2 mL 4℃预冷的淋巴细胞分离液,0.1 mL外周血沿离心管内壁轻轻加在淋巴细胞分离液面上,3 500 r/min离心2 min,将分离出的灰白色淋巴细胞层转移至2 mL离心管中,加PBS至2 mL,轻摇混匀后1 500 r/min离心6 min,弃上清。重复洗涤细胞2次,将细胞悬于PBS并调整细胞浓度至 2×10^4 /mL,置4℃冰箱,备用。

3.2 铺胶

0.75%正常熔点琼脂糖凝胶直接煮沸,凝固前取 100 μL 迅速(10 s 之内)均匀铺于彗星玻片上,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 1 min 使凝胶固化,取制好的淋巴细胞悬液 25 μL 与 75 μL 0.75%低熔点琼脂糖凝胶混匀后均匀铺于第一层凝胶上面,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固化 1 min。

3.3 裂解和电泳

将凝胶置于新鲜配制的中性裂解液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中裂解 1.5 h。裂解后用双蒸水漂洗去掉多余的盐分,置于提前加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 0.5% Tris-boric-EDTA (TBE) 电泳液的水平电泳仪中静置 20 min,然后在 20 V, 200 mA 电泳条件下电泳 20 min。

3.4 染色和观察

2 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭(EB)染色,双蒸水漂洗,去掉多余染液,在荧光显微镜下采集彗星图像,每份样品采集的细胞数可根据附录 A 提供的公式计算,但每份至少采集 50 个彗星图像,实验至少重复 3 次。

3.5 彗星细胞的选择和彗星细胞率(p)

选择头、尾荧光清晰,无重叠,无杂质干扰的彗星细胞;彗星细胞率为彗星细胞数除以观察细胞总数,以百分数计算。

3.6 DNA 损伤的定量分析

采用彗星分析软件定量分析 DNA 损伤程度,Olive 尾矩定量表示 DNA 损伤水平。

4 剂量-响应曲线的建立

4.1 对供血者要求

男女各选一人,年龄 18 岁~60 岁,无肿瘤病史,无慢性病史,无有毒有害物质接触史,未接受过大剂量的放射诊断、治疗史,不吸烟,不酗酒。

4.2 细胞样品照射条件

包埋于凝胶中的淋巴细胞样品均匀照射,剂量范围 0.1 Gy ~5.0 Gy,剂量点至少 7 个,且分布均匀,低于 0.5 Gy 剂量点应选 2 个~3 个,冰上照射,照后立即进行细胞裂解。

4.3 单细胞凝胶电泳

按照第 3 章的操作规程进行。

4.4 剂量-响应曲线方程的拟合

进行曲线拟合,若呈直线趋势,即用直线模式,见式(1):

$$Y = c + \alpha D \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

Y —— Olive 尾矩值;

c —— 自发 DNA 损伤;

α —— 一次击中导致的 DNA 损伤;

D —— 照射剂量,单位为戈(Gy)。

若呈抛物线趋势,即用二次多项式模式,见式(2):

$$Y=c+\alpha D+\beta D^2 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

Y ——Olive 尾矩值;

c ——自发 DNA 损伤;

α ——一次击中导致的 DNA 损伤;

β ——二次击中导致的 DNA 损伤;

D ——照射剂量,单位为戈(Gy)。

根据回归方程的拟合优度 R^2 和 p 值的大小选择数学模型, p 值 < 0.05 视为模型有统计学意义, R^2 越接近 1 说明该模型的拟合优度越高。

5 时间-响应曲线的建立

5.1 对供血者要求

同 4.1。

5.2 血样照射条件

0.5 mL 抗凝人外周血样品均匀照射,剂量 2.0 Gy,照射温度控制在 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,照后将细胞置于相同温度体外培养。

5.3 培养方法

观察时间 0.5 h~72 h,时间点至少 7 个。照后的全血在无菌条件下接种入 pH 为 6.8~7.2 的含有适量抗生素、胎牛血清的 5 mL Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640 培养体系,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养,培养至相应时间点,取出进行单细胞凝胶电泳。

5.4 时间-响应曲线方程的拟合

进行曲线拟合,若呈直线趋势,即用直线模式,见式(3):

$$Y=c+\alpha T \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

Y ——Olive 尾矩值;

c ——自发 DNA 损伤;

α ——一次击中导致的 DNA 损伤;

T ——照后时间,单位为小时(h)。

若呈抛物线趋势,即用二次多项式模式,见式(4):

$$Y=c+\alpha T+\beta T^2 \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

Y ——Olive 尾矩值;

c ——自发 DNA 损伤;

α ——一次击中导致的 DNA 损伤;

β ——二次击中导致的 DNA 损伤;

T ——照后时间,单位为小时(h)。

根据拟合优度 R^2 和 p 值的大小选择数学模型, p 值 < 0.05 视为模型有统计学意义, R^2 越接近 1 说明该模型的拟合优度越高。

附录 A

(资料性附录)

拟合剂量-响应曲线时观察细胞数的计算

在预实验中观察一定量的细胞数,初步计算照后的彗星细胞率,可以根据二项式分布 95% 置信限公式求出应计数的细胞数,生物学实验一般允许误差采用 15%,见式(A. 1)、式(A. 2)、式(A. 3):

彗星细胞率 95% 置信限为:

$$p \pm 1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \dots\dots\dots (A. 1)$$

令

$$1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} = p \times 15\% \dots\dots\dots (A. 2)$$

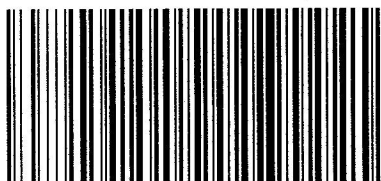
则

$$n = \frac{(1-p) \times 170.74}{p} \dots\dots\dots (A. 3)$$

式中:

p —— 彗星细胞率;

n —— 应观察细胞数。



GBZ/T 243-2013

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 · 2-24359

定价: 14.00 元