

37 ℃、相对湿度 75% 的条件下储存 3 个月后,所含的维生素 C 都会有不同程度的衰减,特别是添加了微量元素铁、钙的保健食品和营养素补充剂,铁离子和钙离子可明显降低保健食品与营养素补充剂中维生素 C 的稳定性,而锌离子对维生素 C 稳定性的影响较小。在检测样品中维生素 C 含量时,选用醋酸溶液作为提取剂比较有利于样品中维生素 C 的稳定,而采用草酸溶液和水作为提取剂时,应在提取后尽快检测,避免因长时间放置造成维生素 C 分解,从而影响检测结果。比较而言,除了影响维生素 C 稳定性的外界因素以外,在各种剂型的保健食品与营养素补充剂中,样品成分及包装是影响维生素 C 稳定性的主要因素。但由于本实验样品数量及时间的限制,以及不清楚样品中的维生素 C 原料是否采用微囊技术等原因,本实验中的一些结果可能有所偏差。

参考文献

- [1] 张冬梅,汪振立,罗六保,等. 对新鲜果蔬中维生素 C 的测定结果影响因素研究[J]. 江西化工,2010(1):73-76.
- [2] 刘海兴,刘凤芹,于爱民,等. 维生素 C 稳定性及其与牛血清白蛋白亲和作用的研究[J]. 分析科学学报,2007,23(1):82-84.
- [3] 牛会芬,张宪志,徐学增. 包材对维生素 C 钠的稳定性影响研究[J]. 河北化工,2007,30(2):19-20.
- [4] 张爽,张华,赵思奇. 维生素 C 稳定性紫外分光光度测定法的建立[J]. 黑龙江医药,2008,21(1):26-27.
- [5] 丁健桦,饶火瑜,王兴祥. HPLC 法初步研究维生素 C 的稳定性[J]. 食品工业,2004,25(1):44-45.
- [6] TAI A, GOHDA E. Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. Chromatography B, 2007, 853: 214-220.
- [7] TORREGROSA F, ESTEVE M J, FRL' GOLA A, et al. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange-carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. [J]. J Food Engineering, 2006,73:339-345.
- [8] OZKAN M, KIRCA A, CEMEROGLU B. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices[J]. Food Chem, 2004(88):591-597.
- [1] 张冬梅,汪振立,罗六保,等. 对新鲜果蔬中维生素 C 的测定

论著

多层电泳槽在彗星试验中的应用

张馨¹,李万湖²,刘玉梅¹,雍凌¹,李宁¹,张文众¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;

2. 山东省肿瘤医院,山东 济南 250017)

摘要:目的 本研究拟通过彗星试验来验证多层电泳槽的实用性,从而推进彗星试验的规范化。方法 从 10 只 SD 大鼠中分别提取淋巴细胞,各制作 6 张彗星试验载玻片,其中每只动物的一半载玻片用 30% H₂O₂ 处理作为阳性组,另一半未处理的作为阴性组;分别用单层电泳和多层电泳开展彗星试验,并分析彗星试验结果。结果 30% H₂O₂ 导致淋巴细胞 DNA 损伤;单层电泳和多层电泳的阳性组相比差异有显著性;多层电泳的不同层之间差异无显著性。结论 彗星试验同时进行电泳比单次电泳更有可比性;多层电泳槽能提高彗星试验单次电泳的样品数量,有利于彗星试验的规范化。

关键词:彗星试验;多层电泳槽;淋巴细胞;DNA 断裂;检测

中图分类号:O648.17;R331.144 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0141-03

Application of multilayer electrophoresis tank in comet assay

Zhang Xin, Li Wanhu, Liu Yumei, Yong Ling, Li Ning, Zhang Wenzhong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective In order to standardize the comet assay, a multilayer electrophoresis tank was invented and

收稿日期:2010-06-17

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:张馨 女 副主任技师 E-mail:zxhang331@yahoo.com.cn

通信作者:张文众 男 副研究员 研究方向为分子毒理学 E-mail:zhangwz2002@sina.com

validated. **Methods** Lymphocytes were extracted from ten SD rats. Ten slides were prepared for the lymphocytes of each rat for comet assay. One half slides were treated with 30% H_2O_2 , and the other untreated slides were used as negative control. Comet assays on single layer-tank or multi-layer tank were used for comparing the assay results. **Results** The DNA of lymphocytes was damaged significantly by 30% H_2O_2 . There were a significant differences of results between single-layer tank and multilayer tank, but no significant differences of results among different layers of multilayer tank.

Conclusion Comparing with the single-layer tank, more samples could be analyzed in multilayer tank, and the comparability of results for comet assay were improved. Multilayer tank would be helpful to standardize comet assays.

Key words: Comet assay; multilayer tank; lymphocyte; DNA break; test

彗星试验(comet assay),又称为单细胞凝胶电泳(SCGE),是一种快速、简便、直观、灵敏的检测单个细胞DNA断裂的技术。彗星试验可用于检测DNA单链或双链的断裂,其方法主要区别在于电泳条件不同,如中性条件主要用于检测双链DNA断裂,而碱性条件主要用于检测单链DNA断裂,而且碱性电泳方法比较敏感,研究表明每 1×10^9 Da中即可检测出0.1个DNA断裂^[1]。紫外线、电离辐射、氧自由基等因素均可造成DNA损伤。因此彗星试验在抗氧化、遗传毒性物质检测、环境辐射检测和分子生物学研究中均被广泛应用。

但是由于彗星试验受电泳设备和电泳时的外界环境因素影响较大,导致不同试验室间、甚至同一试验室不同批次的彗星试验结果缺乏可比性^[2]。同时由于目前彗星试验缺乏专用的设备,导致操作步骤繁琐而无法实现高通量的操作。为了实现和促进彗星试验的规范化,本课题组专门设计了多层电泳槽。本研究主要目的是检验多层电泳槽的实用性,通过大量试验来研究该电泳槽是否有助于解决彗星试验的高通量和电泳条件的规范化。

1 材料与方法

1.1 薄层凝胶多层电泳槽

薄层凝胶多层电泳槽(发明专利公开号:CN101236176A)是一种应用于分子生物学分析的仪器,由北京博乐通生物科技有限公司加工。它由槽体、U型托盘、电泳平板(多层)、限高槽和清洗槽等组成。主要特征是在工作平台的上方加了U型托盘;U型托盘中可以根据研究的需要选择放一层或多层电泳平板,形成多层电泳;限高槽用以约束电泳液,保证每层电泳平板上的液面高度一致;U型托盘有利于多层电泳平板整体操作。这种电泳槽可进行水平方向上的薄层凝胶电泳,用以分析核酸和蛋白等物质,它比其他水平电泳槽有利于薄层电泳的标准化和大样本量操作,具有琼脂糖-DNA电泳,免疫电泳等多种电泳功能。彗星试验试剂盒购自北京博乐通生物科技有限公司。

1.2 实验动物

用4~5周龄SD大鼠10只,每只动物内眦采血,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,每只动物铺设6张载玻片用于彗星试验。每只动物设自身阴性对照组和阳性对照组(用30% H_2O_2 直接处理已经铺好细胞的载玻片10 min)。

1.3 彗星实验

分两次电泳。第一次电泳用20张载玻片在单层平台上电泳,阴性对照和阳性对照各10张;第二次电泳用40张载玻片在多层电泳槽中分上下两层电泳,每层20张载玻片,阴性对照和阳性对照各10张。

电泳槽有效电泳长度为25 cm,每次电泳时液面距载玻片的高度均为3 mm,电泳时间均为20 min。单层电泳的电压25 V,电流300 mA;多层电泳的电压25 V,电流600 mA。碱性单细胞凝胶电泳试验基本参照文献[2]。采用薄层凝胶多层电泳槽,电泳结束琼脂糖凝胶片乙醇脱水干燥保存^[3]。载玻片经gelred染色后荧光显微镜下观察并拍摄照片。结果判定,使用彗星智能分析软件Comet A分析,每个样本各分析50个有核细胞取均数,以彗星长、尾长、尾部DNA含量、Olive尾矩和尾长/头长作为主要分析指标。最后对3组电泳结果统计分析。

1.4 数据分析

采用SPSS 11.5软件计算均数和标准差,并统计分析,方差齐时组间比较用最小显著差法(LSD),方差不齐时组间比较用Games Howell法。

2 结果

2.1 彗星试验电泳结果

经过对单层电泳和双层电泳彗星试验的彗星长、尾长、尾部DNA含量、Olive尾矩和尾长/头长结果统计分析表明,不同电泳阳性组的5项指标均明显高于阴性对照组($P < 0.05$)。双层电泳的下层和上层阴性组比较差异无显著性,下层和上层阳性组比较差异无显著性。单层电泳和双层电泳比较,阴性组间差异无显著性,单层电泳阳性组明显低于双层电泳阳性组($P < 0.05$)。见表1。

表1 单层和双层电泳槽对彗星试验结果的比较

Table 1 Comparing the results of comet assay on single- or double-layer electrophoresis tanks

电泳类型	组别	彗星长 (μm)	尾长 (μm)	Olive 尾矩	尾 DNA (%)	尾长/头长	
双层电泳	下层	阴性组	4.72 \pm 0.51	0.56 \pm 0.27	0.04 \pm 0.03	6.4 \pm 3.7	0.01 \pm 0.01
		阳性组	7.77 \pm 0.46 ^a	3.14 \pm 0.62 ^a	1.29 \pm 0.34 ^a	42.0 \pm 10.9 ^a	0.08 \pm 0.03 ^a
	上层	阴性组	4.49 \pm 0.31	0.55 \pm 0.34	0.05 \pm 0.07	6.4 \pm 5.5	0.01 \pm 0.01
		阳性组	8.13 \pm 0.42 ^a	3.63 \pm 0.48 ^a	1.50 \pm 0.42 ^a	40.7 \pm 6.7 ^a	0.08 \pm 0.02 ^a
单层电泳	阴性组	4.73 \pm 0.49	0.62 \pm 0.27	0.06 \pm 0.04	8.3 \pm 3.4	0.02 \pm 0.01	
	阳性组	8.10 \pm 0.75 ^a	2.86 \pm 0.76 ^a	1.02 \pm 0.52 ^a	33.6 \pm 10.7 ^a	0.06 \pm 0.02 ^{ab}	

注:^a与各自的阴性对照组比较, $P < 0.05$;^b与双层电泳的下层和上层阳性组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 不同层电泳结果的自身对照分析结果

对单层电泳和双层电泳彗星试验的彗星长、尾长、尾部 DNA 含量、Olive 尾矩和尾长/头长自身对照结果进行了比较,双层电泳下层和上层之间的差

值比较差异无显著性;单层的尾长、尾部 DNA 含量和 Olive 尾矩差值明显低于双层电泳的上层($P < 0.05$),单层的尾长/头差值明显低于双层电泳的下层和上层($P < 0.05$)。见表 2。

表2 不同电泳方式的自身对照结果比较

Table 2 Comparing the results of self-control both on double- and single-layer electrophoresis tanks

电泳类型	彗星长 (μm)	尾长 (μm)	Olive 尾矩	尾 DNA (%)	尾长/头长	
双层电泳	下层	3.05 \pm 0.61	2.58 \pm 0.75	1.25 \pm 0.34	35.6 \pm 11.3	0.07 \pm 0.03
	上层	3.64 \pm 0.44	3.08 \pm 0.43	1.45 \pm 0.42	34.3 \pm 8.2	0.07 \pm 0.02
单层电泳		3.37 \pm 0.83	2.24 \pm 0.69 ^a	0.97 \pm 0.51 ^a	25.3 \pm 9.9 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a

注:^a与上层比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

开展彗星试验可以追溯到 20 世纪 80 年代,因为其独特的优势在很多领域得到广泛应用。但是由于彗星试验缺乏专业的设备,很多问题也暴露出来,比如操作过程比较繁琐,操作不慎容易脱片,特别是电泳条件不一致、非同时电泳结果差异较大等问题制约了彗星试验的推广^[4]。因而如何实现彗星试验的标准化也成为了热门课题,并出现彗星试验专用设备的研究报道^[4]。本研究所使用的设备涵盖了彗星试验过程中所涉及到的细胞裂解、解旋、电泳和漂洗等环节所需要的全部配件,操作方便且降低了成本。特别是薄层凝胶多层电泳槽对于统一电泳条件具有重大意义。该电泳槽可以约束电泳液的高度,电泳时无需调整电泳液面即可达到统一电压、统一电流的目的。同时该电泳槽可以根据电泳样品的数量进行一层或多层电泳。国内外尚无同类的装置。

本研究结果表明使用该电泳槽单层电泳和多层电泳的结果既有共性也有区别。其一致性表现为两种电泳方法均检测出阳性组细胞 DNA 损伤明显高于对照组;但是单层电泳和双层电泳的结果相互比较,却存在差异,同时电泳的样品一致性较好,非同时电泳样品结果差异较大。说明对于一项试

验而言,对所有样品同时进行电泳可比性更好。多层电泳槽有助于一次多个样品同时电泳,相关配件齐全,操作简便,最大程度上避免了环境对试验的影响,减少了分次电泳造成的系统误差。我们在工作中多次使用多层电泳槽进行验证,试验结果均一致。

本研究说明在彗星试验中运用薄层凝胶多层电泳槽能实现高通量,方便彗星试验的操作,使用该电泳槽有助于实现彗星试验的规范化,特别是单次试验可以电泳大量样品,从而使试验组间的可比性大大提高。

参考文献

[1] McKELVEY V J, GREEN M, SCHMEZER P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review [J]. Mut Res, 1993, 288: 47-63.

[2] MCART D, McKERR G, HOWARD C, et al. Modelling the comet assay [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37 (4): 914-917.

[3] 张文众, 张晓鹏, 贾旭东, 等. 杏仁对吸烟导致 DNA 氧化损伤的保护作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18 (3): 208-210.

[4] CHUANG Chenghung, HU Miaolin. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay [J]. Mut Res, 2004, 564 (1): 75-82.