

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 ± 1.96√(p(1-p)/n) .....(A.1)

令

1.96√(p(1-p)/n) = p × 15% .....(A.2)

则

n = (1-p) × 170.74 / p .....(A.3)

式中:

p —— 彗星细胞率;

n —— 应观察细胞数。

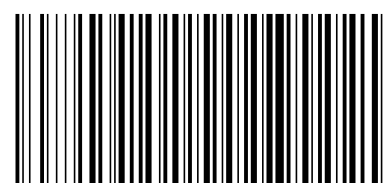


中华人民共和国国家职业卫生标准

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



GBZ/T 243-2013

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·2-24359

定价: 14.00 元

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

若呈抛物线趋势,即用二次多项式模式,见式(2):

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

式中:

- Y —— Olive 尾矩值;
- c —— 自发 DNA 损伤;
- $\alpha$  —— 一次击中导致的 DNA 损伤;
- $\beta$  —— 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):

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

式中:

- Y —— Olive 尾矩值;
- c —— 自发 DNA 损伤;
- $\alpha$  —— 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):

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

式中:

- Y —— Olive 尾矩值;
- c —— 自发 DNA 损伤;
- $\alpha$  —— 一次击中导致的 DNA 损伤;
- $\beta$  —— 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。

### 3.2 铺胶

0.75%正常熔点琼脂糖凝胶直接煮沸,凝固前取 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  与 75  $\mu\text{L}$  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-boracic-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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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;

$\alpha$  —— 一次击中导致的 DNA 损伤;

$D$  —— 照射剂量,单位为戈(Gy)。

## 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。