



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2910.2—2011

---

## 出口辐照食品的鉴别方法 第2部分：单细胞凝胶电泳法

Identification method of irradiated food for export—  
Part 2: Single cell gel electrophoresis

2011-09-09 发布

2012-04-01 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

SN/T 2910《出口辐照食品的鉴别方法》分为 2 部分：

——第 1 部分：电子自旋共振波谱法；

——第 2 部分：单细胞凝胶电泳法。

本部分为 SN/T 2910 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、上海市质量监督检验技术研究院。

本部分主要起草人：杨捷琳、张慧、巢强国、韩丽、刘俊平、王敏、王传现。

## 出口辐照食品的鉴别方法

### 第2部分:单细胞凝胶电泳法

#### 1 范围

SN/T 2910 的本部分规定了含有 DNA 辐照食品的鉴定方法。

本部分适用于含有 DNA 的动物源食品(鸡肉、猪肉等)、植物源食品(种籽、干水果制品和调味品等)的检测。

#### 2 规范性引用文件

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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

#### 3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1

**彗星实验 DNA comet assay**

又称为单细胞凝胶电泳实验,是一种单细胞 DNA 链断裂检测技术。各种因子诱发的细胞 DNA 受损,会引起 DNA 的高级结构变化,DNA 片断将会迁移形成“彗星”状尾部,故称为彗星实验。

##### 3.2

**彗星尾长 DNA tailing**

彗星头部中心到尾部最远端的距离。

##### 3.3

**DNA 百分含量 percentage DNA in tail**

彗星尾部 DNA 量占全部 DNA 量的比例,即尾积分光强度/彗星积分光强度。

##### 3.4

**Olive 尾矩 Olive tail moment**

尾部 DNA 占总 DNA 的百分比(3.3)与头、尾部中心间距的乘积。

#### 4 原理

分离单个细胞后,将细胞固定在琼脂糖薄层中,使用去垢剂使细胞膜破裂,然后在一定电压下电泳,含有 DNA 的细胞经过电离辐射的处理,核酸大分子发生单链断裂或双链断裂,DNA 片断将会迁移形成“彗星”状尾部。辐照过的细胞比未辐照的细胞 DNA 断裂更剧烈,形成更多 DNA 碎片,从细胞核向电泳槽的阳极方向延伸,因此形成的“彗星”会更长、更宽(更多断裂)。未受辐照的细胞会显现出近似环形或者仅仅只有一个很小的尾巴。

## 5 试剂

所有试剂除特殊注明外,均为分析纯,水参照 GB/T 6822。

- 5.1 盐酸:1 mol/L。
- 5.2 二甲亚砜:DMSO。
- 5.3 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS pH 7.4):见 A. 1。
- 5.4 琼脂糖包被溶液:见 A. 2。
- 5.5 制胶溶液:见 A. 3。
- 5.6 EDTA 储存溶液 0.5 mol/L:见 A. 4。
- 5.7 TBE 储存溶液:见 A. 5。
- 5.8 电泳缓冲溶液:见 A. 6。
- 5.9 裂解缓冲溶液:见 A. 7。
- 5.10 固定液:甲醇。
- 5.11 染色液 A:90 mmol/L NaOH 60 mL+25%  $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$  6 mL。
- 5.12 染色液 B:40%(质量浓度) $\text{AgNO}_3$ 。
- 5.13 染色液 C:B 液 2 mL 加入 A 液,振荡至沉淀消失,定容至 100 mL。
- 5.14 显色液:1%(质量浓度)柠檬酸 0.5 mL+37%(质量浓度)甲醛 0.5 mL,定容至 100 mL。
- 5.15 脱色液:甲醇。
- 5.16 终止液:将 10 mL 冰醋酸用水稀释至 1 000 mL。

## 6 仪器

- 6.1 DNA 水平电泳槽。
- 6.2 电源:0 V~100 V,0 mA~400 mA。
- 6.3 秒表。
- 6.4 天平:感量 0.001 g。
- 6.5 水浴锅。
- 6.6 加热磁力搅拌器。
- 6.7 微波炉。
- 6.8 筛布,孔径为 100  $\mu\text{m}$ ,200  $\mu\text{m}$  和 500  $\mu\text{m}$ ,例如尼龙。
- 6.9 载玻片:(76 mm×26 mm)单面磨砂。
- 6.10 盖玻片:(24 mm×60 mm)。
- 6.11 染色缸。
- 6.12 显微镜:普通光学显微镜,放大倍数可达 100×到 400×。

## 7 步骤

### 7.1 单细胞悬浮物的制备

#### 7.1.1 概述

制备的琼脂糖凝胶中分布的细胞应不相互重叠。制备细胞悬液时应保持低温,当加入终浓度为 5%~10%的 DMSO 作为冷冻保护剂时,细胞悬液可在-18℃下保存更长的时间。

## 7.1.2 动物组织

### 7.1.2.1 骨髓

剖开骨头,取 50 mg 骨髓,加入 3 mL 预冷的 PBS。使用玻璃棒搅拌悬浮细胞。将细胞悬浮液用孔径为 100  $\mu\text{m}$  的筛布过滤。使用上清液进行测试。

### 7.1.2.2 肌肉组织

取 1 g 组织(不要脂肪),加入 5 mL 预冷的 PBS,低温下 500 r/min 搅拌 5 min。将细胞悬浮液用孔径为 500  $\mu\text{m}$  和 200  $\mu\text{m}$  的筛布过滤。放置 5 min。使用上清液进行测试。

## 7.1.3 植物组织

### 7.1.3.1 种籽、坚果和调味品

取样品 0.25 g 用研钵研碎,加入 3 mL 预冷 PBS。低温下 500 r/min 搅拌 5 min。将细胞悬浮液用孔径为 200  $\mu\text{m}$  和 100  $\mu\text{m}$  的筛布过滤。放置澄清,使用上清液进行测试。

### 7.1.3.2 草莓

选取饱满的果实,称取大约 0.25 g,按照处理种籽、坚果和调味品的方法进行处理(7.1.3.1)。

### 7.1.3.3 马铃薯

取 4 g 马铃薯果肉,加入 5 mL 预冷的 PBS,按照处理种籽、坚果和调味品的方法进行处理(7.1.3.1)。

### 7.1.3.4 洋葱

取 2 g 马铃薯果肉,加入 4 mL 预冷的 PBS,按照处理种籽、坚果和调味品的方法进行处理(见 7.1.3.1)。

## 7.1.4 对照的制备

每一种新的类别的食物在进行分析之前需要取部分进行梯度辐照,剂量选择一般为样品标示辐照剂量及上升下降各若干梯度,辐照剂量未知时选择 1 kGy、3 kGy、5 kGy、8 kGy、10 kGy 进行辐照。

## 7.2 预包被

在包被前,使用甲醇将载玻片浸泡过夜以去除脂肪,风干。在载玻片上滴一滴(大约 100  $\mu\text{L}$ )温热的琼脂糖包被溶液(5.4),将另一片载玻片与第一片载玻片呈十字交叉,将琼脂糖溶液推成一薄层,风干。

## 7.3 制胶

将 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬浮液与 100  $\mu\text{L}$  温热的制胶溶液(5.5)混合均匀,取 100  $\mu\text{L}$  混合液至预包被的载玻片上,立即盖上盖玻片使胶均匀涂抹开,避免产生气泡。将载玻片放置 5 min,使琼脂糖凝胶凝固。轻轻地使盖玻片移到一旁。

## 7.4 细胞的溶解

将制好的玻片完全浸渍于裂解缓冲液(5.9)中,动物细胞约 5 min,而植物细胞约 15 min。

## 7.5 平衡

将细胞裂解后的玻片浸入电泳缓冲溶液(5.8)中平衡 5 min。

## 7.6 电泳

将玻片(如有多个,并排放置在水平电泳槽中,不要留空隙)放置在电泳槽中,倒入电泳缓冲溶液(5.8),没过玻片大约 2 mm~4 mm。以 2 V/cm 的电压进行电泳,时间约为 8 min~10 min。切断电流后,将玻片小心地从电泳槽中移出,浸入水中 5 min。风干或用干燥箱 40 °C~50 °C 干燥。

## 7.7 银染

### 7.7.1 固定

将玻片浸入固定液(5.10)中固定 20 min 后,水冲洗两次,每次约 1 min。40 °C~50 °C 干燥或室温风干。

### 7.7.2 染色

将玻片浸入染色液 C(5.13)中 30 min,重复此步骤 1 次~2 次,直到玻片显灰棕色。用水冲洗两次。

### 7.7.3 显色

用显色液(5.14)显色 5 min,脱色液(5.15)脱色 7 min~10 min,使用终止液(5.16)终止染色反应并放置 5 min,再用水冲洗 1 min。室温干燥玻片。

## 7.8 观察结果

显微镜观察玻片所看到的图谱是由染色后的细胞和破碎成片段的 DNA 电泳形成的彗星现象。无损伤的细胞会显示出完整的没有尾巴的或者只有少许尾巴,细胞拖尾程度随辐照剂量的增加而增加,参考图谱参见附录 B。测量至少 50 个细胞的彗星参数,包括彗星尾长、DNA 含量百分比,计算 Olive 尾矩,与对样品品的相应参数进行单因素方差分析组间均值比较,也可使用 CASP 或彗星图像分析专用软件 Kinetic Comet 进行测量和分析。

## 8 样品处理

每一种新的类别的食物在进行分析之前都要进行测试,内容包括:单细胞悬液制备、细胞裂解溶液的组成和处理时间长短,除此之外,为了获得足够的 DNA 在凝胶中的移动,电泳时间和电场强度都可根据需要改变。

## 9 结果判定及报告

根据测量样品及对照品获得的彗星尾长、DNA 含量百分比、Olive 尾矩等数据,使用相应参数进行统计学分析,当样品的 Olive 尾矩与对照相比具有统计学差异时( $P < 0.05$ ),判定该样品经过辐照。

附录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS pH 7.4)

将 8.0 g 氯化钠, 0.2 g 氯化钾, 2.94 g 12 水磷酸氢二钠和 0.24 g 磷酸二氢钾溶解于 900 mL 水中, 用少量盐酸(5.1)调节 pH 值到 7.4, 加水至 1 000 mL。溶液应 121 °C 高压灭菌或者无菌过滤。

A.2 琼脂糖包被溶液

0.5% 琼脂糖用蒸馏水配制: 将 50 mg 琼脂糖溶解在 10 mL 水中煮沸或用微波加热(无块状物质、透明溶液)。将溶液保存于 45 °C 水浴中来预包被载玻片。

A.3 制胶溶液

0.8% 琼脂糖用 PBS 配制: 将 80 mg 低熔点琼脂糖溶解于 10 mL PBS(5.3)中, 煮沸或用微波加热, 将溶液保存于 45 °C 水浴中, 以备与细胞悬液混合在载玻片上制胶。

A.4 0.5 mol/L EDTA 储存溶液

将 93.05 g 乙二胺四乙酸二钠盐二水化合物加入 300 mL 蒸馏水中, 搅拌均匀, 用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0。用蒸馏水稀释至 500 mL, 高压灭菌。

A.5 TBE 储存溶液

将 54 g 羟甲基氨基甲烷(Tris base)和 27.5 g 硼酸溶解在 20 mL EDTA 储存溶液(5.6)中, 用蒸馏水稀释至 1 000 mL(TBE)。TBE 储存溶液可存储在玻璃瓶中放置在室温下。使用前观察是否产生沉淀, 有沉淀则弃用。

A.6 电泳缓冲液

将 1 体积 TBE 储存溶液(5.7)稀释于 9 体积水中。如有必要, 调节 pH 值至 8.4。

A.7 裂解缓冲液

裂解缓冲溶液: 200 mL 细胞裂解液配方: NaCl 29.2 g、Na<sub>2</sub>-EDTA 7.45 g、Tris-碱 0.24 g、十二烷基肌氨酸钠 2 g、DMSO 20 mL、Triton X-100 2 mL, pH 值为 10.0。

附 录 B  
(资料性附录)

不同辐照剂量鸡肉的单细胞凝胶电泳图

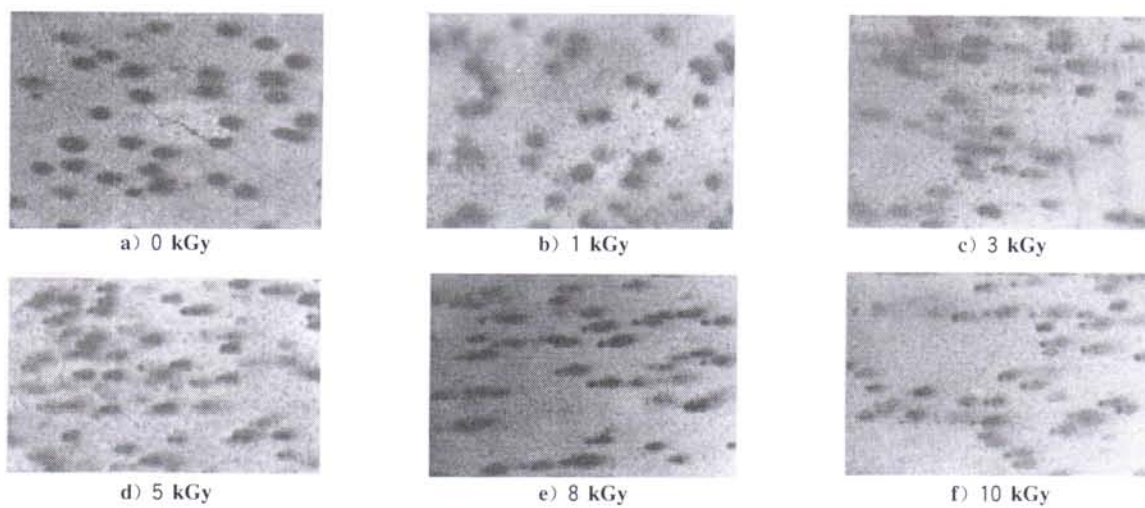


图 B.1 辐照剂量为 0 kGy、1 kGy、3 kGy、5 kGy、8 kGy、10 kGy 时单细胞凝胶电泳图谱