



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808919 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410094987. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 16

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 国家烟草质量监督检验中心

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街 2 号

(72) 发明人 陈欢 刘彤 韩书磊 吴帅宾

付立伟 张小涛 石龙凯 侯宏卫  
胡清源

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

41110

代理人 姜振东

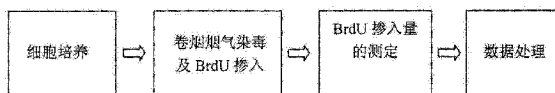
权利要求书2页 说明书5页 附图4页

### (54) 发明名称

一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法

### (57) 摘要

一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入的卷烟烟气细胞增殖毒性评价方法,其特征在于:包括以下步骤:1)溶液的配制,2)细胞接种,3)卷烟烟气染毒及 BrdU 掺入,4) BrdU 掺入量的测定,5)结果与分析。本发明具有以下特点:(1)本发明通过烟气粒相物萃取液和烟气气相物吸收液的制备,可分别考察烟气粒相物、气相物的细胞毒性。(2)通过细胞适用性验证步骤,本发明可能适用于多种贴壁培养细胞,可用于考察卷烟烟气对不同细胞系的细胞增殖毒性。(3)通过 BrdU 掺入时间和细胞膜通透液浓度的优化提高检测灵敏度。(4)并通过卷烟烟气染毒浓度的优化,确定了最佳染毒浓度,以获得最佳剂量效应曲线。此外,本测定方法还具有操作快速简便、灵敏度高、结果稳定的优点。



1. 一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法,其特征在于:该方法是基于 BrdU 掺入原理,通过检测不同浓度卷烟烟气染毒下,细胞 DNA 合成的 BrdU 掺入量,利用 BrdU 抗体对掺入 DNA 的 BrdU 的特异性识别进行检测,进而考察评价卷烟烟气的增殖毒性,具体步骤如下:

1) 溶液的制备:

- (1) 磷酸盐缓冲液 PBS:用磷酸二氢钾和磷酸氢二钠配制(pH=6.7);
- (2) 封闭液:有 PBS 缓冲液配制 1% BSA (质量百分比)作为封闭液;
- (3) HRP 酶标记的 BrdU 抗体: -20 °C 保存,使用封闭液对抗体进行稀释配制;
- (4) 细胞固定液:4% 多聚甲醛或 70% 乙醇;
- (5) 2M 的盐酸 HCl 溶液:使用去离子水配制 2M 的 HCl 溶液;
- (6) 细胞膜通透液:曲拉通 100 (Triton-100),使用 PBS 溶液稀释配制;
- (7) 0.1M 四硼酸钠( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ):用 PBS 溶液配制;
- (8) HRP 酶显色底物:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液;
- (9) 卷烟烟气染毒溶液的制备:包括烟气粒相物萃取液、烟气的相物吸收液;
- (10)细胞培养基:溶剂为 RPMI-1640 培养基,其中胎牛血清的体积百分比为 10%,L-谷氨酰胺的浓度为 2 mM,青霉素的浓度为 100 IU/ml,链霉素的浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ ;

2) 细胞样本的处理:

(1)细胞接种:选用贴壁细胞,向 96 孔板(除最外周 36 个孔)中分别接种含有最佳接种密度细胞个数的 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h;

(2) 卷烟烟气染毒及 BrdU 掺入:细胞培养 24 h 后,吸去培养液,96 孔板(除最外周 36 孔)每列 6 孔为一组分别设置为空白对照组和卷烟烟气染毒组,空白对照组中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  细胞培养基、卷烟烟气染毒组中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  卷烟烟气染毒溶液,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 22 h,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  的 BrdU 染料,继续孵育;

(3) BrdU 掺入量的测定:

a、吸除培养板中的溶液,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 4% 多聚甲醛或 70% 乙醇,于室温下固定 20-30 分钟;

b、吸除溶液后,每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次,每次不少于 10 分钟;

c、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 2MHCl,室温下放置 15 分钟;

d、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次,每次不少于 10 分钟;

e、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  0.1M 四硼酸钠( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ),室温下放置 15 分钟;

f、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次,每次不少于 10 分钟;

g、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 0.1%Triton 100 溶液进行细胞膜通透,反应 1-2min;

h、为减少抗体的非特异性吸附,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 1%BSA 中封闭 1h,

i、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 HRP 酶标记的 BrdU 抗体,4 度过夜;

j、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次,每次不少于 10 分钟;

k、加入 HRP 酶常用 TMB 显色底物进行显色反应,并在 450nm 处检测相应吸光度值;

(4) 数据处理

吸光值 A :A = A<sub>450 nm</sub>

A<sub>空白对照组</sub> = 6 个平行孔的吸光度平均值

$A_{\text{染毒组}} = 6$  个平行孔的吸光度平均值

细胞增殖抑制率(%) =  $1 - A_{\text{染毒组}} / A_{\text{空白对照组}}$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法, 其特征在于: 所述贴壁细胞为中国仓鼠卵巢细胞 CHO、人肺癌细胞 A549 或人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 细胞, CHO 细胞和 A549 细胞的最佳接种密度为 10000 个/孔, BEAS-2B 细胞的最佳接种密度为 20000 个/孔。

3. 根据权利要求 1 所述的基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法, 其特征在于: 开展细胞毒性评价前, 需对所用细胞株的适用性进行评价, 细胞非特异性吸附的吸光度值应小于等于 0.2。

4. 根据权利要求 1 所述的基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法, 其特征在于: 所述卷烟烟气染毒组包括烟气粒相物萃取液染毒和烟气气相物吸收液染毒, 烟气粒相物萃取液染毒和烟气气相物吸收液染毒的细胞增殖毒性浓度的染毒区间应分别包括  $50 \mu\text{g/ml} - 250 \mu\text{g/ml}$  和  $100 \mu\text{g/ml} - 400 \mu\text{g/ml}$  范围。

5. 根据权利要求 1 所述的基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法, 其特征在于: BrdU 掺入后继续孵育 2h。

6. 根据权利要求 1 所述的基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法, 其特征在于: 细胞膜通透液 Triton 100 的浓度为 0.5%。

## 一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及卷烟烟气体外细胞毒性的测定,具体说是基于溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入原理分析卷烟烟气粒相物或气相物染毒后细胞增殖毒性的定量测定方法。

### 背景技术

[0002] 开展体外毒理学实验是评价吸烟对健康危害的重要方法。其中,细胞毒性在包括癌症、炎症等许多病理过程中起到重要作用,细胞毒性试验是了解化合物与细胞和组织之间作用机理的重要途径。如何科学准确地评价卷烟产品以及烟草添加剂的危害性,目前国际上还没有统一的方法和程序。检测细胞毒性可通过多种生物学终点进行,例如通过测定酸性磷酸酶或其他蛋白活性来计算细胞数量、测定细胞代谢活性以及检测细胞膜的完整性等生物学终点进行评价。根据不同检测原理开展细胞毒性评价,可从不同角度揭示卷烟烟气细胞毒性的作用机理。

[0003] 细胞增殖周期包括 G1、S、G2、M 四个时期,其中 S 期是 DNA 合成期。BrdU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷的类似物(其化学结构特点是胸腺嘧啶的碱基嘧啶环上与 5 位 C 原子连接的甲基被溴代替),当细胞处于 DNA 合成期时,BrdU 可通过与胸腺嘧啶竞争,掺入新合成的 DNA 中。掺入到 DNA 的 BrdU 可通过抗 BrdU 抗体的特异性识别进行检测。BrdU 对细胞无明显毒性,可应用于细胞 DNA 合成和细胞增殖的跟踪检测。因此,通过检测细胞样本中的 BrdU 掺入量可考察化合物对细胞增殖的影响,定量评价不同化合物的细胞增殖毒性。

[0004] 目前,进行卷烟烟气细胞毒性评价时采用的方法大多基于细胞存活率测定的原理,考察卷烟烟气染毒对细胞增殖毒性的影响还研究较少,亟需建立基于 BrdU 掺入的卷烟烟气细胞增殖毒性评价方法,定量准确评价卷烟烟气粒相物和的细胞毒性。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的旨在克服现有技术缺陷,并基于 BrdU 掺入原理,建立的一种卷烟烟气体外细胞增殖毒性的测定方法。当细胞处于 DNA 合成期时,BrdU 可通过与胸腺嘧啶竞争,掺入新合成的 DNA 中。掺入到 DNA 的 BrdU 可通过抗 BrdU 抗体的特异性识别进行检测。通过检测细胞样本中的 BrdU 掺入量可考察卷烟烟气的增殖毒性。该测定方法具有检测通量高,灵敏度高,定量准确等优势。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法,是基于 BrdU 掺入原理,通过检测不同浓度卷烟烟气染毒下,细胞 DNA 合成的 BrdU 掺入量,利用 BrdU 抗体对掺入 DNA 的 BrdU 的特异性识别进行检测,进而考察评价卷烟烟气的增殖毒性,具体步骤如下:

1) 溶剂的制备:

(1) 磷酸盐缓冲液 PBS:用磷酸二氢钾和磷酸氢二钠配制(pH=6.7);

- (2) 封闭液 :有 PBS 缓冲液配制 1% BSA (质量百分比) 作为封闭液 ;
- (3) HRP 酶标记的 BrdU 抗体 : -20 °C 保存, 使用封闭液对抗体进行稀释配制 ;
- (4) 细胞固定液 :4% 多聚甲醛或 70% 乙醇 ;
- (5) 2M 的盐酸 HCl 溶液 :使用去离子水配制 2M 的 HCl 溶液 ;
- (6) 细胞膜通透液 :曲拉通 100 (Triton-100), 使用 PBS 溶液稀释配制 ;
- (7) 0. 1M 四硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) :用 PBS 溶液配制 ;
- (8) HRP 酶显色底物 :3, 3'  $\mu$ , 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 ;

(9) 卷烟烟气染毒溶液的制备 :卷烟样品于温度 ( $22 \pm 1$ ) °C 和相对湿度  $60\% \pm 3\%$  条件下平衡 48 h ;然后使用转盘式吸烟机抽吸卷烟, 烟气总粒相物用剑桥滤片收集, 根据烟气总粒相物质量加入相应体积的 DMSO 溶剂, 得到最终浓度为 10 mg/ml 的烟气粒相物萃取液, 使用前在 -70 °C 以下储存 ;在收集烟气总粒相物的同时将气相物通入装有 PBS 溶液的吸收瓶 (冰浴) 中, 粒相物收集完毕后, 将 PBS 吸收液定容至与烟气粒相物萃取液中 DMSO 体积相同, 通过 0. 2  $\mu\text{m}$  的滤膜除菌后, 得到最终浓度与烟气粒相物萃取液相当的烟气的相物吸收液, 且必须在制备后半小时内使用。本发明中卷烟烟气染毒溶液可为烟气粒相物萃取液、烟气的相物吸收液, 分别用于评价卷烟烟气粒相物、气相物成分的细胞毒性。

[0007] (10) 细胞培养基 :溶剂为 RPMI-1640 培养基, 其中胎牛血清的体积百分比为 10%, L- 谷氨酰胺的浓度为 2 mM, 青霉素的浓度为 100 IU/ml, 链霉素的浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0008] 2) 细胞样本的处理 :

(1) 细胞接种 :选用贴壁细胞, 向 96 孔板 (除最外周 36 个孔) 中分别接种含有最佳接种密度细胞个数的 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液, 于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h ;

(2) 卷烟烟气染毒及 BrdU 掺入 :细胞培养 24 h 后, 吸去培养液, 96 孔板 (除最外周 36 孔) 每列 6 孔为一组分别设置为空白对照组和卷烟烟气染毒组, 空白对照组中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  细胞培养基、卷烟烟气染毒组中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  卷烟烟气染毒溶液, 于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 22 h, 每孔加入 10  $\mu\text{l}$  的 BrdU 染料, 继续孵育 2h ;

(3) BrdU 掺入量的测定 :

a、吸除培养板中的溶液, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 4% 多聚甲醛或 70% 乙醇, 于室温下固定 20-30 分钟 ;

b、吸除溶液后, 每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次不少于 10 分钟 ;

c、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 2M HCl, 室温下放置 15 分钟 ;

d、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次不少于 10 分钟 ;

e、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  0. 1M 四硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), 室温下放置 15 分钟 ;

f、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次不少于 10 分钟 ;

g、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 0. 1% Triton 100 溶液进行细胞膜通透, 反应 1-2min ;

h、为减少抗体的非特异性吸附, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 1% BSA 中封闭 1h,

i、每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 HRP 酶标记的 BrdU 抗体, 4 度过夜 ;

j、每孔使用 200  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次不少于 10 分钟 ;

k、加入 HRP 酶常用 TMB 显色底物进行显色反应, 并在 450nm 处检测相应吸光度值。

[0009] (4) 数据处理

吸光值 A :A = A450 nm

$A_{\text{空白对照组}} = 6 \text{ 个平行孔的吸光度平均值}$

$A_{\text{染毒组}} = 6 \text{ 个平行孔的吸光度平均值}$

细胞增殖抑制率(%) =  $1 - A_{\text{染毒组}} / A_{\text{空白对照组}}$ 。

[0010] 在本发明中,所述贴壁细胞为中国仓鼠卵巢细胞 CHO、人肺癌细胞 A549 或人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 细胞。由于不同细胞系的增殖速率不同,对不同种类细胞系的细胞接种密度进行了优化。CHO 细胞和 A549 细胞的最佳接种密度为 10000 个 / 孔, BEAS-2B 细胞的最佳接种密度为 20000 个 / 孔。实验前需开展所用细胞系的非特异性吸附背景测试,判断该细胞系是否可用于基于 BrdU 掺入的细胞增殖毒性评价实验。

[0011] 开展细胞毒性评价前,需对所用细胞株的适用性进行评价,细胞非特异性吸附的吸光度值应小于等于 0.2。评价的具体方法为:向 96 孔板中分别接种最佳接种密度的  $100 \mu\text{l}$  细胞悬液,将细胞培养板放入细胞培养箱中孵育 24 小时。然后按照 BrdU 掺入量的测定步骤进行实验,最后使用酶标仪检测每孔在 450 nm 波长处的吸光值,当吸光度值小于等于 0.2 时,证明细胞对 BrdU 抗体的非特异性吸附较小,可以进行基于 BrdU 掺入的细胞增殖毒性评价实验。若吸光度值高于 0.2 时,证明细胞本身非特异性吸附 BrdU 抗体,会引起较高的检测背景,不适用于基于 BrdU 掺入的细胞增殖毒性评价实验。

[0012] 本发明中,需要使用 BrdU 抗体对细胞中掺入 BrdU 进行特异性识别,由于抗体大分子难以穿透细胞膜,因此需要使用细胞膜通透液提高细胞膜通透程度,对细胞膜通透液的浓度进行了优化。采用  $100 \mu\text{g/ml}$  卷烟样品 1 粒相物萃取液对 CHO 细胞染毒 22h, BrdU 掺入时间 2h,然后在 BrdU 掺入量测定步骤中选择不同浓度的 Triton 100 进行细胞膜通透。如图 2 所知,当通透液浓度低于 0.5% 时,细胞膜通透程度差,影响抗体大分子进入细胞与目标物结合,检测信号较低。当 Triton 100 的浓度高于 0.5% 时,影响了细胞形态,导致检测信号的降低。因此,本发明中选择细胞膜通透液 Triton 100 的浓度为 0.5%。

[0013] 对 BrdU 掺入时间进行优化,如图 3 可知,当 BrdU 掺入时间为 1h 时,细胞中 BrdU 掺入量较少,响应信号较低。当 BrdU 掺入时间为 2h 时,不同染毒浓度下细胞中 BrdU 的掺入量有明显的剂量效应关系。而当 BrdU 掺入时间为 4h 以上时,由于细胞增殖时间较长,不同染毒浓度下细胞中 BrdU 掺入量增加,响应信号均有所提高,但不同染毒浓度间剂量效应关系变差。因此,本发明选择 BrdU 掺入时间为 2h。

[0014] 为得到卷烟烟气细胞增殖毒性的剂量 - 效应曲线,本发明中对卷烟烟气的染毒浓度进行了优化,图 4 所示为 CHO 细胞分别用卷烟样品 1 的烟气粒相物萃取液和烟香气相物吸收液染毒所得到的剂量效应曲线,如图可知,当烟气粒相物萃取液染毒浓度为  $50 \mu\text{g/ml}$  -  $250 \mu\text{g/ml}$  时,烟气粒相物对 CHO 细胞的细胞增殖抑制率由低到高,当烟香气相物吸收液染毒浓度为  $100 \mu\text{g/ml}$  -  $400 \mu\text{g/ml}$  时,卷烟烟气粒相物对 CHO 细胞的细胞增殖抑制率由低到高,有很好的剂量效应关系,因此考察烟气粒相物萃取液和烟香气相物吸收液细胞增殖毒性浓度的染毒区间应分别包括  $50 \mu\text{g/ml}$  -  $250 \mu\text{g/ml}$  和  $100 \mu\text{g/ml}$  -  $400 \mu\text{g/ml}$  范围。

[0015] 本发明建立了一种基于 BrdU 掺入的卷烟烟气细胞增殖毒性评价方法,根据细胞 DNA 合成的 BrdU 掺入量,准确定量评价卷烟烟气的细胞增殖毒性。本发明具有以下特点:(1) 通过烟气粒相物萃取液和烟香气相物吸收液的制备,可分别考察烟气粒相物、气相物的细胞毒性。(2) 通过细胞适用性验证步骤,本发明可能适用于多种贴壁培养细胞,可用于考察卷烟烟气对不同细胞系的细胞毒性。(3) 通过 BrdU 掺入时间和细胞膜通透液浓度的优化

提高检测灵敏度。(4) 并通过卷烟烟气染毒浓度的优化,确定了最佳染毒浓度,以获得最佳剂量效应曲线。此外,本测定方法还具有操作快速简便、灵敏性高、结果稳定的优点。

#### 附图说明

- [0016] 图 1. 本发明分析方法流程图。  
[0017] 图 2. 细胞膜通透液 Triton 100 的浓度优化。  
[0018] 图 3. 不同 BrdU 掺入时间下卷烟烟气细胞毒性的剂量 - 效应关系曲线。  
[0019] 图 4. 烟气染毒溶液浓度优化。  
[0020] 图 5. 卷烟样品 2 粒相物对 A549 细胞增殖毒性的剂量 - 效应关系曲线。

#### 具体实施方式

[0021] 本发明以下结合实施例做进一步描述,但并不是限制本发明。

[0022] 为考察卷烟样品 2 烟气粒相物染毒对 A549 细胞的细胞增殖毒性,开展以下实验:

##### 一、溶液配制

##### (1) 卷烟烟气染毒溶液:

采用转盘式 20H 型吸烟机(德国, Borgwaldt 公司)对卷烟样品进行抽吸,抽吸模式参照 ISO 的要求,用剑桥滤片捕集卷烟的粒相物成分。通过 20 支卷烟的抽吸共捕集到烟气粒相物 182mg,取出剑桥滤片后加入 18.2mL 的二甲亚砜(DMSO),震荡萃取半小时,得到最终浓度为 10 mg/mL 的烟气粒相物萃取液。用细胞培养液稀释,配制一系列不同浓度的烟气染毒溶液。

[0023] (2) 磷酸盐缓冲液 PBS:用磷酸二氢钾和磷酸氢二钠配制(pH=6.7)。

[0024] (3) 封闭液:有 PBS 缓冲液配制 1% BSA(质量百分比)作为封闭液。

[0025] (4) HRP 酶标记的 BrdU 抗体: -20 °C 保存,使用封闭液对抗体进行稀释配制,可按照抗体说明书的推荐浓度使用。

[0026] (5) 细胞固定液:4% 多聚甲醛或 70% 乙醇。

[0027] (6) 2M 的盐酸 HCl 溶液:使用去离子水配制 2M 的 HCl 溶液。

[0028] (7) 细胞膜通透液:0.5% 曲拉通 100 (Triton-100)。使用 PBS 溶液稀释配制。

[0029] (8) 0.1M 四硼酸钠( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ):用 PBS 溶液配制。

[0030] (9) HRP 酶显色底物:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液。

[0031] (10) 细胞培养基:溶剂为 RPMI-1640 培养基,其中胎牛血清的体积百分比为 10%, L-谷氨酰胺的浓度为 2 mM,青霉素的浓度为 100 IU/ml,链霉素的浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ 。

##### [0032] 二、细胞样本处理

首先向细胞培养板中接种 A549 细胞,最佳接种密度为 10000 个/孔,设置 6 平行。将细胞培养板放入细胞培养箱中孵育 24 小时,不进行卷烟烟气染毒步骤,直接开展 BrdU 掺入量的测定,检测得到 A450nm 吸光度值为 0.09,证明该细胞系不会对 BrdU 抗体产生非特异性吸附,适合用于评价卷烟烟气的细胞增殖毒性。

[0033] 经扩增培养的 A549 细胞进行消化以后,制备细胞悬液( $1 \times 10^5$  个/ml)。96 孔板的每孔(除最外周 36 个孔)加入 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液,接种密度为 10000 个/孔,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。细胞培养 24 h 后,吸去培养液,96 孔板(除最外周 36 孔)每列 6 孔

为一组分别设置为空白对照组、8个不同剂量(25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250  $\mu\text{g/ml}$ )的烟气粒相物萃取液染毒组,空白对照组每孔分别加入 100  $\mu\text{l}$  细胞培养基、烟气染毒组每孔加入 100  $\mu\text{l}$  卷烟烟气粒相物染毒溶液。最外周 36 个孔中,选择 6 孔加入 100  $\mu\text{l}$  细胞培养基作为培养基对照。于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 22h。然后每孔加入 10  $\mu\text{l}$  的 BrdU 染液,继续于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2h 后,进行 BrdU 掺入量的测量。根据 450nm 处的吸光度值,计算卷烟烟气染毒对 A549 细胞的增殖抑制率。

[0034] 图 5 所示为卷烟样品 2 粒相物染毒浓度与细胞增殖抑制率之间的剂量效应关系。如图 5 可知,卷烟烟气粒相物染毒浓度与 A549 细胞增殖抑制率有很好的剂量效应关系,可通过公式计算  $\text{IC}_{50}$  值。



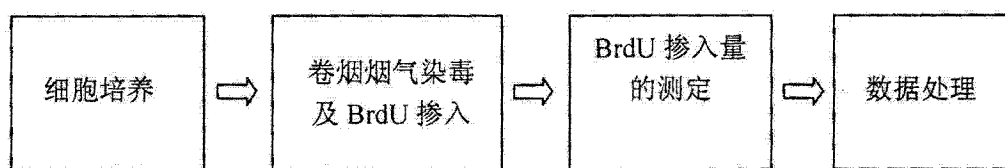


图 1

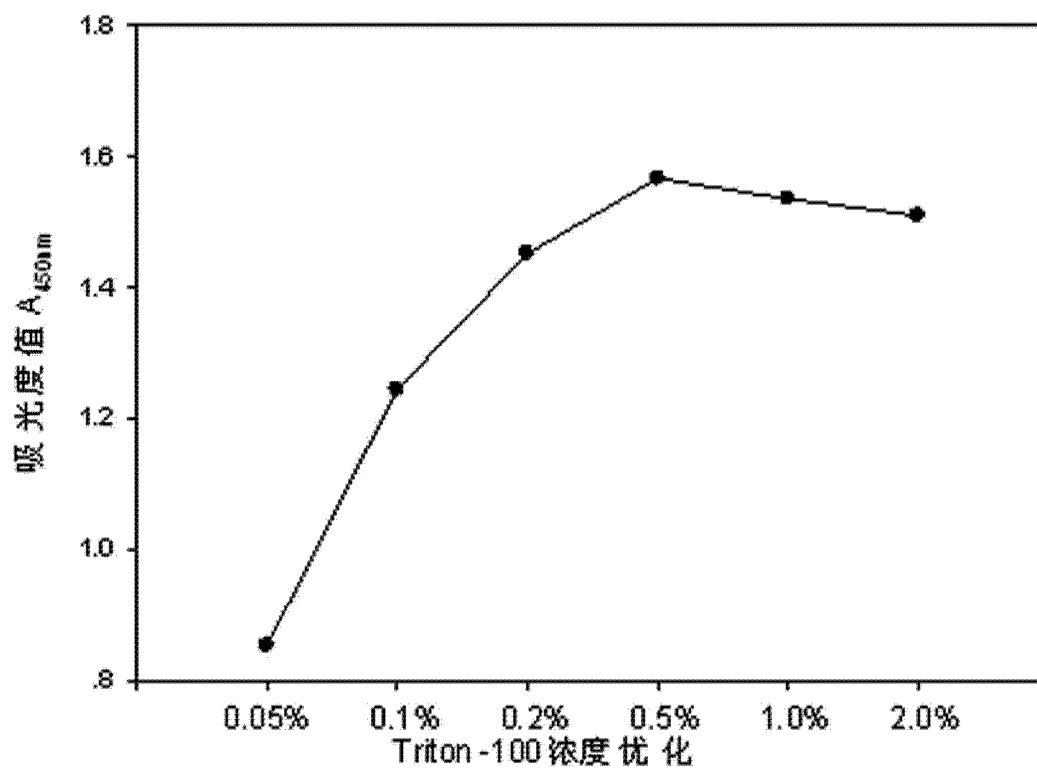


图 2

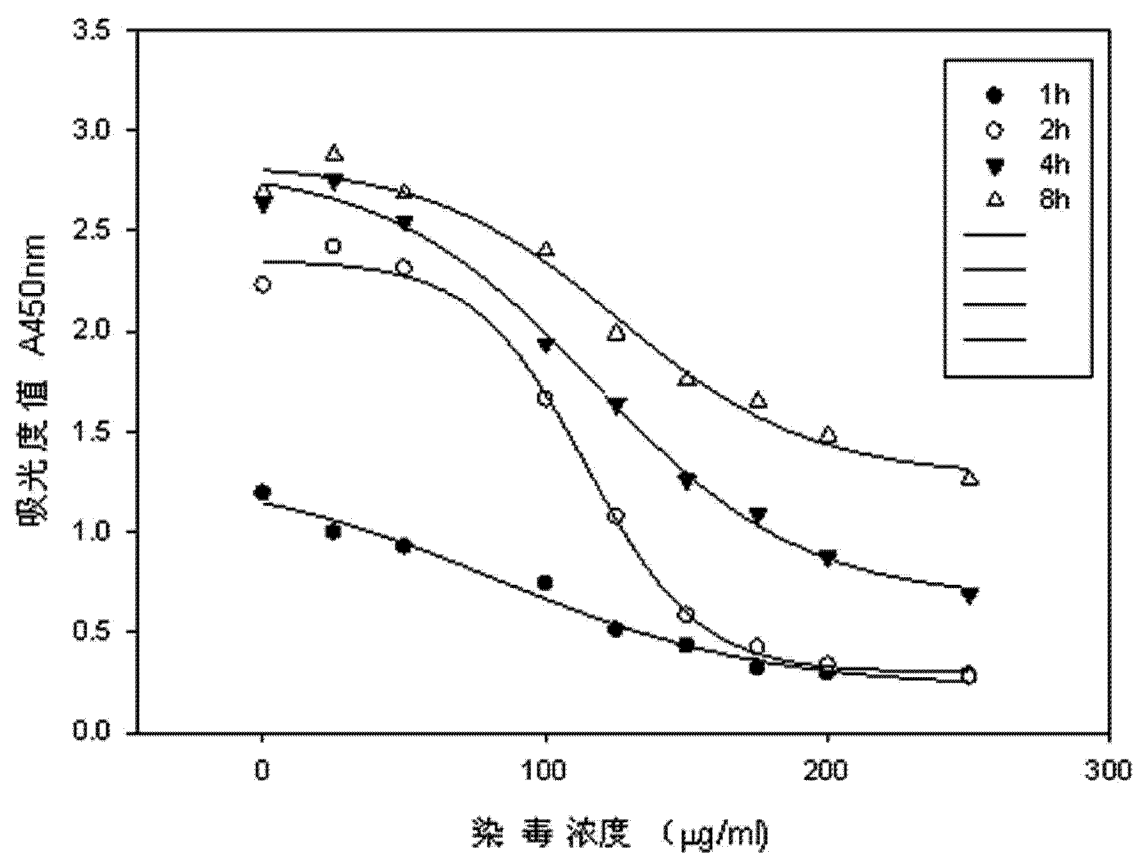


图 3

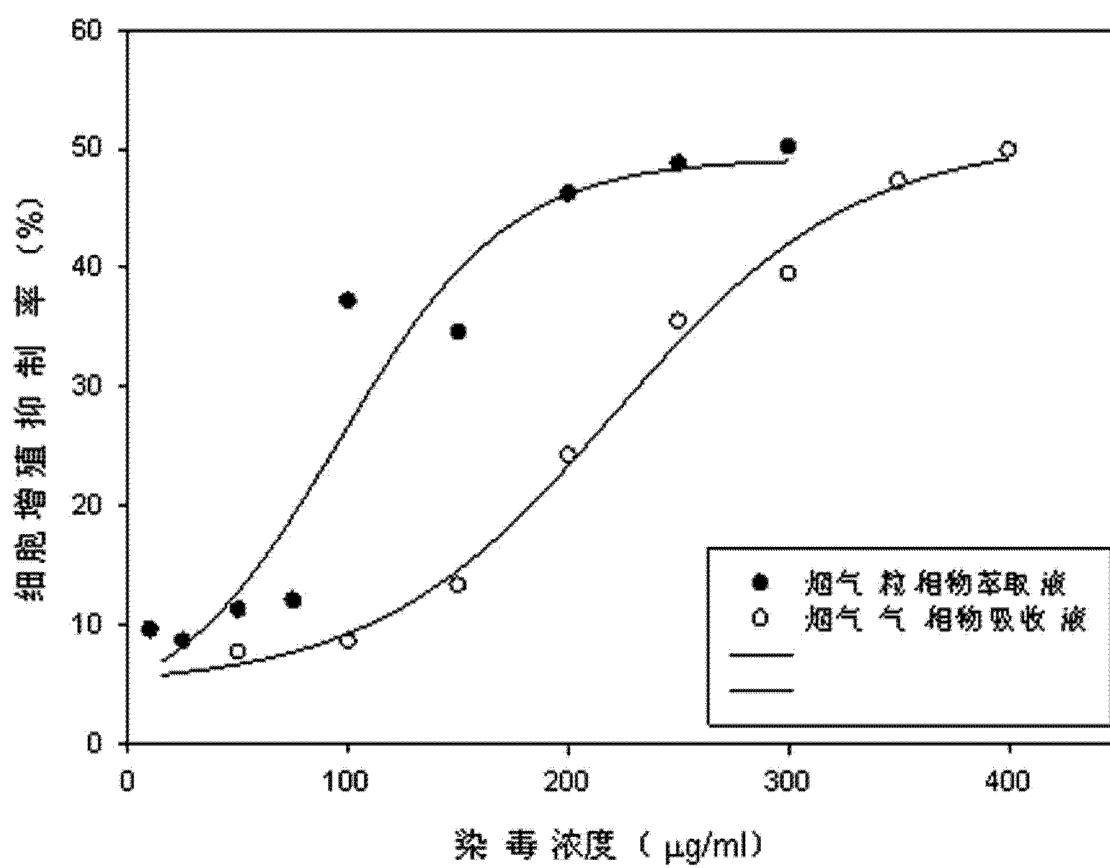


图 4

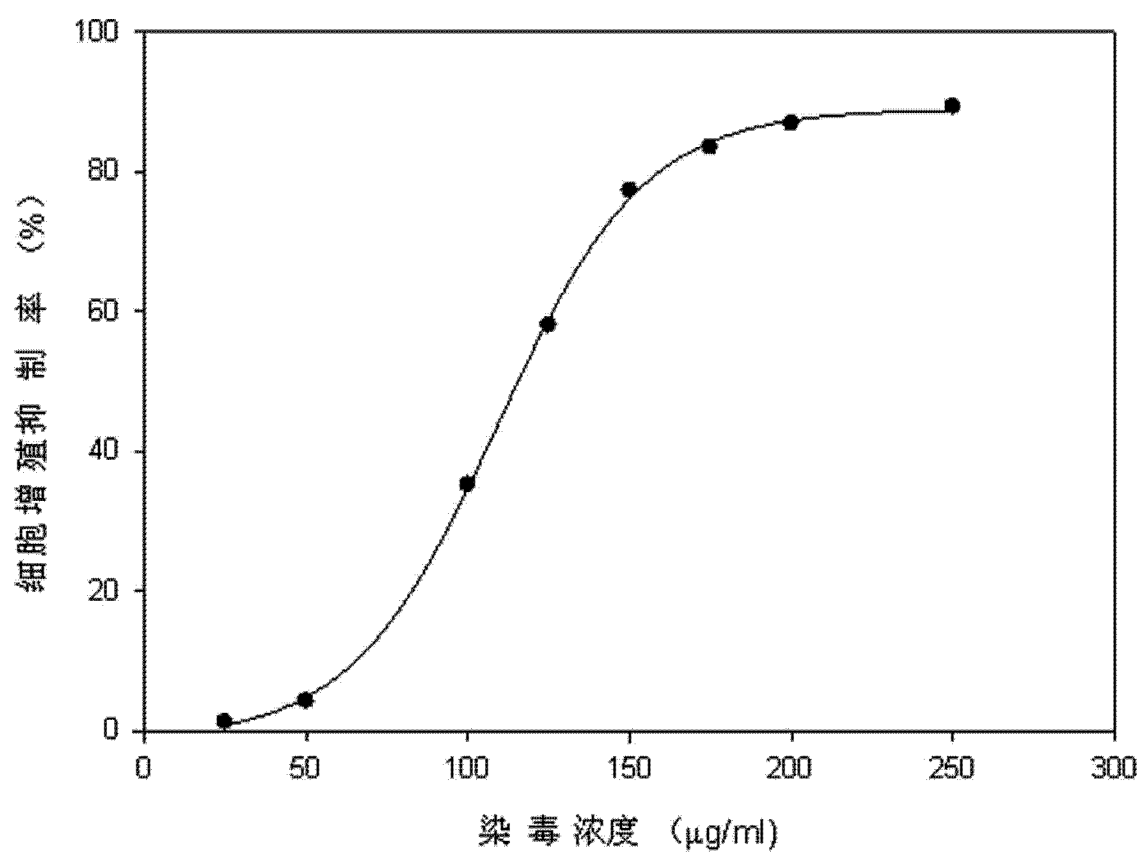


图 5

专利名称(译)	一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷掺入的卷烟烟气增殖毒性评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103808919A</a>	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201410094987.8	申请日	2014-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心		
申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心		
[标]发明人	陈欢 刘彤 韩书磊 吴帅宾 付立伟 张小涛 石龙凯 侯宏卫 胡清源		
发明人	陈欢 刘彤 韩书磊 吴帅宾 付立伟 张小涛 石龙凯 侯宏卫 胡清源		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/53		
代理人(译)	姜振东		
其他公开文献	CN103808919B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种基于溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 掺入的卷烟烟气细胞增殖毒性评价方法, 其特征在于: 包括以下步骤: 1) 溶液的配制, 2) 细胞接种, 3) 卷烟烟气染毒及BrdU掺入, 4) BrdU掺入量的测定, 5) 结果与分析。本发明具有以下特点: (1) 本发明通过烟气粒相物萃取液和烟气气相物吸收液的制备, 可分别考察烟气粒相物、气相物的细胞毒性。(2) 通过细胞适用性验证步骤, 本发明可能适用于多种贴壁培养细胞, 可用于考察卷烟烟气对不同细胞系的细胞增殖毒性。(3) 通过BrdU掺入时间和细胞膜通透液浓度的优化提高检测灵敏度。(4) 并通过卷烟烟气染毒浓度的优化, 确定了最佳染毒浓度, 以获得最佳剂量效应曲线。此外, 本测定方法还具有操作快速简便、灵敏性高、结果稳定的优点。

