

# 彗星实验方法的优化及影响因素的分析

范南英<sup>1,2</sup>,张鹏<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 为了更有效地检测细胞 DNA 损伤,对彗星实验的影响因素进行优化并建立阳性对照。方法 以传统碱性彗星实验为基础,对制胶方法、凝胶浓度、琼脂糖溶剂、裂解时间、细胞密度和电泳电压加以优化。以过氧化氢( $H_2O_2$ )作为 DNA 损伤诱导剂诱导 HL-60 细胞作为该实验的阳性对照。结果 优化后的实验结果显示,制胶方法由三步法进步为两步法,以 PBS 为琼脂糖溶剂,0.8% 正常熔点琼脂糖制备底层胶,0.7% 低熔点琼脂糖与细胞悬液混合作为第二层胶,制胶效果好,操作更简单省时,较好地解决了脱胶问题。裂解 1 h,1 V/cm 电压电泳,获得了具有代表性的彗星图像,结果易于判读,能有效避免假阳性结果。并对不同浓度  $H_2O_2$  诱导的 HL-60 细胞 DNA 损伤情况进行比较,成功建立了彗星实验的阳性对照。结论 与传统方法相比,优化后的彗星实验方法成本更低,更简单、快速、准确,重复性也更好,能够快速检测细胞中的 DNA 损伤。

**关键词** 彗星实验;HL-60;DNA 损伤模型

**中图分类号** Q 2-33

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0219-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.006

彗星实验是一种基于凝胶电泳的方法,可在单细胞水平上测量 DNA 损伤。目前,彗星实验根据裂解液 pH 的高低可以分为碱性彗星实验<sup>[1]</sup>和中性彗星实验<sup>[2]</sup>。碱性彗星实验灵敏度较高,广泛用于 DNA 单链、双链断裂或碱不定位点的检测。影响彗星实验结果的因素比较多,如琼脂糖浓度、细胞密度、电压以及其他未知原因<sup>[3-5]</sup>,因此实验中选择合适的阳性对照对于彗星实验结果可信度非常重要。过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )是一种强氧化剂,将细胞暴露于  $H_2O_2$  会导致细胞 DNA 发生损

伤<sup>[6]</sup>。有研究<sup>[7-8]</sup>通过 400  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理构建人肝癌细胞(HepG2)的损伤模型。另有研究<sup>[9-12]</sup>选用 1 mmol/L  $H_2O_2$  处理的心肌细胞(H9c2 细胞)构建损伤模型。不同细胞对  $H_2O_2$  的敏感性不同,因此,构建细胞损伤模型时应根据细胞类型来确定  $H_2O_2$  浓度。目前,体外损伤模型的建立主要集中在肝细胞或心肌细胞。对于白血病细胞 HL-60 损伤模型构建的研究很少。因此,该研究以  $H_2O_2$  为 DNA 损伤诱导剂,探讨影响彗星实验结果的可能因素,分析各种影响因素对彗星实验结果的可能原因,为稳定可靠的彗星实验提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** IMDM 基础培养基、细胞培养用血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、100 000 U/L 青链霉素均来自美国 Gibco 公司;6 孔板和 T25 培养瓶购自康宁 Corning 公司;HL-60 细胞为本实验室保存。30%  $H_2O_2$  来自重庆川东化工有限公司;NaOH 来自天津科密欧公司;Na<sub>2</sub>EDTA、正常熔点琼脂糖来自北京索莱宝科技有限公司;月桂酰基氨酸钠、氯化钠、低熔点琼脂糖均来自德国 Sigma;磨砂载玻片来自广州帆船;黏附载玻片和盖玻片来自江苏世泰。

## 1.2 方法

**1.2.1 HL-60 细胞培养** HL-60 细胞培养于 T25 的细胞培养瓶,并使用 IMDM 完全培养基进行培养,完全培养基组成包括 20% FBS、1% 青链霉素;每天观察细胞生长情况,每隔 1 d 进行 1 次半量换液,细胞生长密度约 90% 时进行传代培养。

**1.2.2 制胶方法的优化** 传统的制胶流程为:向载玻片上滴加 100  $\mu\text{l}$  正常熔点琼脂糖,加盖盖玻片压平,4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 后,取下盖玻片,获得底层胶;在底层胶上加入混有细胞的低熔点琼脂糖,并用盖玻片压平,4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 后,取下盖玻片,获得第二层胶。最后根据制备底层胶的方式制备第三层胶,形成类似“三明治”式的胶层结构。Ostling et al<sup>[1]</sup>的制胶方法需要 3 个步骤,制备的胶层较厚,在后续实验中容易脱胶。因此,本研究对该方法进行了优化,将制胶

2023-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960036);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]重点 005);贵州省教育厅高校科技创新团队(编号:黔教技[2023]068)

作者单位:贵州医科大学<sup>1</sup>基础医学院生物学教研室、<sup>2</sup>细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室,组织工程与干细胞实验中心,贵州省再生医学重点实验室,贵阳 550025

作者简介:范南英,女,硕士研究生;

张鹏,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: peng12zhang@gmail.com

步骤由3步改为2步,具体优化步骤如下。

① 底层胶的制备:传统方法需要向载玻片上滴加 100  $\mu\text{l}$  正常熔点琼脂糖,加盖盖玻片(压片法);优化方法为用镀膜法制备底胶,将洁净预热的磨砂载玻片垂直放置于盛有正常熔点琼脂糖溶液的烧杯中约 1 min,然后水平放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  的载玻片架上 5 min。对不同浓度的正常熔点琼脂糖(0.8%、1%)进行筛选,观察后续实验中是否有脱胶。② 包埋细胞胶层的制备:将细胞悬液与低熔点琼脂糖凝胶混合(37  $^{\circ}\text{C}$ ),滴加 100  $\mu\text{l}$  于底层胶上,盖上载玻片,4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。对不同浓度的低熔点琼脂糖(0.5%、0.7%、1%)进行筛选,观察后续操作中是否有脱胶。

**1.2.3 琼脂糖溶剂的筛选** 称取相应克重的琼脂糖,加入超纯水和 PBS 通过微波炉溶解。

**1.2.4 胶层中细胞密度的筛选** 收集生长状态良好的 HL-60 细胞,用 PBS 调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  和  $6 \times 10^4$  个/ml,将细胞悬液与低熔点琼脂糖溶液按 1:3 的体积比混匀,取 100  $\mu\text{l}$  细胞-琼脂糖混合物转移到适当的正常熔点琼脂糖包被的磨砂载玻片上。立即加盖盖玻片,注意使载玻片尽可能保持水平,4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min。染色后通过荧光显微镜观察凝胶中细胞密度。

**1.2.5 碱性裂解时间的优化** 将包埋有细胞的载玻片置于染色缸中,加上碱性裂解液,4  $^{\circ}\text{C}$  下避光、裂解。对不同裂解时间(1 h、过夜裂解)进行筛选,观察细胞在琼脂糖层中的拖尾情况。

**1.2.6 阳性对照实验  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的筛选**  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 HL-60 细胞 20 min,对不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用浓度(0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%)进行筛选。

## 2 结果

**2.1 制胶方法的优化** 本研究对传统制胶法进行了优化,即只包含底胶和含细胞胶层。制备底胶时,采用镀膜法,制备包埋细胞胶层时采用压片法。实验结果显示,镀膜法制备的底胶表面光滑,可以解决脱胶问题,且易于学习和操作,在后续实验中并没有发生脱胶。使用浓度为 0.8% 和 1% 的正常熔点琼脂糖进行镀膜时,浓度为 0.8% 的正常熔点琼脂糖制胶效果佳。凝胶能较好的吸附于载玻片上,胶面光滑,在后续实验中凝胶没有发生脱落。根据实验结果,选择 0.8% 正常熔点琼脂糖溶液制备底胶。结果显示,采用浓度为 0.5%、0.7% 和 1% 的低熔点琼脂糖包埋细胞时,0.7% 包埋效果最好。此时凝胶与

正常熔点琼脂糖膜的黏附性较好,在后续实验中凝胶没有发生脱落(制片操作流程见图 1)。

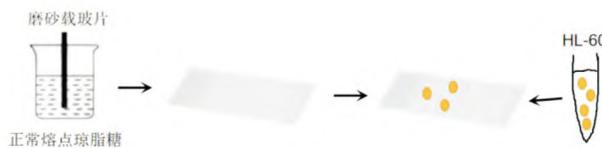


图1 彗星实验制片流程

**2.2 琼脂糖溶剂的选择** 将未经  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HL-60 细胞包埋在低熔点琼脂糖中进行实验,结果显示,当琼脂糖溶剂为超纯水时,HL-60 细胞出现拖尾(图 2A)。当琼脂糖溶剂为 PBS 时,HL-60 细胞没有拖尾(图 2B)。

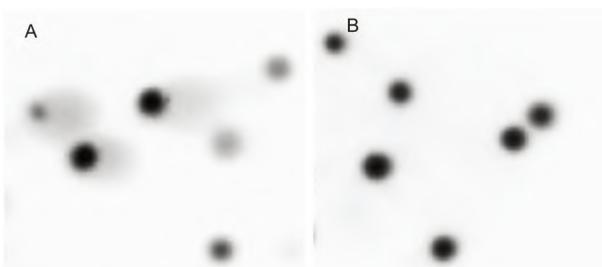


图2 琼脂糖溶剂对彗星实验结果的影响  $\times 20$

A:超纯水溶解琼脂糖对彗星实验结果影响;B:PBS 溶解琼脂糖对彗星实验结果影响

**2.3 合适细胞密度的选择** 在荧光显微镜下观察未经  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HL-60 细胞电泳结果。结果显示,当凝胶中细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/ml 时,视野中细胞数量较多(图 3A),视野内细胞过于密集,不利于图像分析。当凝胶中细胞密度为  $6 \times 10^4$  个/ml 时,可观察到适量细胞,约为 7 个(图 3B),视野中细胞数量适宜图像分析,选择  $6 \times 10^4$  个/ml 作为凝胶中的细胞密度。

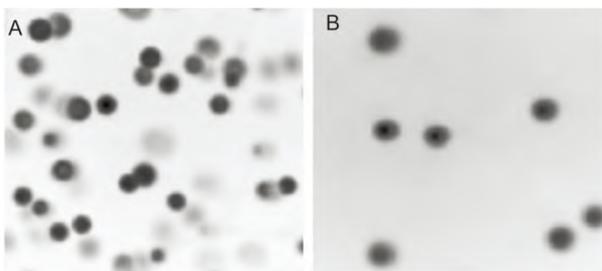


图3 不同细胞量在视野中的显示情况  $\times 20$

A:细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/ml;B:细胞密度为  $6 \times 10^4$  个/ml

**2.4 细胞裂解时间的优化** 将未经  $H_2O_2$  诱导的 HL-60 细胞包埋在低熔点琼脂糖中进行实验,结果显示,过夜裂解细胞,HL-60 细胞 DNA 存在拖尾(图 4A)。裂解时间为 1 h,HL-60 细胞 DNA 在电泳中没有拖尾(图 4B)。

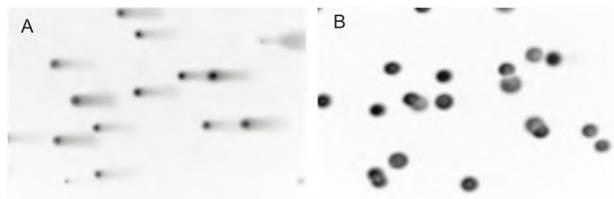


图 4 裂解时间对彗星实验的影响  $\times 20$

A: 过夜裂解; B: 裂解 1 h

**2.5 电泳电压的优化** 结果显示,电压为 0.6 V/cm 时,0.001%  $H_2O_2$  处理 HL-60 细胞 DNA 在电泳中形成刺猬状。电压为 1 V/cm 时,此时 DNA 在电泳中形成的彗星尾清晰,容易判读。电压为 1.5 V/cm 时,DNA 在电泳中形成的彗星尾清晰度较差,不易判读。电压为 1.75 V/cm 时,DNA 在电泳中形成的彗星尾和彗星头部已经分离。见图 5。

**2.6 阳性对照实验的筛选** 本研究通过优化后的彗星实验检测不同浓度的  $H_2O_2$  (0.1%、0.01%、0.001%、0.000 1%) 处理的 HL-60 细胞 DNA 损伤情况,验证优化后的实验体系是否可靠,并建立 DNA 损伤模型。结果显示,0.1%、0.01% 和 0.001%  $H_2O_2$  处理细胞 DNA 都出现拖尾,但 0.1% 和 0.01%  $H_2O_2$  处理组 DNA 拖尾较大,彗星头和彗

星尾已分离,不易判读。0.000 1%  $H_2O_2$  处理组细胞在电泳中形成刺猬状,不易观察。见图 6。

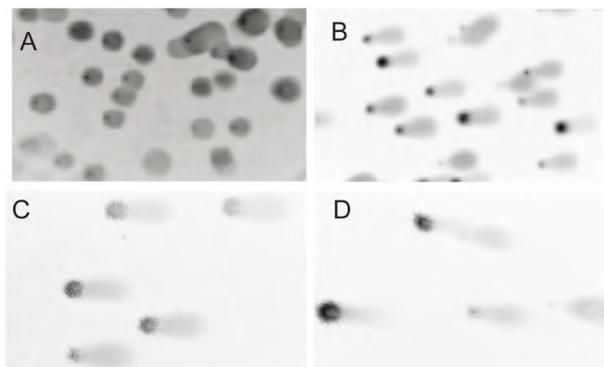


图 5 不同电压大小对彗星实验的影响  $\times 20$

A: 0.6 V/cm 电压; B: 1 V/cm 电压; C: 1.5 V/cm 电压; D: 1.75 V/cm 电压

### 3 讨论

彗星实验是一种灵敏、快速的实验方法,用于检测真核生物单个细胞中 DNA 双链和单链断裂以及碱不稳定位点<sup>[3]</sup>。近年来,该方法已广泛应用于遗传毒理学、环境生物监测和细胞凋亡等研究<sup>[4-5]</sup>。本研究探讨了影响彗星实验结果的可能因素,为稳定可靠的彗星实验提供理论依据。

传统彗星实验存在操作复杂,胶面不光滑和易脱胶等问题<sup>[13]</sup>。底胶不均匀和脱胶的原因主要是制备底胶时采用压片法,需要将盖玻片揭去。本研究采用镀膜法制备底胶克服了胶体不均匀和脱胶的

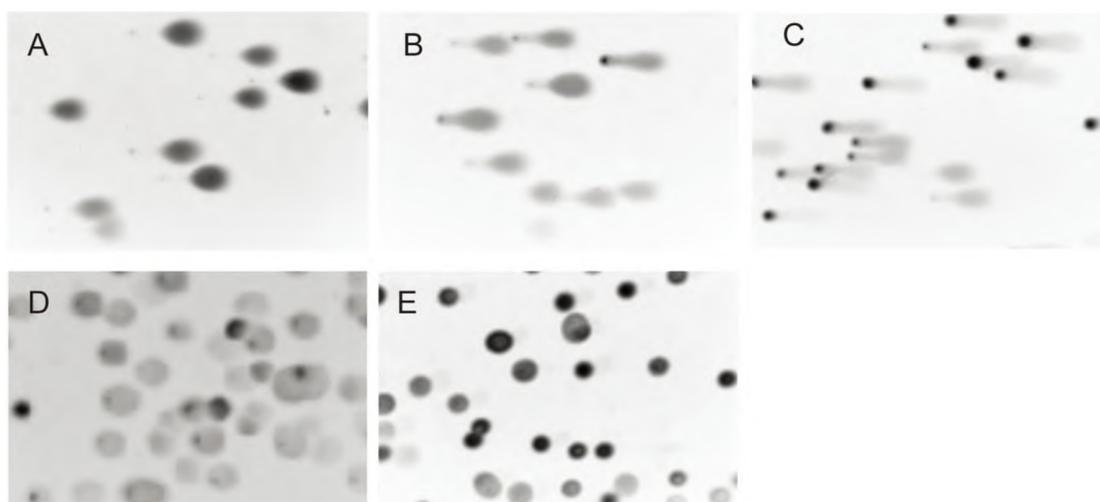


图 6 不同浓度  $H_2O_2$  对 HL-60 DNA 损伤影响  $\times 20$

A: 0.1%  $H_2O_2$ ; B: 0.01%  $H_2O_2$ ; C: 0.001%  $H_2O_2$ ; D: 0.000 1%  $H_2O_2$ ; E: 空白对照组

表1 彗星实验障碍及解决方法

彗星实验可能出现的障碍	原因分析	解决方法
琼脂糖凝胶脱落	1 琼脂糖溶液与磨砂载玻片没有充分接触 2 琼脂糖溶液浓度较低 3 环境湿度较高	1 镀膜法制胶时使载玻片在琼脂糖溶液中停留时间久一点 2 选择适宜的琼脂糖浓度 3 预热磨砂载玻片
未经处理的细胞出现拖尾	1 细胞处于 S 期 2 细胞裂解时间过长 3 细胞受到机械损伤 4 琼脂糖溶剂选择超纯水	1 通过 DNA 含量分析判断受损细胞是否处于 S 期(单个彗星的荧光强度与 DNA 含量成正比) 2 缩短细胞裂解时间 3 操作过程动作轻 4 琼脂糖溶剂选择 PBS
没有彗星尾巴或呈刺猬状	1 低熔点琼脂糖浓度过高 2 细胞裂解不充分 3 电压太小,电泳时间过短	1 选择适宜的琼脂糖浓度 2 增加细胞裂解时间 3 增大电压,增加电泳时间
彗星尾巴太长	1 细胞裂解时间太长 2 电压过大,电泳时间太长	1 缩短细胞裂解时间 2 选择合适电压大小和电泳时间

问题。实验表明,包埋胶层的脱胶主要与低熔点琼脂糖的浓度和涂胶方式有关。若采用“三明治”法制胶,每一层胶凝固后都需移去盖玻片,极易导致脱胶。经优化后,以 0.7% 低熔点琼脂糖作为包埋层,采用“压片法”将其展开,这种“双层凝胶法”操作简便,较好地解决了脱胶问题。在制胶过程中确保细胞完整性也是实验成功的关键点,当溶剂为超纯水时,未经处理的 HL-60 细胞出现拖尾。超纯水促使细胞膜破裂,暴露的 DNA 与凝胶中存在的水和氧自由基(ROS, reactive oxygen species)进行水解和氧化反应,从而导致 DNA 损伤<sup>[14]</sup>。以 PBS 为溶剂,它能较好地维持细胞结构和生理完整性,有助于细胞保持在其生理 pH 范围内,并在短期内保持细胞高活力<sup>[15]</sup>。

细胞密度也会影响彗星实验结果的判读<sup>[4]</sup>,最佳的细胞密度是决定实验成败的关键因素。一个视野内的细胞数量应尽可能多,同时又不重叠,这样图像的获取快速又方便。结果表明,当细胞密度为  $6 \times 10^4$  个/ml 时,视野中约有 7 个细胞,细胞分布较好,适合凝胶中的细胞密度。同时,细胞密度也需要根据待测细胞的类型来确定<sup>[4]</sup>。当细胞 DNA 损伤严重时,彗星拖尾较长,应适当降低细胞密度。当细胞 DNA 损伤较轻时,可适当增加细胞密度。

由于电泳电压和裂解时间会对彗星实验结果产生影响,因此,每次实验的电泳条件应保持一致,以避免因电泳条件不同而出现“假阳性”结果。本实验中,电压为 1 V/cm,电流为 25 mA,电泳时间为 25 min 可以将损伤的 DNA 泳出。若电压太小,断裂 DNA 不能被泳出;电压太大,则形成的彗尾较大,不利于图像分析。因此,选择 1 V/cm 电压作为该实验的电泳电压。

由于彗星实验结果的影响因素繁多,因此在实验中需要设置对照来确保实验设计的合理性、实验结果的可靠性和有效性。 $H_2O_2$  进入细胞会产生氧自由基而造成细胞的 DNA 损伤,本研究采用  $H_2O_2$  作为 DNA 损伤剂诱导 HL-60 细胞以建立阳性对照。实验显示,0.001%  $H_2O_2$  诱导 HL-60 形成的损伤图像清晰,彗星头清晰,彗尾长度适中,结果容易判读,根据实验结果,选择 0.001%  $H_2O_2$  诱导作为该实验的阳性模型。高浓度  $H_2O_2$  (0.1%  $H_2O_2$  和 0.01%  $H_2O_2$ ) 诱导 HL-60 形成的损伤较严重,彗星头很小,结果不容易判读。同时低浓度  $H_2O_2$  (0.000 1%) 诱导 HL-60 形成的图像为刺猬状,不容易产生彗星。因此,在实际彗星实验中要针对不同细胞选择合适的  $H_2O_2$  作为阳性处理。

综上所述,彗星实验作为检测 DNA 损伤的经典方法,结果会受到多方面的因素影响,这些影响因素可能出现的原因及解决的方法如表 1 所示。在实验过程中通过实验流程的优化和阳性对照实验的建立才能保证准确有效彗星实验结果。

#### 参考文献

- [1] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123(1): 291-8.
- [2] 李 岗, 吴声敢, 蔡磊明. 彗星实验技术及其应用[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 79-96.
- [3] Bolognesi C, Cirillo S, Chipman J K. Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in mytilus sp[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2019, 842: 50-9.
- [4] Dunkenberg L, Reiss K, Del Valle L. Comet assay for the detection of single and double-strand DNA breaks[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2422: 263-9.
- [5] Olive P L, Banáth J P. The comet assay: a method to measure

- DNA damage in individual cells[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 23–9.
- [6] Muruzabal D, Collins A, Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future[J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 147: 111865.
- [7] He Y, Bu L, Xie H, et al. Antioxidant activities and protective effects of duck embryo peptides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(12): 7118–28.
- [8] Wu Z, Wang H, Fang S, et al. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury in HepG2 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4163–74.
- [9] Mao C Y, Lu H B, Kong N, et al. Levocarnitine protects H9c2 rat cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(11): 1107–15.
- [10] Chu Y, Li L, Liu Y, et al. FGF1 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrion-dependent apoptosis in H9c2 cells [J]. *Pharmazie*, 2020, 75(7): 335–8.
- [11] Su B, Bu S D, Kong B H, et al. Cystatin C alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced H9c2 cell injury[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6360–70.
- [12] 姜振凯, 李兴国, 张福厚, 等. PI3-K/Akt 和 MAPKs 信号通路在氧化应激诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J]. *中国急救医学*, 2016(1): 78–82.
- [13] Le Grandois J, Ruas M, Kalisa P, et al. Detection of cold chain abuse in frozen and chilled salmon using the comet assay [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 54(1): 242–8
- [14] Chatterjee N, Walker G C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(5): 235–63.
- [15] 赵嵩月, 陈 彤, 张要武, 等. 磷酸盐缓冲液提高血塞通注射液稳定性的研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(5): 453–5.

## Optimization of comet experiment method and analysis of influencing factors

Fan Nanying<sup>1,2</sup>, Zhang Peng<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Biology, School of Basic Medicine, <sup>2</sup>National&Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

**Abstract Objective** To detect cell DNA damage more effectively by optimizing the influencing factors of Comet assay and establishing a positive control. **Methods** Based on the traditional alkaline comet assay, the gel preparation method, gel concentration, agarose solvent, lysis time, cell density and electrophoresis voltage were optimized. HL-60 cells were induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a DNA damage inducer as a positive control. **Results** The optimized experimental results showed that the gel preparation method improved from three-step method to two-step method. PBS was used as agarose solvent, 0.8% normal melting point agarose was used to prepare the bottom layer, and 0.7% low melting point agarose was mixed with cell suspension as the second layer. The gel preparation effect was better, the operation was simpler, the time was saved, and the degumming problem was better solved. After lysis for 1 h and electrophoresis at 1 V/cm voltage, representative comet images were obtained. The results were easy to interpret and could effectively avoid false positive results. The positive control of comet assay was successfully established by comparing the DNA damage of HL-60 cells induced by different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Conclusion** Compared with the traditional method, the optimized comet assay method is simpler, faster, more accurate, lower cost and has better repeatability, which can quickly detect DNA damage in cells.

**Key words** comet assay; HL-60; DNA damage model