

提高最终产物的特异性。

关键词:RT-PCR 巢式引物

参 考 文 献

[1] Elwyn Y. Loh, John F. Elliott, et al., 1989,

Science., **243**:217-220.

[2] Zhu Chen, Nigel J. Brand, et al., 1993, *The EMBO Journal.*, **12**:1161-1167.

[3] Shinji Yoshitake, et al., 1985, *Biochemistry.*, **24**:3736-3750.

[4] Chomczynski P, et al., 1987, *Analytical Biochemistry.*, **162**:156-159.

FACTORS EFFECT ON REVERSE TRANSCRIPTION PCR

XING Yong Na LU Da Ru QIU Xin Fang XUE Jing Lun

(*Institute of Genetics, Fudan University, 200433*)

ABSTRACT

This paper described several factors effect on reverse transcription PCR. The denaturing and annealing temperature, RNA template, reverse transcriptase and nested primer were described, discussed and recommended.

Key words: RT-PCR Nested primer

实验技术

用 NAG 酶活性荧光测定法检测 3T3 细胞增殖及其应用

丁焕文 何锡焯* 苏增贵

(广州军区广州总医院骨科 510010)

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种在体内分布广泛、生理功能重要的生长因子^[1],最近因发现其与多种组织如软组织^[2]、软骨组织^[3]、骨组织^[4]、神经组织^[5]等的损伤修复过程有关而愈来愈受到重视。在研究 bFGF 过程中,建立一种快速、敏感、有效的 bFGF 生物活性鉴定方法相当重要,本实验根据许多组织细胞中均含有一种溶酶体酶——N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase),该酶能使底物 4-甲基伞形酮-乙酰氨基葡萄糖苷(4-methyl-um-

belliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, 4MU-NAG)分解产生荧光物质 4-甲基伞形酮(4-methyl-umbelliferyl, 4MU)的原理而建立一种新的 bFGF 生物活性鉴定法——3T3 细胞 NAG 酶活性荧光测定法,取得了较好的结果。现将实验方法及结果报告如下。

本课题受全军 95 青年基金部分资助,课题编号 96Q017。

* 第三军医大学西南医院外科教研室,重庆, 400038。

材料与方法

1. 主要试剂

4MU-NAG 为天津市医药科学研究所产品, DMEM 培养液(Dolbecco's modified Eagle's medium) 为 Gibco 公司产品, Triton X-100 为 Sigma 公司产品, 上海化学试剂采供站分装, 其余均为国产分析纯。

2. 细胞株

3T3 细胞为小鼠成纤维细胞株, 由第三军医大学烧伤研究所赵雄飞教授惠赠, 于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中传代培养。

3. bFGF 来源

按 Gospodarowicz^[6]介绍的方法从牛脑垂体中提纯并加以鉴定。bFGF 标准品为宝灵曼公司产品。

4. 3T3 细胞数目与其 NAG 酶活性的关系

取不同浓度 3T3 细胞悬浮液 100 μ l (含 10^3 — 1.5×10^5 个细胞) 加入试管, 再加 0.25% Triton X-100 溶液 100 μ l, 0.1 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 4.8) 800 μ l, 2.0 mol/L 4MU-NAG 底物液 100 μ l, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min 后加甘氨酸终止液 (pH 9.9, 0.17 mol/L 甘氨酸- Na_2CO_3 缓冲液) 2 ml, 于荧光分光光度计 (Hitachi 公司) 上测各管于 358/447 nm (狭缝 5/5 nm) 处的荧光强度值, 均一式三份, 取其均值。

5. 维持 3T3 细胞正常存活的最适宜血清浓度以及检测 NAG 酶活性最佳时间的选定

取生长融合状态的 3T3 细胞以 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 使之悬浮于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 接种三块 96 孔培养板, 细胞密度 10^3 个/孔, 每块培养板均于 8 h 后倾去培养液, PBS 洗三次, 每三孔为一组, 同时分别以不同浓度的小牛血清 (0.2%、0.4%、0.8%、1.5%、3%、5%、10%) 培养, 于培养 24 h、48 h、72 h 分别取一块培养板测各孔的 NAG 酶活性。

6. 采用 3T3 细胞作为靶细胞检测 bFGF 的生物活性

按与上相同方法接种 3T3 细胞于 96 孔培养板, 8 h 后换含 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养液, 再过 24 h 后换含 0.4% 小牛血清、0.5% 牛血清白蛋白、不同浓度 bFGF 样品或 bFGF 标准品的 DMEM 培养液, 刺激 48 h 测各孔的 NAG 酶活性。

7. 3T3 细胞的 NAG 酶活性测定方法

将待测 96 孔培养板倾去培养液, 3T3 细胞以 PBS 洗三次, 加 0.25% Triton X-100 每孔 100 μ l, 数分钟后

移入试管, 每管加柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液 800 μ l, 4MU-NAG 底物液 100 μ l, 于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min 后加甘氨酸终止液 2 ml, 于荧光分光光度计上测各管的荧光强度。

结 果

1. 3T3 细胞数目与其 NAG 酶活性关系

3T3 细胞是 bFGF 的靶细胞之一, 常用作检测 bFGF 生物活性的工具。由于以检测 3T3 细胞 NAG 酶活性来反映其增殖状况以往未见报道, 因此我们首先检测了 3T3 细胞数目与其 NAG 酶活性的关系, 结果显示 (见图 1): 3T3 细胞数目在 10^3 — 1.5×10^5 之间与其 NAG 酶活性呈线性关系 ($n=9, r=0.997, p<0.01$), 同上重复 3 次, 相关系数 r 均大于 0.995。这表明用 3T3 细胞 NAG 酶活性来反映其增殖状况是可行的, 而且检测下限细胞数目低达 10^3 个, 故该方法足够敏感, 能用于 96 孔培养板中 3T3 细胞增殖状况的检测。

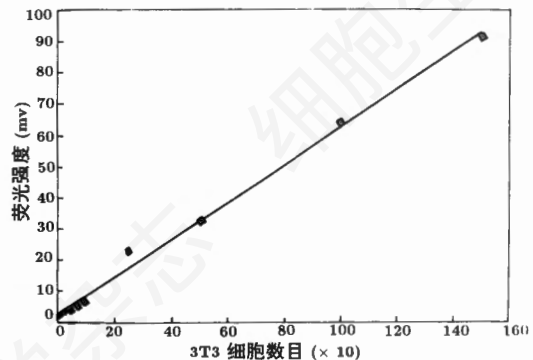


图 1 3T3 细胞数目与其 NAG 酶活性的关系

2. 维持 3T3 细胞正常存活的最适宜血清浓度

以不同浓度小牛血清培养 3T3 细胞的结果见图 2。从该图看出: 以 0.4%—0.8% 小牛血清培养时 3T3 细胞能够正常存活而呈微增殖状态, 在此基础上加入 bFGF 或其他刺激细胞生长的因素则易显示其促进作用; 而小牛血清浓度低于 0.2% 时, 不能维持 3T3 细胞于正常存活状态, 使细胞产生不可逆损害, 失去对 bFGF 的反应能力; 小牛血清浓度高于 1.5% 时

3T3 细胞生长已经较快,在此基础上加入 bFGF 或其他刺激细胞生长的因素均不易显示其促进作用。故维持 3T3 细胞正常存活的最适血清浓度为 0.4%—0.8%。

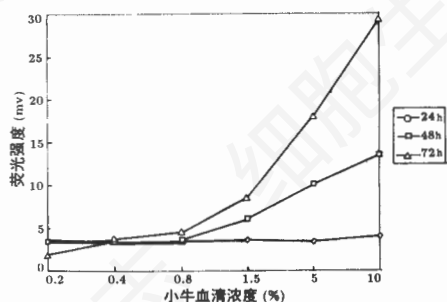


图2 不同浓度小牛血清培养 3T3 细胞的增殖结果

3. 检测 3T3 细胞 NAG 酶活性最佳时机

以不同浓度小牛血清培养 3T3 细胞,24 h 检测时各不同浓度小牛血清组之间 NAG 酶活性没有明显区别,而 48 h 检测时效果较好,真实地反映了各不同浓度小牛血清组之间细胞增殖状况的差异,因此检测 3T3 细胞 NAG 酶活性以培养 48 h 时进行为宜(见图 3)。

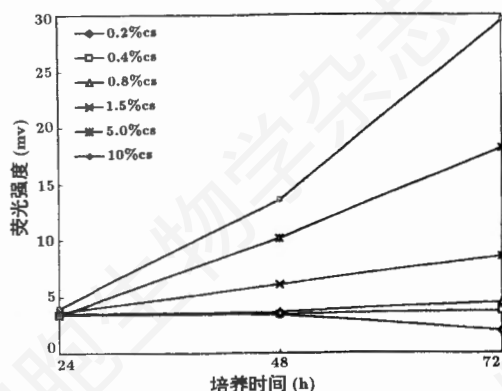


图3 不同培养时间检测 3T3 细胞 NAG 酶活性的结果

4. bFGF 生物活性鉴定结果

图 4 为提纯 bFGF 样品促 3T3 细胞增殖的剂量效应曲线,可以看出 bFGF 样品在 0.1—35 ng/ml 之间能明显促进 3T3 细胞增殖,且具有良好的剂量效应关系,其 ED₅₀ 值为 3.59 ng/ml。ED₅₀ 值为引起 3T3 细胞增殖达

到最大增殖效应的一半时的 bFGF 浓度。

bFGF 样品、标准品生物活性鉴定的结果见表 1,其 ED₅₀ 值分别为 3.59 ng/ml、1.84 ng/ml,这表明 bFGF 样品较 bFGF 标准品生物活性差。

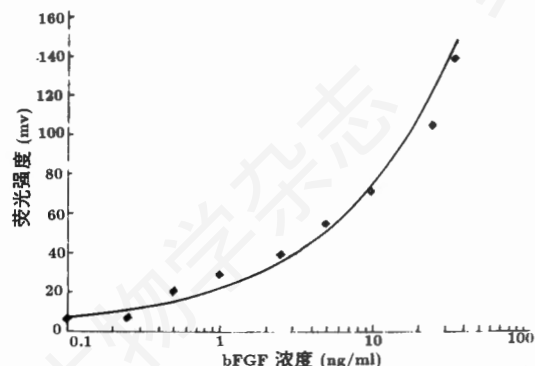


图4 bFGF 样品对 3T3 细胞增殖的影响

bFGF 样品、标准品生物活性鉴定的结果见表 1(见下页),其 ED₅₀ 值分别为 3.59 ng/ml、1.84 ng/ml,这表明 bFGF 样品较 bFGF 标准品生物活性差。

讨 论

NAG 酶是降解糖基成分的溶酶体酶,广泛存在于多种组织细胞中,NAG 酶活性的改变能反映多种活细胞的增殖和功能状况,以往常用检测 L 929、SMMC-7721、WILL-2 等细胞的 NAG 酶活性来反映其增殖状况,进行 TNF、IFN- γ 、IL-2 等生物活性鉴定。本实验首次证实 NAG 酶活性荧光测定法亦能检测 3T3 细胞增殖。

3T3 细胞是 bFGF 的靶细胞之一,常被用来作为检测 bFGF 生物活性的工具,以往在 bFGF 生物活性鉴定过程中检测 3T3 细胞增殖最早使用细胞计数法^[6],该方法较为古老,易受操作者主观因素影响,而且检测周期太长,一般需加入 bFGF 刺激 5 天才开始做细胞计数。后来引入的³H-TdR 参入法^[7]虽然克服了以上

表1 bFGF 样品、bFGF 标准品促 3T3 细胞增殖结果(以 NAG 酶活性表示)

浓度(ng/ml)	0(对照)	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	25	35
bFGF 样品	2.11± 3.35	5.54± 3.11	6.82± 0.19	20.33± 4.96**	29.08± 1.96**	39.08± 6.10**	54.98± 6.56**	71.04± 3.66**	104.27± 13.50**	138.4± 12.14**
bFGF 标准品	2.11± 3.35	6.74± 0.19	18.23± 4.77**	28.5± 2.39**	35.87± 3.56**	54.98± 9.28**	69.12± 2.15**	97.57± 9.76**	131.47± 2.55**	75.26± 11.71**

注: *P<0.05 **P<0.01(与对照组比较)

不足,但因使用放射性同位素致操作不太方便,易污染环境,且数值不太稳定,重复性差;我们参照 Landegren^[8]、彭代智^[9]等介绍的方法,采用 3T3 细胞 NAG 酶活性荧光测定法来进行 bFGF 的生物活性鉴定,效果较佳,我们体会到该方法与上述两种方法相比,具有检测周期短、操作方便、没有放射性同位素危害、数值稳定、重复性好等优点。

本实验证实 bFGF 样品、标准品均能促进 3T3 细胞增殖,其 ED 50 值分别为 3.59 ng/ml、1.84 ng/ml,表明 bFGF 样品较 bFGF 标准品生物活性差。由于 bFGF 是一种对热不稳定、易被蛋白酶降解的生长因子,因此我们认为 bFGF 样品较 bFGF 标准品生物活性差可能与提纯过程中 bFGF 样品活性丧失以及样品纯度较 bFGF 标准品低有关。

观察 3T3 细胞增殖反应时正确选定维持细胞正常存活的最适血清浓度和细胞接种密度相当重要。只有维持 3T3 细胞于正常存活而呈微增殖状况,才能对加入的 bFGF 或其它促成纤维细胞增殖的因子产生敏感反应。但是该最适小牛血清浓度易受多种因素影响,如不同批号小牛血清营养成分的差异、血清灭活方式、细胞生长状态等。本实验以 56℃、30 min 灭活小牛血清,测得维持 3T3 细胞正常存活的最适宜血清浓度为 0.4%—0.8%。接种 3T3 细胞密度亦很重要,接种密度太高则因培养孔内细胞过早长至密集状态而导致细胞生长受抑制,其 NAG 酶活性反而下降;接种密度太低则因检测方法灵敏度不够而影响结果,故接种细胞密度

与细胞生长速度、培养时间有关,细胞生长较快、培养时间长则接种密度宜低,反之接种密度可高一些,本实验于培养 48 h 检测 NAG 酶活性时 3T3 细胞接种密度以 10^3 — 1.5×10^3 个/孔(96 孔培养板)为宜。

目前检测 NAG 酶活性有两种方法:我们采用荧光法以 4MU-NAG 为底物,需在荧光分光光度计上测结果;另一种方法——比色法以 P-硝基酚-NAG 为底物,需在酶联免疫检测仪上比色测定结果^[10]。这两种方法原理相同,灵敏度较高,能用于 96 孔培养板中细胞数目的检测。3T3 细胞 NAG 酶活性荧光测定法系微量测定方法,消耗试剂少而且所用试剂均有国产供应,成本低,适宜于推广应用。

摘 要

设计采用 NAG 酶活性荧光测定法检测 3T3 细胞增殖,本实验确立了检测 3T3 细胞 NAG 酶活性的一些实验条件,并将该方法用于 bFGF 的生物活性鉴定。结果:(1) 3T3 细胞数目在 10^3 — 1.5×10^5 之间与 NAG 酶活性成直线关系,且检测下限细胞数目低达 10^3 个细胞,表明该方法灵敏度高。(2) 接种 3T3 细胞密度以 10^3 — 1.5×10^3 /孔(96 孔培养板)为宜。(3) 维持 3T3 细胞正常成活的最适血清浓度为 0.4%—0.8%。(4) 检测 3T3 细胞 NAG 酶活性以样品刺激培养 48 h 为宜。(5) bFGF 样品与标准品一样能促进 3T3 细胞增殖,但 bFGF 样品生物活性较 bFGF 标准品差。结论:NAG 酶活性测定法能用来检测 3T3 细胞增殖,该方

法优于以往的细胞计数法、³H-TdR 参入法。

· 关键词: 4-甲基伞形酮-乙酰氨基葡萄糖苷 3T3 细胞 碱性成纤维细胞生长因子

参 考 文 献

- [1] Gospodarowicz D. 1990, *Clin Orthop Relat Res.*, 257:231.
 [2] Tsuboi R. et al. 1990, *J Exp Med.*, 172: 245.
 [3] Cuevas P, et al. 1988, *Biochem Biophys Res Commun.*, 156:(2):611.
 [4] Aspenberg P, et al. 1991, *Acta Orthop Scand.*, 62:(5):481.
 [5] Kiyota Y, et al. 1991, *Brain Research.*, 545:322.
 [6] Gospodarowicz D. et al. 1974. *Nature*, 249: 123.
 [7] Mccarthy TL, et al. 1989, *Endocrinology*, 125(4):2118.
 [8] Landegren U. 1984, *J Immunol Methods*, 47(4):379.
 [9] 彭代智等, 1993, *中华外科杂志*, 31(8):501.
 [10] 郑杭民等, 1990, *免疫学杂志*, 6(1):45.

DETERMINATION OF 3T3 CELL PROLIFERATION BY MONITORING N-acetyl-β-D-GLUCOSAMINIDASE ACTIVITY AND ITS APPLICATION

DING Huan Wen SU Zeng Gui

(Department of Orthopedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou, 510010)

HE Xi Huang

(Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 400038)

ABSTRACT

In the present study 3T3 cell numbers were determined by monitoring its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity. We studied the experimental condition of the method, and the bioactivity of bFGF was determined by the method. It was found that 3T3 cell numbers are proportional to its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity. The experimental condition: 1. 3T3 cells were seeded to 96-well Micro Test plate about 10^3 — 1.5×10^3 per well. 2. 3T3 cells has a maximal response to bFGF when they were maintained in a low serum concentration between 0.4% and 0.8% calf serum. 3. N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity of 3T3 cells should be monitored after 48 hours of culture. 4. bFGF samples stimulated 3T3 cells proliferation as bFGF standard. Therefore 3T3 cell numbers can be determined by monitoring its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity.

Key words: 4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide 3T3 cell Basic fibroblast growth factor

用改进的 Mg^{++} 沉淀多聚核糖体法分离胞质 mRNA

张西平 黄磊 张楚瑜 王鄂生

(武汉大学生命科学学院 430072)

夏伏建

(中国农科院油料作物研究所 武汉 430062)

mRNA 的分离对于基因表达的调控, 核酸结构的分析及基因工程等方面的研究是十分重要的手段和工具。提取细胞 mRNA 目前大多采

用异硫氰酸胍^[1]或酸酚方法^[2]得到总 RNA, 继而用 oligo(dT)-纤维素层析柱或偶联有 oligo(dT)的磁珠纯化 mRNA。这些方法不需超离