

- [8] Stubblefield, E., 1971, *Chromosoma*, 32: 262—294.
 [9] Bahr, G. F. et al., 1974, *Chromosoma*,

46:247—254.

- [10] Elspath, M. J. et al., 1986, *Chromosoma*, 94395—402.

实验技术

胞质分裂阻滞细胞的微核检测及方法学初步研究

沈宗丽 薛开光

(南京江苏省肿瘤防治研究所)

培养人体外周血淋巴细胞的微核检测,是近年来常用的体外短期检测方法之一,可用来评价被检理化因子对人体细胞的遗传毒性,及监测环境、职业接触等有害因子对人类的潜在致癌作用。为了进一步提高该方法的敏感性,根据微核起源于染色体断片与落后染色体的观点, Fenech 等用松胞素-B (Cytochalasin-B, Cyt-B) 阻滞胞质分裂,计数 CB-双核细胞微核^[1]。应用这种胞质分裂阻滞微核测试法 (CB-MNT), 检测不同年龄健康人的自发微核率 (MNF), 发现较常规法敏感^[2]。近来还用于生物剂量计的研究^[3,4]。进一步将 CB-MNT 用于动物细胞, 评价化学品的遗传毒性与细胞动力学效应, 发现亦优于常规法^[5,6]。看来 CB-MNT 是一个有价值的短期检测方法, 但国内尚未见较详细的方法学报告, 故现将本实验室应用此法的体会和一些方法学的初步研究简报如下, 以供参考。

实验程序

1. 检测细胞的培养 人体外周血全血或富集白细胞层、分离淋巴细胞均可用于培养, 一般培养方法与以往报告相同^[4,7]。近来有人把啮齿类动物的外周血淋巴细胞或细胞系作为检测的细胞系统^[5,6]。

2. 细胞的处理 各种放射线如 X 线, r 线等可在培养前先行照射全血^[3,4], 化学品常与 Cyt-B 同时加入培养物。在小鼠可体内给药, 体外培养外周血。

3. 胞质分裂阻断 在全血培养后 44 小时加入终浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Cyt-B, 并同时加入不同处理浓度的化学品, 但不同的细胞测试系统加入 Cyt-B 时间可不同^[5,6]。Cyt-B 阻断人与动物细胞胞质分裂的最佳浓度亦为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[5,6]。

4. 制片 处理后继续培养 28 小时收获细胞, 制备完整淋巴细胞微核片, Giemsa 染色 (pH 6.8 PB)。细胞的处理时间视检测细胞系统而定^[5,6]。

5. 观察与分析 通常每个观察组或观察对象, 在油镜下观察 500—1000 个 CB 双核细胞以计数微核, 求出微核率或微核细胞率 (%)。由于不同 MNF 出现的频度呈 Poisson 分布, 故可用相应的统计方法进行处理。如组间平均 MNF 差异的比较可用 μ 检验等。

DMSO 对 MNF 的影响

为了观察加进培养物的 Cyt-B 贮存原液中所含 DMSO 对淋巴细胞 MNF 的影响, 我们在 5 例供血员的每瓶培养物中加入相当于原液所含量的 DMSO 7.5 μl , 设置空白对照 (原液用培养液稀释), 结果表明原液中所含量的 DMSO 对淋巴细胞 MNF 无明显影响 (参见表 1)。

表 1 DMSO 对健康人淋巴细胞 MNF 的影响

	对 照	DMSO
例 数	5	5
观察淋巴细胞数(个)	13,090	19,500
MNF(%)	6.187 \pm 5.976	5.699 \pm 4.721

CB-MNT 与常规法 C-MNT 健康人 MNF 的比较

本实验共在 8 例健康供血员中, 比较了常规法与 CB-MNT 的自发 MNF, 结果表明 CB-MNT 的平均 MNF 明显高于常规法 (参见表 2), 这与以往报告的相同^[2]。但两法检测理化因子诱发微核的敏感性, 尚待进一步研究。

表 2 CB-MNT 与 C-MNT 健康人 MNF 的比较

例数	CB-MNT	C-MNT	P 值
MNF*	8	8.30 \pm 6.00	5.71 \pm 4.76 < 0.05

* CB 法 MNF = 微核数/500 个 CB 双核细胞
 常规法 MNF = 微核数/1000 个单核淋巴细胞

注 意 事 项

1. Cyt-B的配制 Cyt-B多用Sigma试剂公司的产品,实验前用二甲基亚砜(DMSO)配成2 mg/ml的原液,按每次用量分装保存于-70℃左右(-40°至-80℃)的低温冰箱中。Cyt-B的贮存与实验过程中应注意避光。根据我们的经验,原液贮存过程中效价下降,至3个月已很明显,故应及时使用。

2. 获得分散良好、染色清晰的完整淋巴细胞制片,对准确计数微核至关重要。根据我们实验室的多年实践,目前报告的方法欠理想,最近我们建立的低渗、中止、减少固定液中冰

醋酸用量的改良制片法,结果尚称满意^[4,7]。

参 考 文 献

- [1] Fenech, M. et al., 1985, *Mutat Res.*, 147: 29.
- [2] Fenech, M. et al., 1986, *Mutat Res.*, 161: 193.
- [3] Kormos, C. et al., 1988, *Mutat Res.*, 199: 31.
- [4] Xue, KX. (薛开先) et al., 1991, *J Chinese Genet.*, (in press).
- [5] Krishna, G. et al., 1989, *Mutat Res.*, 222: 63.
- [6] Erexson, GL. et al., 1987, *Mutat Res.*, 178: 117.
- [7] 马国建等, 1989, *细胞生物学杂志*, 11: 143.

新生大鼠顶盖脑组织提取液的高效液相色谱分析

周明华 林斯骏 吴玺印 邱鹏新

(香港大学医学院解剖学系)

任麟孙

(香港中文大学医学院解剖学系)

最近 Barde 指出,在培养中神经元迅速死亡的原因之一,是该神经元得不到靶组织提供的诱向因子(trophic factor)^[1]。作者的实验清楚表明,在培养初生大鼠的视网膜神经细胞中,加有一定的顶盖提取液,其神经细胞活跃生长、胞体增大^[2,3],提示此提取液是有生物活性的。前不久作者曾对顶盖提取液进行了电泳分离^[4],并用以直接培养视网膜神经细胞,再次显示出它的生物效应^[5]。为此,我们采用分离微量生物大分子蛋白质的有效方法^[6,7]的高

效液相色谱法(HRLC)*,来分析顶盖脑组织提取液的生物大分子。

材 料 与 方 法

1. 仪器 Bio-Red 700 型高效液相色谱仪(HRLC 美国); Bio-Rad 1306 型 UV 检测器,波长 280 nm; Bio-Sil SEC-125 分子筛层析柱(规格见下表)和 Bio-Sil SEC 保护柱 75×7.5 mm。新一代 HRLC 用钛替代了不锈钢,在溶剂传送管道中用氟化多聚物(fluoropolymer)抗腐蚀;并用二氧化硅代替树脂。这样使仪

Bio-Sil SEC-125 柱的性能

长度(mm)	粒度(μm)	孔径(nm)	分离蛋白范围(D)	负荷样品(mg)	标准流速 ml/min	pH
600×7.5	10±2	12.5	5000—100000	0.001—1.5	1.0	2—7

Bio-Sil SEC-125 柱和 Bio-Sil SEC 保护柱系日本国产

本研究由香港大学、医学院、裘槎 3600310792 和 UPGC 221400030 等基金资助。

* HRLC 系 High Resolution Liquid Chromatography 的缩写,是新一代的 HPLC,由美国 Bio-Rad 公司赞助,谨表衷心感谢。