

有关。有人<sup>[8]</sup>观察到大蒜根尖细胞,在M期的早前期,染色线的螺旋结构并不紧密,晚前期才进一步螺旋化,前中期则比晚前期更加紧密,形成染色体。

形态定量测量是集先进的计算机、图像处理、模式识别和定量测试为一体的新技术<sup>[1]</sup>,具有客观性强、重复性好等优点。本研究采用该技术对马蛔虫受精卵细胞分裂各期的形态特征进行测量和计算,建立了8个参数组成的细胞二维形态计量参数数据资料。统计学处理结果,有5项参数的显著差异率在83%以上。这5项参数从不同角度反映了M期各期细胞的异型性。选择这些参数进行观测,将有助于分析分裂各期的形态特征变化。目前,有关细胞分裂各期的形态定量测定报道尚不多见,缺乏反映细胞分裂各期形态异型性的定量指标。我们拟进一步根据这些参数,选取其他细胞进行分裂各期的观测,以建立细胞分裂各期的形态定量指标,从而从量的角度进一步分析细胞分裂各期的形态特征变化。

### 摘 要

用彩色图像分析仪,对马蛔虫受精卵有丝

分裂各期进行形态学测量,每期测量50个细胞。从细胞水平测量计算了8项形态计量参数,其中5项参数的显著差异率在83%以上,反映了分裂各期的卵细胞的异型性。这些形态计量参数,为分析细胞有丝分裂形态变化的定量指标提供了参考。

### 参 考 文 献

- [1] 姚志洪, 1990, 上海第二医科大学学报, 10(2): 154—156.
- [2] 汪德耀等, 1988, 普通细胞生物学, 上海科学技术出版社, pp, 335—344.
- [3] Xu Genxing et al, 1991, Proceeding of Xi'an Satellite Conference of 1991 World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, D<sub>4-3</sub>
- [4] 吕维雪, 1989, 医学图象处理, 北京, 高等教育出版社, pp, 251—265.
- [5] Nobuyuki Ostu, 1979, A threshold selection method from grey-level histogram, *IEEE Transaction on SMC*, 9(1): 62—66.
- [6] 王积分等, 1988, 计算机图像识别, 北京, 中国铁道出版社, pp, 352—355.
- [7] 周宁新等, 1985, 细胞生物学杂志, 7(4): 177—178.
- [8] 牛怡聪等, 1989, 实验生物学报, 22(1): 9—11.

## 一种快速简便检测 TGF- $\beta$ 生物活性的细胞光度比色法\*

吴 军 季闻行

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

转化生长因子是一类影响细胞生长和表型的生物活性多肽<sup>[1]</sup>。它在不同靶细胞和微环境下,不仅具有刺激或抑制细胞生长、诱导细胞分化和其它多种生物学效应<sup>[2]</sup>,还能引起一些正常细胞失去接触抑制,转化成为锚着不依赖生长。通常利用这种特性使长在软琼脂上的成纤维细胞形成细胞集落来检测TGF- $\beta$ 活性<sup>[3]</sup>。此法操作繁琐,周期长至一周以上。另一种检测TGF- $\beta$ 活性方法是利用TGF- $\beta$ 能抑制貂肺

上皮细胞(CCL/64)生长的特性<sup>[4]</sup>,结合放射性同位素<sup>3</sup>H-TdR标记技术,测定<sup>3</sup>H-TdR参入细胞的脉冲数,计算出TGF- $\beta$ 抑制CCL/64细胞生长的抑制率。但此法需要放射性同位素实验设备,操作也不简便。

最近,我们实验室在分离纯化人血小板的TGF- $\beta$  1和测其生物活性过程中,利用最新发

\* 施涓康老师对本文实验提出了宝贵的意见,并对本文作了多次修改,特表谢意。

展的96孔板光度比色法[5]测定了TGF- $\beta$  1活性,效果甚好。此法同样运用TGF- $\beta$ 对CCL/64细胞生长的抑制,用细胞染色代替放射性同位素标记,具有操作简便,实验周期短、所得结果满意等优点。本文介绍这种方法的具体程序。

### 材料与 方法

1. CCL/64细胞的96孔板培养 将CCL/64细胞培养在含有15%小牛血清(BS)的DMEM培养液中,接种在培养瓶里(接种量 $5 \times 10^5/5$  ml)。3—4天后,用0.5%胰酶消化细胞,5—10秒,离心,收集,用由DMEM、0.5%牛血清白蛋白(BSA)、10 mmol/L pH 7.4 HEPES、100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素组成的培养液(简称DMEM/A/H液)洗涤1次后,将细胞悬浮于DMEM/A/H液中,滴种入96孔培养板内, $1.25 \times 10^4$ — $4 \times 10^4$ 细胞/200  $\mu$ l/孔,放入37 $^{\circ}$ C、0.5%CO<sub>2</sub>培养箱内。每批实验种入每孔的细胞数应该相同。由于96孔板边缘孔内的培养液易受到蒸发而影响细胞生长,因此在板四周36孔内填满无细胞的DMEM/A/H培养液,并作光度比色时板的空白对照用。

2. 加入TGF- $\beta$  1样品 CCL/64细胞在96孔板培养2小时后,将含有不同浓度的人血小板来源的TGF- $\beta$  1样品的DMEM/A/H培养液直接滴入种有细胞

$$\text{CCL/64细胞生长抑制率(\%)} = \frac{(\text{不加 TGF-}\beta \text{ 对照组} - \text{加 TGF-}\beta \text{ 实验组}) \text{O.D值或细胞数}}{\text{不加 TGF-}\beta \text{ 对照组的 O.D值或细胞数}}$$

### 结果和 讨论

为了确定生长的CCL/64细胞数与光密度(O.D值)的线性关系,在做TGF- $\beta$ 活性测定前,应将CCL/64细胞准确计数,并做系列稀释后再进行96孔板培养。在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养6—8小时,待细胞完全贴壁后直接用甲烯蓝染色,测其O.D值,作出CCL/64细胞数与光密度关系图(见图1),可得出CCL/64细胞数与O.D值呈线性关系,简化成计算细胞数的公式(见材料和方法5)。在此实验中我们在96孔板内接种细胞数为 $1.25 \times 10^4$ — $20 \times 10^4$ /孔。对于测试TGF- $\beta$  1活性而言,最佳接种数为 $2.5 \times 10^4$ /孔细胞。若接种细胞基数过

的孔内,50—100  $\mu$ l/孔,所有检测样品至少一式三份。37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,48小时,从培养箱中取出,将96孔板倒置倾去培养液,并用DMEM/A/H液轻洗一次,要避免细胞脱落。

3. 细胞的固定与染色 板孔经轻洗后,用10%福尔马林溶液固定,100  $\mu$ l/孔,室温,30分钟。接着用pH 8.5 10 mmol/L磷酸缓冲液配制成的1%甲烯蓝(methylene blue)溶液进行染色,100  $\mu$ l/孔。在未加细胞的96孔板周围孔内同样加入染色液,作光度比色时板的空白对照测试用。置室温,30分钟后,再用同上的磷酸缓冲液洗涤4次,10—15秒/次,每次洗涤都应用缓冲液填满板内所有孔,将板翻转去除缓冲液,并放在吸水纸上轻拍干。每批实验的96孔板洗涤应注意包括洗涤次数等操作条件一致性,否则会影响结果。

4. 溶解细胞及光密度(O.D)值测量 甲烯蓝染液染过的96孔板内加入以0.1 mol/L盐酸:乙醇=1:1配制成的酸溶液,200  $\mu$ l/孔,溶解细胞,溶液呈蓝色,混匀,用酶联免疫分光光度计测定波长630 nm的O.D值。

#### 5. 细胞数与TGF- $\beta$ 对细胞生长抑制率的计算

$$\text{细胞数/孔} = (A_{630} - 0.102) \times 1.20 \times 10^5$$

$A_{630}$ 表示被测孔在波长630 nm的O.D值。0.102表示无细胞而被染色的孔的O.D值平均值,1.20  $\times 10^5$ 表示O.D值为1时的细胞数。

多,则不加TGF- $\beta$  1的对照组因增殖而使细胞数也相应地过多,致使所得O.D值往往不与

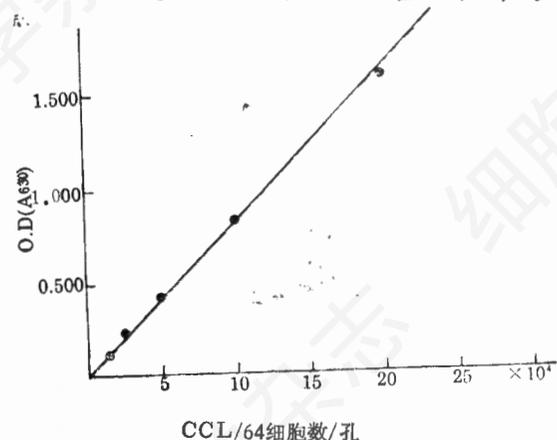


图1 染色的CCL/64细胞数与 $A_{630}$ 光密度值的关系

细胞数呈线性关系(见图1)。

我们在测试 TGF- $\beta$  1 生物活性的实验中, 加 TGF- $\beta$  1 浓度范围为 0.1—10  $\mu\text{g/ml}$ 。每组作三孔测定, 取其 O.D 值的平均值, 然后计算出 TGF- $\beta$  1 每一浓度时的细胞数, 计算对 CCL/64 细胞生长抑制率。结果明确显示, 随着 TGF- $\beta$  1 浓度增加, CCL/64 细胞生长抑制

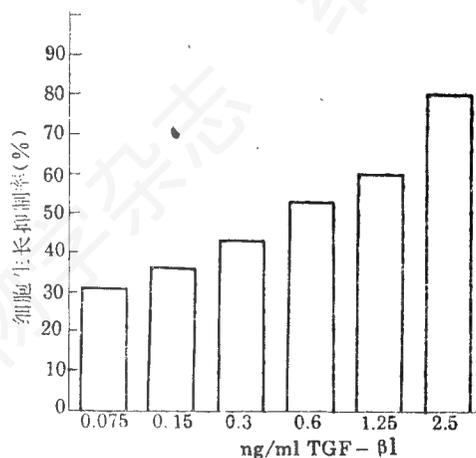


图 2 不同浓度 TGF- $\beta$  1 对 CCL/64 细胞生长的抑制。

细胞接种量  $2.5 \times 10^4$ /孔

## 经验交流

### 一种快速分离真核细胞 RNA 的方法\*

顾建明 吴庆宇 王晓冬 李佩霞 阮长耿

(苏州, 江苏省血液研究所, 苏州医学院血栓与止血研究室, 215007)

RNA 的制备和纯化是分子生物学研究中极为重要的一环, 在 cDNA 文库的建立、细胞基因表达研究等方面都是不可缺少的。大量 RNA 的取得通常是采用氯化铯超速离心方法, 这个方法的缺点在于需要长时间的超速离心, 且需要昂贵的试剂与仪器设备。为了克服该方法的缺点, 我们参考了 Chomczynski 等人<sup>[1]</sup>的

率也增加(图 2)。

多孔比色法除了测定 TGF- $\beta$  活性外, 同样也可用作测定其它细胞生长因子对靶细胞生长抑制或促进的活性[6]。我们曾应用这一方法测定了人或动物一些贴壁生长细胞系的生长曲线, 结果表示比常规手掀式计数器计数更精确、方便(未发表资料)。这种甲烯蓝染色法预期将可用于检测化疗药物、细胞毒素等对肿瘤细胞或其它靶细胞生长影响研究中。

## 参考文献

- [1] De Larco, J. E., et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 4001—4005.
- [2] Sporn, M. B., et al., 1986, *Science*, 233: 532—534.
- [3] Assoian, R. K., et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 27: 739—746.
- [4] Ikeda, T., et al., 1987, *Biochem.*, 26: 2406—2416.
- [5] Absher, M., et al., 1991, *J. Immunol. Methods.*, 138: 301—303.
- [6] Oliver, H., et al., 1989, *J. Cell. Sci.*, 92: 513—518.

工作, 经过摸索和改进, 用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿抽提及两次异丙醇沉淀, 可制备到较纯的真核细胞 RNA, 能满足各种实验的要求。此法简便、快速、无需特殊仪器要求, 现介绍如下。

\* 国家自然科学基金会资助课题。

本文制图得到过宇同志大力支持, 特此致谢。