

两栖类蝌蚪个体小,难以用通常在成体中使用的的方法来制备染色体。Di Berardino曾采用蝌蚪尾尖压片法制备染色体^[1],但用这种方法获得的染色体中期分裂相比较少,染色体分散程度常不理想,易受人为因素影响。考虑到蝌蚪期坚硬的骨骼系统尚未形成,许多组织的细胞都处于旺盛的分裂时期,这就为用整体蝌蚪制备染色体提供了条件。我们的体会是,整体解离法简便可靠,一般能得到大量的分散适度的中期分裂相,适用于无尾和有尾两栖类蝌蚪染色体组型的研究。为了制得较理想的染色体分裂相,有以下几点需引起注意:

1. 为了减少匀浆时细胞破裂,利于制备单细胞悬液,应在秋水仙素处理的同时,处死蝌蚪,置无 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的两栖类分离液中培养,促使组织细胞间粘着松散。抽动匀浆器时应轻缓,不要用力挤压。

2. 如所取材料为发育较早时期的蝌蚪(36期—40期),最好将其腹部含大量卵黄的细胞除去,以免影响细胞匀浆和悬浮。

3. 蝌蚪期肌肉已分化形成,呈纵长纤维状,匀浆后,肌纤维通常不易悬浮,而其他细胞经低渗处理后,细胞体积胀大,如有相互缠绕的粗糙肌纤维存在,在随后的离心、固定过程中,细胞与这些粗大纤维摩擦,极易破裂,导致中期分裂相大大减少。因此,在低渗前,需将不悬浮的肌纤维除去。

4. 由于本实验是用整体材料培养,制备染色体时,秋水仙素处理时间需较长。另外,低渗处理直接关系到染色体制片的成败,一定要掌握适当的低渗时间,既要使细胞得到充分膨胀,又要使细胞不至于破碎。

摘 要

长期以来,两栖类蝌蚪细胞染色体标本的制备一直沿用压片法,该法可靠性较差。作者根据蝌蚪期细胞分裂旺盛的特点,用整体蝌蚪为材料,在秋水仙素处理的同时,利用两栖类分离液解离并辅以匀浆器离散组织,使得一次操作能获得大量分散适度的中期分裂相染色体。整体解离法简便可靠,能制得质量较好的染色体玻片标本。

参 考 文 献

- [1] Di Berardino, M. A., 1962, *Develop. Biol.* 5(1): 101—126.
- [2] Yamamoto, K. Y., K. Yamazaki, and Y. Kato., 1980. *Develop., growth and differ.* 22 (2): 79—92.
- [3] Sharma, A. K. and A. Sharma., 1980. *Chromosome Techniques. Third Edition Butterworth and CO. London Boston.*
- [4] 吴政安, 1982, *遗传*, 4(1): 38—39.
- [5] Nieuwkoop, P. D. and Faber, J., 1967. *In Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Co.*

测定粒单系集落刺激因子的³H-TdR掺入的微量培养方法

张明伟 黎 燕 唐佩弦

(军事医学科学院基础医学研究所)

随着许多造血细胞增殖、分化、生长因子的纯化及分子重组克隆技术的发展,人们希望能在较短的时间内,用较简单的方法对造血细胞生长因子的活性进行定性和定量分析。以往许多实验室多采用琼脂或甲基纤维素的半固体

培养方法^[1,2],对造血生长因子的生物活性进行定性和定量测定。本文采用³H-TdR掺入的微量培养方法^[3],通过培养中粒单系祖细胞增殖时DNA合成量的变化来观察CFU-GM的增殖状态。并与琼脂半固体培养结果相对应,

以便在较短时间内用较简单的方法确定所筛选的各类造血调控活性物质。

材料和方法

一、实验动物 LACA 种系成年小鼠, ♀或♂。

二、 $^3\text{H-TdR}$ 比放射性 32 mCi/mmol, 放射性强度 1 mCi/ml; 注射量 25 $\mu\text{Ci/ml}$ 。

三、闪烁液配方 PPO 2 g, POPOP 0.1 g 溶解在 1000 ml 甲苯中。

四、小鼠肺组织条件液的制备 按^[4]的方法。

五、培养液 RPMI 1640 培养液(GIBCO), 含青霉素 100 u/ml, 链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

六、血清 小牛血清, 批号 861022, 购于浙江, 马血清, 904*, 购于北京。

七、骨髓细胞制备 断颈活杀小鼠, 取股骨用 RPMI 1640 培养液冲出全部细胞, 过 4 号针头制成单细胞悬液。

八、培养体系 10% 肺条件液, 40% 小牛血清, 骨髓细胞浓度为 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞, 总体积为 2 ml。充分混匀后加入 40 孔或 96 孔培养板中, 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 5% CO_2 培养。培养第 4 天加 $^3\text{H-TdR}$ 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$, 6 小时后终止培养。将细胞收集在玻璃纤维膜片上, 用 10% 三氯醋酸固定, 反复用生理盐水洗掉游离的 $^3\text{H-TdR}$, 80°C 烘干膜片。放入含 5 ml 闪烁液的闪烁瓶中, 在 LKB 闪烁仪上测量。同时用 0.4% 台酚蓝染色计数活细胞, 最后计算 $\text{cpm}/10^5$ 细胞。

实验结果

一、骨髓细胞不同时间内的增殖变化

图 1 表明骨髓细胞 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$, 小牛血清 40%, 肺条件液 10% 的培养体系, 在培养第 3 天后细胞呈线性关系增长, 第 6 天时, 活细胞数量明显减少。微量培养体系在一定时间内能适应骨髓细胞的增殖。因此我们选择培养第 4 天做 $^3\text{H-TdR}$ 掺入, 通过细胞 DNA 合成量的变化来观察细胞增殖情况。

二、细胞浓度与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的关系

随着培养体系中细胞浓度的增加, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量也增加, 但当细胞数增加到一定程度时 (15×10^5 个细胞/ml), $^3\text{H-TdR}$ 掺入量不再增

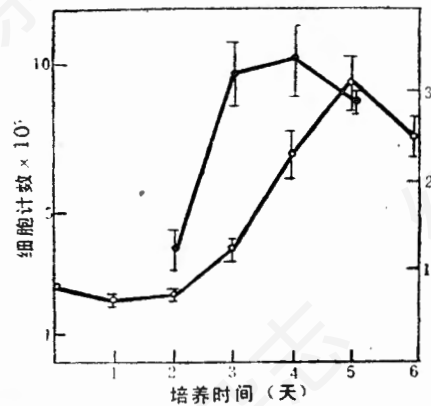


图 1 不同培养时间骨髓细胞增殖与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的关系

(实验均重复三次以上)

●—● r/min
○—○ 细胞计数

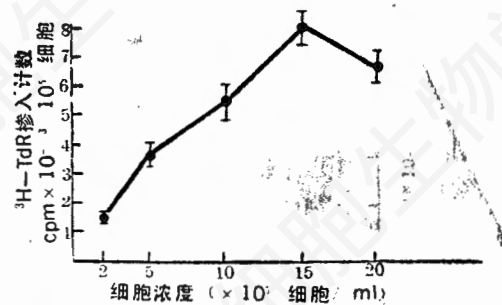


图 2 培养体系中细胞浓度与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量的关系

加, 细胞数继续增加到 20×10^5 个细胞/ml 时, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量反而下降(图 2)。说明微量培养体系中细胞数量超过 15×10^5 个细胞/ml 时直接影响其增殖状态。

三、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量与掺入时间的关系

为选择一个能正确反应出细胞增殖状态的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入时间, 本实验在培养第 4 天加入 $^3\text{H-TdR}$ 后的不同时间内测定 $^3\text{H-TdR}$ 掺入。图 3 表明随着 $^3\text{H-TdR}$ 掺入时间的延长, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量也呈线性关系增长。说明掺入时间从 3—24 小时都能正确反应出细胞的增殖, 为实验方便, 我们在实验中均选择 6 小时掺入时间。

$^3\text{H-TdR}$ 掺入剂量在 $0.2 \mu\text{Ci}—0.8 \mu\text{Ci}/10^5$

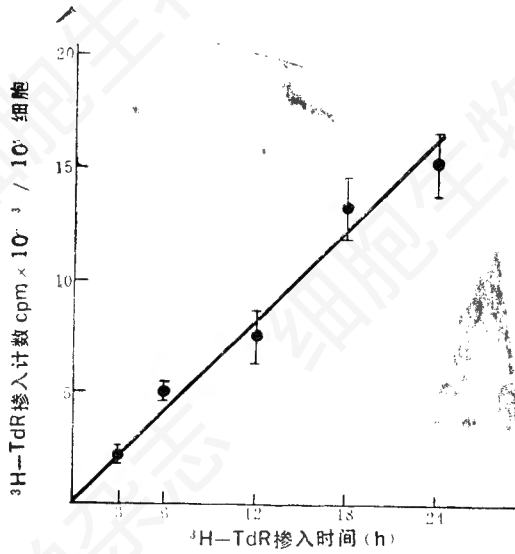


图 3 ³H-TdR 掺入时间的长短与所测的 cpm 之间的关系

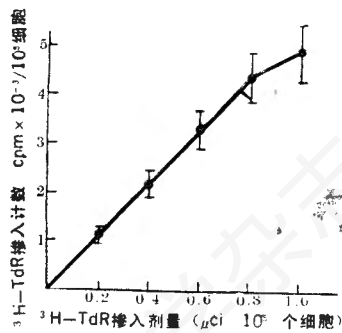


图 4 ³H-TdR 掺入的 cpm 与掺入的剂量关系

个细胞的范围内与样品中 ³H-TdR 计数值之间有一个较好的线性关系(图 4)，根据以上实验结果，在 CFU-GM 增殖状态的测定中，我们选择 ³H-TdR 掺入剂量为 0.4 μCi/10⁵ 个细胞。

四、不同血清和血清浓度对 ³H-TdR 掺入的影响

实验中我们分别把马血清和小牛血清按不同浓度加入到培养体系中，小牛血清浓度在 10%—40% 时，³H-TdR 掺入没有明显变化(图 5)。马血清浓度在 10%—30% 时也无明显差别(图 6)，因此培养体系中血清浓度一般选择范围为 10%—30% 之间。

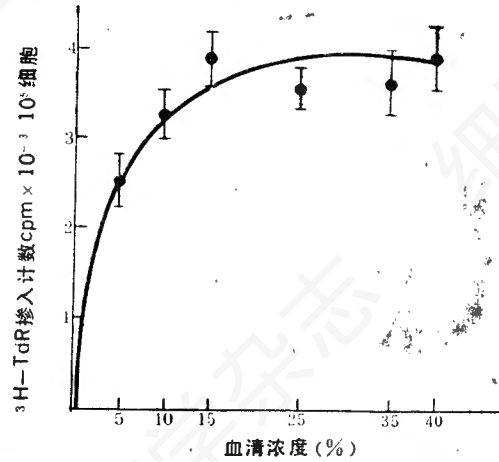


图 5 小牛血清不同浓度对 ³H-TdR 掺入的影响

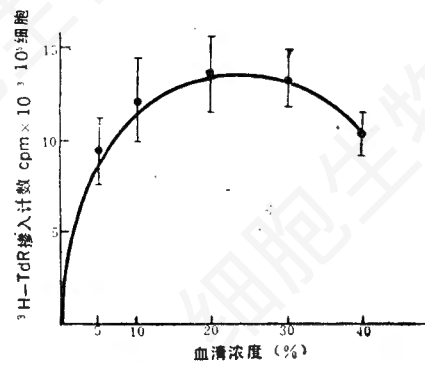


图 6 马血清不同浓度对 ³H-TdR 掺入的影响

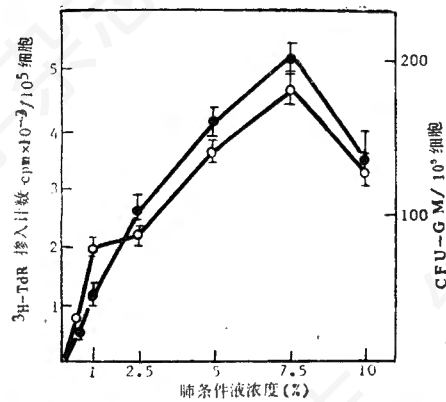


图 7 不同浓度肺条件液下 ³H-TdR 掺入与琼脂培养中 CFU-GM 生成的比较

五、不同浓度肺条件液微量培养 ³H-TdR 掺入法与琼脂培养法的比较

为了证实微量培养方法能否正确反映出 CFU-GM 的增殖状态,本实验在不同浓度肺条件液作用下,用微量培养方法测定 $^3\text{H-TdR}$ 掺入值与琼脂培养法测定的集落数加以比较(图7)。结果表明,两组实验数据几乎平行(相关系数为 $r=0.98$),微量培养方法能够反应出 CFU-GM 的增殖状态。

讨 论

$^3\text{H-TdR}$ 掺入是利用细胞在增殖过程中 DNA 合成原理实现的, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量的多少取决于细胞增殖程度。与琼脂半固体培养 CFU-GM 方法相比较后,其优点:(1)培养周期短,琼脂培养7天,此方法只需要4天,被筛选的造血调控物质活性可较快地得到测定。(2)操作较简单,可以节省血清、培养液和被测样品的用量。(3)测定效果好,在琼脂 CFU-GM 培养集落计数时,50个以上细胞团为一个集落,上千个细胞的细胞团也计为一个集落,这就给正确反应造血调控物质活性的高低造成一定误差。利用微量培养的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入计数值,反映 DNA 合成的多少,从而正确

反应出造血细胞的增殖状态。而且还可以克服不同实验室或不同操作者在计数 CFU-GM 时的主观误差。

摘 要

在小鼠骨髓细胞体外微量液体培养中,通过观察 DNA 合成时 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量的变化,来测定粒单系祖细胞的增殖状态。实验结果表明:此方法具有培养周期短,操作较简单,节省培养材料和被测样品量少等优点。在与体外半固体琼脂 CFU-GM 培养法相配合中,能正确反应出被测样品对粒单系祖细胞的增殖状态和增殖能力。

参 考 文 献

- [1] 唐佩弦、杨天樞主编,1985年,造血细胞培养技术 206—213,陕西人民出版社。
- [2] 黎燕等,1987,实验生物学报,20(3):389—391。
- [3] Horak, H. et al., 1983, *J Immunol Met.* 56: 253—260。
- [4] 江飞子等,1986,实验生物学报,19(2): 203—210。

用 FDA-PI 双色荧光法鉴定大麦原生质体活性*

黄 纯 农

(杭州大学生物系)

大麦糊粉层原生质体是研究 α -淀粉酶合成和分泌基因表达的好材料。在分离原生质体和进一步的实验研究中,原生质体活力鉴定是一个重要环节。Evans 等人对测定植物原生质体活性的方法进行了综合评述^[1],各种常规的染色方法各有特色,但都存在一定的局限性。1985年 Jones 等人介绍了他们在动物培养细胞中应用 FDA-PI 双色荧光法鉴别细胞活力,效果良好^[2]。这项技术在植物细胞学研究上尚

无报道。这里我们介绍用 FDA-PI 法鉴定大麦糊粉层原生质体活性的方法和原理,以及我们创造的一种两次曝光摄影技术,它可以使照片色彩更加鲜艳。

材 料 和 方 法

原生质体的制备和繁育

* 本研究在美国伯克利加州大学植物学系进行