

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

分离大麦糊粉层原生质体的方法基本上按照 Jacobsen 的方法^[3]。取大麦种子, 切除胚部和尾部。再沿种沟切开, 获四分之一的大麦种子, 经 0.25% 次氯酸钠消毒, 在 50 mmol/L 精氨酸溶液中浸泡 24 小时, 然后除去胚乳, 得到连种皮的糊粉层组织。移去细胞壁酶解法: 将糊粉层组织放在原生质分离液中 48 小时, 中间更换一次溶液。原生质体分离液是改良的 Gamborg's B₃ 配方, 不含 2,4-D, 加有 1% 聚乙烯吡咯烷酮 K 25 和 4.5% 的纤维素酶(Onozuka R-10)。然后把酶处理过的糊粉层组织移入原生质体培养液中, 轻轻洗下原生质体, 取出大麦种皮。原生质体培养液是不含 2,4-D 的 B₃ 溶液, 加有 0.65 mol/L 的甘露醇和 5 μmol/L 赤霉素(GA₃)

原生质体在 20—25℃ 条件下培养 96 小时, 在分泌 α-淀粉酶的同时, 原生质体形态发生一系列的变化。此间取材用 FDA-PI 染色, 鉴定原生质体活性。

染料的配制和染色

所用的化学试剂 FDA (Fluorescein diacetate) 和 PI (Propidium iodide) 都是美国 Sigma 化学试剂公司的产品。

5 mg FDA 溶在 1 ml 丙酮中, 避光贮存在 4℃ 的冰箱中。使用时取 0.4 ml FDA 贮存液加入到 5 ml 0.65 mol/L 甘露醇中, 获 FDA 染色溶液。2 mg PI 溶解在 5 ml 0.65 mol/L 的甘露醇中配成 PI 染色溶液。

染色时取 0.2 ml 原生质体悬浮液, FDA 染色溶液和 PI 染色溶液各 0.1 ml, 轻轻混匀。

观察和照相

染色后 1—2 分钟取少量混合液加在载玻片上, 加盖片, 用 Zeiss 标准荧光显微镜观察、计数和照相。用落射荧光照明, 光源为 100 W 的水银灯泡。用包括 450—490 nm 激发滤片, 510 nm 双分色镜和 520 nm 阻挡滤片的 FITC 滤片组进行观察。胶卷用 Kodak Ektachrome ASA 50 灯光型彩色反转片和 Kodak ASA 400 黑白负片。

用 Nikon Microplex UFX 显微摄影仪进行两次曝光摄影, 第一次曝光用绿色激发光, 激发滤片 510—560 nm, 双分色镜 580 nm; 第二次曝光用蓝色激发光, FITC 滤片组再加上 Kp 560 滤片。

结果与讨论

刚制备获得的大麦糊粉层原生质体呈椭圆或形圆形, 直径平均 20—30 μm。在培养的 96

小时期间, 随着 α-淀粉酶的合成和分泌, 原生质的细胞结构发生一系列规律的变化, 特别是细胞质的内液泡形态的改变。用 FDA-PI 染色, 有活力的原生质体发出黄绿色荧光, 仔细观察可以发现荧光只从细胞质发出, 液泡中没有荧光。没有生活力的原生质体呈淡桔黄色, 其细胞核发出强烈荧光。

FDA 即荧光素双醋酸酯是一种非极性的有机化合物, 它可以自由进出原生质体膜, 因为在有生活力的原生质体细胞中酯酶的活性很高, 在酯酶的作用下, FDA 迅速被分解, 放出荧光素(Fluorescein)。荧光素是一种极性化合物, 它很难穿透细胞膜, 便积聚在细胞质内。在蓝色激发光下, 荧光素发出黄绿色的荧光。在没有生活力的原生质体中, 酯酶活性很低, 虽然 FDA 能自由进出原生质体, 但不会发出荧光。因此 FDA 已被认为是一种鉴定细胞活性的特异性很强的指示剂, 它已被广泛应用于花粉、悬浮细胞和原生质体生活力的鉴定^[4,5]。王辅德等人用实验室合成的 FDA 测定植物原生质体的活力, 结果甚好^[6]。

PI 是一种碘化合物, 它不能自由穿过有生活力的原生质体的细胞外膜, 但它能穿过受损伤的细胞膜进入没有生活力的原生质体中。PI 在细胞内与 DNA 和 RNA 相结合, 在蓝色激发光下发出桔黄色的荧光。在荧光显微分光光度术中常用 PI 作为细胞核染料^[7,8]。我们也观察到 PI 能很好地显示出死亡的原生质体和细胞碎片中的细胞核。

在以往的研究中, 人们只是分别利用了 FDA 和 PI 的荧光染色特性, 而 1985 年 Jones 等人首次将这两种染料结合起来, 用于动物组织培养细胞的活性鉴定, 这是一次成功的尝试。我们对大麦原生质体的试验研究, 同样证实 FDA-PI 双色荧光法是适用于植物细胞。在糊粉层原生质体活性鉴定的研究中, 活性高的原生质发出强烈的黄绿色荧光, 活性低的稍显黄绿色, 没有生活力的死亡原生质体和细胞碎片是桔黄色, 特别含有大量 DNA 的细胞核发

出强烈的荧光。在所用的 FITC 滤片组的光学条件下, 桔黄和绿色可以在视野中同时显现出来, 这不但可以使我们一目了然地估计出在群体中有生活力和没有生活力原生质体的大致比例, 而且便于计数, 在彩色照片上可以看到鲜明的色彩对比效果。实验证实 FDA-PI 对培养细胞毒性很低, 平时常规的光学颜色染料(如 Trypanblue), 细胞必须在数分钟内完成观察和统计, 否则大量有活性的细胞会被染料毒害致死, 而 FDA-PI 具有毒性很低的优点, 有助于有活性细胞的准确计数^[2]。因此, 我们认为 FDA-PI 是一种很有效的原生质体活性鉴定的方法。

为了使所拍摄照片不同活性的原生质体有更好的色彩区分效果。我们建立了一种两次曝光的技术: 第一次曝光用 Rhodamine 滤光片组(即激发滤片 510—560 nm, 双分色镜 580 nm)在绿色的激发光下, 这时只能看到没有生活力的原生质体, 它的细胞核染成鲜艳的红色(图 3); 第二次曝光用 FITC 滤片组加上 Kp 560, 这样的光学条件下只能观察到有生活力的原生质体, 其细胞质发生亮绿色(图 2); 两次曝光的结果见图 4。图 1 则是同一视野的透射光相差显微照片。在进行两次曝光摄影时必须注意底片曝光时间的掌握, 因为摄影中所用的底片对红、绿两种颜色反应的敏感程度有较大的差异, 在进行拍照时如用自动曝光控制摄影装置, 需经过预先的测试以达到最恰当的曝光, 在具体操作时, 曝光系数调整按钮可以帮助我们达到预期目的。

摘 要

为鉴定大麦糊粉层原生质体的活性, 应用了荧光染料荧光素双醋酸酯(FDA)和普罗皮啉

碘(PI)。在 FITC 滤片组合条件下用荧光显微镜观察, 有生活力的原生质体发出绿色荧光, 而没有生活力的原生质体细胞核呈桔黄色。FDA-PI 双色荧光法具有色彩对比鲜明的效果, 从而为细胞计数和活力测定提供了方便。本文还介绍了一种在同一张底片上进行两次曝光的彩色摄影记录新技术。

图 版 说 明

图 1—4. 用 FDA-PI 染色的大麦糊粉层原生质体。同一视野在不同光学条件下拍摄的照片。×350

图 1 相差显微照片。

图 2 落射荧光, 用 FITC 滤片组 + Kp 560 滤色片。显示有生活力的原生质体, 细胞质发出绿色荧光。

图 3 落射荧光, 用 Rhodamine 滤片组。没有生活力的原生质体细胞核发出红色荧光。

图 4 两次曝光技术拍的照片。同时显示有生活力的原生质体(细胞质绿色)和无生活力的原生质体(细胞核红色)。

参 考 文 献

- [1] Evans, D. A., et al., 1983, In Handbook of Plant Cell Culture. New York: MacMillan Publishing Co.
- [2] Jones, K. H., et al., 1985, *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 77-79.
- [3] Jacobsen, J. V., et al., 1985, *Planta.*, 163: 430-438.
- [4] Heslop-Harrison, J., et al., 1970, *Stain Technol.*, 45: 115-120.
- [5] Widholm, J. M., 1972, *Stain Technol.*, 47: 189-194.
- [6] 王辅德等, 1983, 细胞生物学杂志, (5): 16-18.
- [7] Krishan, A., 1975, *J. Cell Biol.*, 66: 188.
- [8] Hamilton, V. T., et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 1125.