

一种快速简便的完整淋巴细胞微核制片法

马国建 薛开先

(江苏省肿瘤防治研究所)

微核测定是常用的短期测试法之一, 可用来评价各种理化因子的诱变和潜在的致癌效应。为了发展人类细胞的检测系统, Heddle 等首先研究了辐射对体外培养人外周血淋巴细胞微核的影响^[1], 由于采用染色体制片技术, 故细胞膜破裂, 精确计数微核有困难, 后来一些作者采用改变低渗液或培养物直接推片等方法, 制备完整淋巴细胞微核片^[2-4], 但仍常因有过多的细胞破裂、絮状沉淀包裹细胞影响染色或红细胞挤压淋巴细胞等原因, 而不能稳定地获得高质量的制片。为此, 我们在以往工作的基础上^[5]进一步改良, 建立了更为简便的完整淋巴细胞微核制片法, 经一年多的应用, 制片重复性良好。

制片程序

1. 新鲜肝素抗凝血 0.3 ml, 加入 4.7 ml 含有 10% 小牛血清、0.2 ml 2% PHA 的 RPMI 1640 培养液中。37℃ 培养 72 小时(或视研究目的而定)。每天摇匀 1 次。

2. 培养物摇匀, 移入 10 ml 离心管离心 800—1000 rpm 5—8 分钟(以下离心的转速和时间与此相同)。

3. 摇匀沉淀, 加入 3 ml 0.35—0.4% KCl 低渗液(视细胞完整性以选择), 立即加入 2 ml 0.9% NaCl, 混匀, 离心。

4. 吸弃上清液, 保留 0.5 ml (含沉淀), 充分摇匀后加入新鲜配制的 1:15 冰醋酸: 甲醇固定液 10 ml, 打匀后离心。

5. 移去上清液, 沉淀物继续用固定液固定, 直至沉淀呈乳白色为止(一般固定 2 次即可)。

6. 吸尽上清液, 用上述固定液数滴(视沉淀量酌定, 一般 4—8 滴约 0.4 ml) 充分打匀, 用此细胞悬液沿玻片一端向另一端均匀滴片 1—2 张。

7. 气干。用 1:10 Giemsa (pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释) 染色, 镜下观察, 细胞核染成紫红色为止, 蒸馏水冲洗。

培养时间与微核率

肿瘤病人外周血 4 份, 两份样品培养前用 1.5 Gy γ 射线处理。另外两份作为对照, 如上法培养 2—6 天, 每天制片 1 次。制片编码、盲读。每天每份样品计数淋巴细胞 10000 个, 结果如图所示。

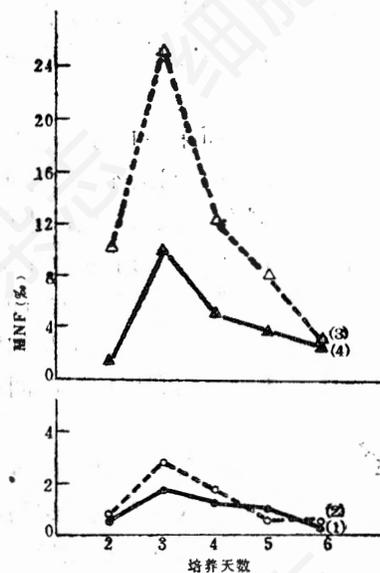


图 1 淋巴细胞培养天数与完整细胞微核率(MNF)的关系
第 1、2 例为对照组 第 3、4 例为实验组

从上图可见, 对照组和实验组均在培养第3天微核率最高。这样看来, 人外周血培养淋巴细胞制片时间以培养3天为宜。

注 意 事 项

本制片法简便、快速, 1小时内可完成6—12份样本制片, 每份样本可计数10000个完整转化淋巴细胞。镜检细胞分散均匀, 背景清晰。作为观察的转化细胞被胀大, 胞质丰富被染成淡蓝色, 主核和微核染色紫红色, 易于鉴别。本法应用于化学因子处理的人淋巴细胞, 结果良好。根据本实验经验, 为了获得质量良好的制片, 应注意:

1. 低渗操作要快, 否则会出现过多淋巴细胞破裂。

2. 首次固定前, 低渗后的沉淀应充分混匀, 防止固定后成块。

3. 滴片前, 细胞悬液要充分混匀(动作要轻柔, 亦可用旋涡混合器, 防止滴片时局部细胞堆积, 影响染色与阅片。

参 考 文 献

- [1] Countryman, P.I. & Heddle, J.A., 1976, *Mutat. Res.*, 41: 321.
- [2] Iskandar, O., 1979, *Stain Technol.*, 54: 221.
- [3] Högstedt, B., 1984, *Mutat. Res.*, 130: 63.
- [4] Mäki-Poakkanen, J., 1987, *Mutat. Res.*, 189: 399.
- [5] 薛开先等, 1986, 遗传学报, 13: 397.

第三届超微结构讨论会召开

中国细胞生物学学会第三届超微结构讨论会于1989年5月15日—19日在南京市南京大学召开。参加讨论会的同志来自全国30个单位, 共50余人。这次会议是由超微结构专业委员会筹备的。去年在武汉举行的全国电镜学会上, 有不少同志提出希望能组织一次超显微结构专业组的小型讨论会, 其后经过多方酝酿、协商并得到中国细胞生物学学会和南京大学生物系同志们的支持而得以召开的。

为了能进行集中而深入的讨论, 本次讨论会选择了4个专题: (1) 染色质 (2) 细胞器 (3) 核骨架和细胞骨架 (4) 间隙连接和胞间连丝。会上有18位同志作了专题发言, 其中有汤雪明的“高尔基体研究进展”; 郝水的“核仁染色质的结构与功能”; 翟中和的“核片层和细胞骨架”; 潘惟钧的“染色体端粒的结构、功能和复制机制”; 曾弥白的“间隙连接和胚胎发育”; 郑国辑的“次生胞间连丝形成的机理”; …等等。发言的同志大多结合自己工作介绍了本专题中的一些新进展。

讨论会上学术气氛浓厚, 无论是细胞生物学界老前辈或是年轻同志, 都非常认真, 自始至终参加会议。在会间同志们利用休息时间进行个别交流, 交流工作经验和研究技术, 彼此建立了联系。

总之这次讨论会大家一致反应内容丰富, 收获很大, 它反映了自第二届超微结构讨论会以来, 在细胞生物学领域内, 我国在超微结构研究方面又有了很大的进展; 同时又一次证明要对任何一个细胞生物学问题进行研究, 单凭形态学显然是不够的, 只有和功能结合起来才有可能得到更深入的了解; 另外从方法学来说电镜技术当然重要, 其他技术也是必不可少的。这次会议不足之处是大家感到时间比较紧, 讨论还不够充分, 希望下届会议加以改进。

(庞诗宜)