

细胞和培养的 C-4 I 细胞经酸处理后, 除去了染色体的组蛋白, 使 DNA 结合的染料更多, 从而增高荧光强度, 证实了 pH 值对测定结果的影响。Iversen^[1]也指出, 用胃蛋白酶处理过的细胞, 其荧光强度可增高。

测定 DNA 时常见的误差是由于 RNA 的同时着色。克服的办法是加入 RNA 酶。但要注意由于 RNA 酶不纯而导致对 DNA 的部分破坏, 或者酶活性不高而使 RNA 不能全部被消化。

在样品制备过程中, 标准细胞与样品细胞及时混合的重要性也引起人们的重视。Iversen^[1]特别强调, 如果标准与样品细胞不及早混合, 即不同时在 1 个试管内进行固定及染色, 则由于标准与样品细胞在不同时间对荧光素的着色力(stainability)的差异, 使 DNA 的测定发生错误, 或对其倍性的过量估计^[1,6]。即使标准细胞和样品细胞在混合以前平行地分别进行固定、染色等过程, 也会产生约 20% 的人为误差^[6]。因此, 内参考标准与样品细胞混合一起固定、染色、测量, 可以直接读出直方图上两个峰比值, 又可以纠正瞬时光强的波动和液流速度的变化所产生的误差。

标准及样品细胞都应制备成离散良好的单细胞悬液, 使用胰酶消化和橡皮铲(rubber-policeman)的效果是一样的^[6]。

Wolley^[5]报告人培养的胚胎组织 WI-38 细胞更适宜作 DNA 内参考标准。

总之, 在 FCN 测定细胞 DNA 时, 如能正确使用参考标准, 选好染料, 并且重视样品细胞的制备, 测定误差将大为减小。

摘 要

本文介绍了流式细胞术的两类参考标准。外参考标准是作为仪器调整的标准, 包括各种微球和戊二醛固定的鸡红细胞。内参考标准中着重介绍了 DNA 标准细胞包括国内常用的人淋巴细胞及国外常用的虹鳟鱼红细胞等。本文较详细地阐述了 FCM 测定细胞 DNA 或倍性的各种误差来源, 包括仪器、染料及样品制备等。强调了标准与样品细胞在制备过程中应早期混合的必要性。

参 考 文 献

- [1] Iversen, O. E. et al., 1987, *Cytometry* 8 : 190.
- [2] Jacobson, A. et al., 1983, *Cytometry* 4 : 161.
- [3] Vindelov, L. L. et al., 1983, *Cytometry* 3 : 332.
- [4] 宋平根等, 1987, 科学通报, 21 : 1656.
- [5] Wolley, R. C. et al., 1982, *Cytometry* 2 : 370.
- [6] Vindelov, L. L. et al., 1983, *Cytometry* 3 : 328.

家鸡联会复合体的制备

刘冬梅 张传善

(东北师范大学生物系)

联会复合体(Synaptonemal Complex, SC)是减数分裂时, 同源染色体配对过程中形成的一种非永久性的复合结构, 与染色体配对、遗传交换以及染色体的分离有密切关系。大量的研究表明, SC 分析是进行核型分析和鉴别染

色体畸变的一种新的有效手段。目前, 已被广泛应用于细胞遗传学的研究^[1]。

早期观察 SC 的方法是通过电子显微镜对超薄连续切片的观察, 以构成 SC 的三维空间结构^[2,6]。然而, 超薄连续切片的制作费事耗

时, 观察的细胞数有限。近年来, 由于界面铺展技术的应用和发展, 进一步推动了SC的深入研究及其在各方面的实际应用。不同的作者制备SC标本所采用的方法虽然不完全相同, 但主要程序包括: 1. 从生殖腺制备细胞悬浮液; 2. 将悬浮液滴至含有载膜的载片上; 3. 固定和硝酸银染色; 4. 将铜网放置在镀膜的载片上, 揭膜, 电镜观察。在实验过程中, 我们发现将材料滴在含有载膜的载片固定和染色时, 膜易漂起, 使材料丢失, 而且不易着色。我们将Messier等人观察银染的核仁组织者的超微结构时所使用的方法^[5], 用于SC的制片过程, 收到了良好的效果。

材 料 和 方 法

将性成熟鸡的精巢或刚孵化出3到8天的鸡的卵巢取出, 在0.05 mol/KCl溶液中剪碎并制备细胞悬浮液, 精巢细胞低渗处理2至4小时, 卵巢细胞低渗处理10分钟。然后将悬浮液直接滴在载片上, 用玻璃棒涂平, 空气干燥, 再用4%的多聚甲醛(pH: 8-9)固定10分钟, 用蒸馏水冲洗, 空气干燥, 硝酸银染色(4滴50%硝酸银+2滴2%明胶)^[3]。在光镜下观察SC分散良好的细胞, 记录坐标。

将已记录坐标的载片插入0.3%的聚乙烯醇缩甲醛氯仿溶液(0.3克聚乙烯醇缩甲醛+100毫升氯仿)内, 浸湿后取出, 待溶剂蒸发后, 载片上即结成一层薄膜。在光镜下, 按所记录的坐标找到需要的像, 放置50目铜网。用针尖沿铜网边缘将膜划破并滴加0.1 N氢氟酸^[4,7]。待膜漂起后, 将载片慢慢浸到蒸馏水中, 使带有铜网的膜漂浮在水面上, 用称量纸捞起铜网, 自然干燥, 取下载有材料的铜网用于电镜观察(H-600—Z型, 电压60 kV)。

结 果 和 讨 论

家鸡染色体数目 $2n=78$, 粗线期可观察到39条SCs(见图)。由于鸟类组型中有许多微小染色体, 受光学显微镜分辨率的限制对鸟类的组型分析往往局限于几条较大的染色体, 而使用SC分析可清晰地观察到小SC。因此, SC分析尤其适合于含有小染色体的鸟类

的细胞遗传学研究, 为鸟类的组型分析提供了一个新的方法。

运用这一方法制备SC, 可直接在载片上进行固定、染色和观察, 找到所需要的细胞后, 再镀膜, 加铜网, 不需事先大量制膜, 节省了时间和试剂。应用氢氟酸后, 载膜很容易从载片上脱离, 对染色体、SC形态没有影响, 因此可将光镜下观察到的材料直接转移到铜网上作电镜观察。这一方法可以广泛应用于鸟类和其他动物的SC的组型分析和染色体畸变的研究。

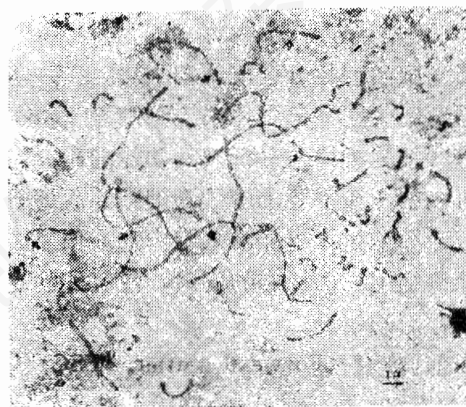


图 家鸡精母细胞粗线期联会复合体电镜照片
 $2n=78$, 箭头指着丝点

摘 要

本文以家鸡为例介绍了联会复合体的制备方法, 改进了原有界面铺展法制备联会复合体的程序, 易于将光镜下观察到的材料直接转移到铜网上作电镜观察, 为分析鸟类和其他动物的组型提供了一个新的方法。

参 考 文 献

- [1] 张传善, 傅平, 东北师大学报 (自然科学版), 1985, 4: 73—78.
- [2] Holm, P. B., *Carlsberg Res. Commune* 1977, 42: 103—151.
- [3] Howell, W. M. et al., *Experientia (Basel)*, 1980, 36: 1014—1015.
- [4] Lubit, B. W. et al., *Cell* 1976, 9: 503—509.

- [5] Messier, P. E. et al., *Cytogenet Cell Genet* 1986, 43 : 207—210.
[6] Rasmussen, S. W., *Chromosoma* 1976, 54 : 245—293.

- [7] Ruzicka F., *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, Vol 7 (Van Nostrand, Reinhold, and Camp, New York) 1977.

用荧光激活细胞分选仪检测细胞存活的两种不同染色方法的比较

李永镛 冷 勇 林国妹

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

荧光激活细胞分选仪(FACS)的主要功能之一是利用荧光标记抗体来检测细胞表面标志,进行细胞类群的分析及其功能的研究。在这类研究中,通常要求所检测细胞为活细胞,否则荧光标记抗体可能渗入胞内造成假象。为此在检测细胞表面标志的同时,最好能测定染色细胞存活的情况。

以前向散射(Forward scatter, FSC)为指标, FACS可以检测细胞的存活。但是,由于引起细胞死亡的原因不一,它们的FSC的变化也就不同。尤其当所测细胞样品中,细胞大小变化较大时,将严重影响以FSC来检测细胞存活的结果。另一类方法是用某些荧光染料染细胞,以细胞有没有荧光来决定细胞存活与否。碘化乙啶(Propidium iodide, PI)^[1]和荧光生成化合物——二乙脂荧光素(Fluorescein diacetate, FDA)^[2]是两种常用的染料。PI和FDA的酶解物——荧光素均可用可见光(488 nm)激发,前者使死细胞着红色荧光,后者使活细胞着绿色荧光。因此,用荧光染料染色法来检测细胞存活可以避免以FSC为指标的方法的缺点。同时,已经知道用于细胞表面标志研究用的荧光抗体的常用的荧光素有异硫氰酸荧光黄(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、罗达明(Rhodamine, Rho)和藻红蛋白(Phycocrythrin, PE),它们的激发光波长与PI和

FDA相近,均可用488 nm光来激发,发射光分别为绿色(如FITC)和红色(如Rho和PE)。因此,对比PI、FDA和Rho、PE、FITC的上述特性,两者结合起来,就可以达到同时检测同一个细胞的表面标志及其存活情况。本文比较了用FACS检测细胞存活率的PI和FDA两种染色方法,以进一步肯定其可行性。

材 料 和 方 法

1. 细胞样品的制备

取小鼠脾脏,以机械方法制成脾细胞悬液。脾细胞悬液的溶液为含2%新生牛血清的磷酸缓冲生理盐水(BS-PBS)。调整细胞悬液的浓度为 $2 \times 10^7/\text{ml}$,以锥蓝除外试验测定细胞的存活率为95%左右,以此作为活细胞悬液。另外,将细胞悬液置于56℃水浴中加温30分钟,锥蓝除外试验表明约98%细胞死亡,以此为死细胞悬液。将上述两种细胞悬液以不同比例混合,制备成存活率不同的细胞样品。

2. 细胞样品的染色

1体积细胞样品加4体积BS-PBS,然后加入5体积PI或FDA溶液。PI的终浓度为0.05 mg/ml, FDA的终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。前者于冰浴染色10分钟,后者于37℃温育染色30分钟,然后进行FACS分析。

3. FACS的分析

所采用的荧光激活细胞分选仪是Becton-Dickinson公司的产品——FACStar^{plus}。用5^W的氩离子激光,激发波长为488 nm,功率为200 mW。检测的发