

立的昆明小鼠卵子的体外受精和培养系统是可行的。

图版说明

图版 I

1. 授精后 10 分钟, 大量的精子附着在卵子表面。
×100
2. 授精后 0.5 小时, 精子已穿入卵子内(箭头所示)。
×1000
3. 授精后 2 小时, 穿入的精子头部膨大, 与尾部分离(箭头所示) ×1000
4. 授精后 4 小时, 形成的雌、雄原核以及精子尾部。
×400
5. 授精后 15 小时, 雌、雄原核开始融合。×400

图版 II

6. 培养 24 小时形成的 2 细胞胚胎。×200
7. 培养 48 小时形成的 4 细胞胚胎。×100
8. 培养 72 小时形成的桑椹胚。×100
9. 培养 96 小时形成的囊胚。×100
10. 培养中的小鼠输卵管上皮及发育的囊胚。×40
11. 受体雌鼠及其 4 只“试管小鼠”。

参 考 文 献

- [1] Whittingham, D. G., 1968, *Nature*, 220: 592—593.
- [2] Cross, P. C. and R. L. Brinster, 1970, *Biol. Reprod.*, 3: 298—307.
- [3] Mukherjee, A. B. and M. M. Cohen, 1970,

Nature, 228: 472—473.

- [4] Kaufman, M. H. and D. G. Whittingham, 1972, *J. Reprod Fert.*, 28: 465—468.
- [5] 丰田裕等, 1971, (日)家畜繁殖志, 16(4): 147—157.
- [6] Whitten, W. K., 1971, *Adv. of Biosci. Raspe., G., ed.*, 6:129. Pergamon Press
- [7] 曲漱惠, 1980, 动物胚胎学, pp 30—37, 高等教育出版社。
- [8] Hoppe, P. C. and S. Pitts, 1973, *Biol. Reprod.*, 8: 420—426.
- [9] 尹海林, 陈秀兰, 1989, 遗传, 11(3): 18—22.
- [10] 钟品仁, 1983, 哺乳类实验动物, pp 163—170, 人民卫生出版社。
- [11] 星雅树, 丰田裕, 1985, (日)日畜会报, 56(12): 931—937.
- [12] Yanagimachi, R. and M. C. Chang, 1964, *J. Exp. Zool.*, 156: 361—376.
- [13] Whittingham, D. G., 1975, *The Early Development of Mammals*, pp 1—24, Cambr. Univ. Press U. K.
- [14] Wright, R. J. and K. R. Bondioli, 1981, *J. Anim. Sci.*, 53: 702—728.
- [15] Kuzan, F. B. and R. W. Wright, Jr., 1982, *Anim. Reprod. Sci.* 5: 57—63.
- [16] Allen, R. L. and R. W. Wright, Jr., 1984, *J. Anim. Sci.* 59: 1657—1661.
- [17] Eyestone, W. H. et al., 1987, *Theriogenology*, 27: 228(Abstr.)
- [18] Goto, K. et al., 1988, *J. Reprod. Fert.*, 83: 753—758.
- [19] Xie, S. et al., 1987, *Theriogenology*, 27: 296(Abstr.)
- [20] Minami, N. et al., 1988, *Gamete Res.*, 19: 235—240.
- [21] Suzuki, H. and Y. Toyoda, 1986, *J. Mamm. Ova Res.*, 3(2): 78—85.

甲₂ 巨球蛋白对辐照细胞的保护效应

何介薇 高素梅

(上海医科大学放射医学研究所)

甲₂ 巨球蛋白(α_2M)是机体内一种广谱的蛋白酶抑制剂, 曾报道它具有抗辐射损伤作用^[1]。临床上应用人血 α_2M 制剂治疗急慢性

放射性皮肤粘膜溃疡已获得满意的效果^[2]。为了进一步探索 α_2M 保护辐射损伤的有效机理, 我们采用 ³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入方

法观察入血 α_2M 制剂对辐照人成纤维细胞的保护效应。

材料与 方法

人胚肺成纤维细胞(由上海医科大学微生物教研室供应)培养在 Eagles MEM 培养液、水解乳蛋白、10% 加热灭活小牛血清和抗菌素(青、键、卡那霉素) pH 7.0—7.2 培养基中, 细胞生长在 25 mm 培养皿中, 37°C 孵育, 实验所用的细胞为第 18—24 代。

在培养的 2×10^5 — 1×10^6 /皿成纤维细胞中加入 $1 \mu Ci$ 3H -TdR (由中科院上海原子核研究所供应) 37°C 孵育 48 小时, 细胞经 0.25% 胰酶消化, 三氯醋酸处理后, 用膜片法(49 型玻璃滤膜)加 PPO、POPOP 闪烁液, 用 LKB 液体闪烁计数器计数, 结果以 cpm 表示。

在 4×10^5 /皿成纤维细胞中加入不同浓度的 α_2M 制剂(卫生部上海生物制品研究所供应)观察它对细胞 3H -TdR 掺入的影响。选择适量 α_2M 制剂分别在照射前、照射后加入培养的成纤维细胞, 观察细胞 3H -TdR 掺入计数的改变。

照射条件: 用上海医科大学附属肿瘤医院钴-60 治疗机, 照射源与细胞之间的距离为 80 cm, 剂量率为 125 cGy/min, 照射总剂量分别为 50、100、200、300、400、500 cGy。

结 果

成纤维细胞 3H -TdR 掺入计数随细胞数量增加而升高(表 1)。我们选用 4×10^5 /皿细胞观察不同浓度 α_2M 制剂对细胞 3H -TdR 掺入计数的影响, 结果见表 2。从表 2 中可见当 α_2M 剂量在 156—2500 μg 时, 3H -TdR 掺入计数与盐水对照组相比没有差别。而当 α_2M 制剂浓度达 5 mg 时, 细胞 3H -TdR 掺入计数则有明显抑制。

表 1 不同细胞数 3H -TdR 掺入量

细胞数	n	3H -TdR 掺入计数(cpm)
		$\bar{x} \pm SD$
2×10^5	5	17840 \pm 2522
4×10^5	5	34020 \pm 2670
1×10^6	5	47701 \pm 3082

表 2 α_2M 制剂对细胞 3H -TdR 掺入计数的影响

α_2M 制剂量 (微克蛋白浓度)	n	3H -TdR 掺入计数(cpm)
		$\bar{x} \pm SD$
0	5	33623 \pm 3016
156	5	32091 \pm 2918
313	5	34009 \pm 3108
625	5	33891 \pm 3205
1250	5	33799 \pm 3116
2500	5	33683 \pm 3352
5000	5	10312 \pm 986

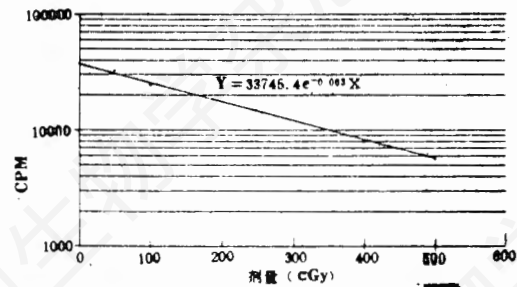


图 细胞 3H -TdR 掺入的辐射剂量效应曲线

表 4 α_2M 制剂对辐射细胞的保护作用

组 别	n	3H -TdR 掺入计数(cpm)
		$\bar{x} \pm SD$
不照射对照组	5	33797 \pm 3012
照射组	5	5322 \pm 562
照前加 α_2M	5	4745 \pm 417
照后加 α_2M	5	6226 \pm 373*

*: 与照射组比较, $P < 0.5$

4×10^5 /皿成纤维细胞接受钴-60 γ 射线照射, 在 50—500 cGy 剂量范围内, 随着照射剂量增加细胞 3H -TdR 掺入计数逐渐减少。各照射剂量组间差异非常显著, 经变异数分析统计处理 $P < 0.01$ 。用最小二乘法求得当以 cpm 表示的掺入计数换作对数时与照射剂量呈线性关系。 $Y = 33745.4e^{-0.0036X}$ (见图)。

4×10^5 /皿细胞接受钴-60 500 cGy 照射, 在照射前及照射后 30 分钟分别加入 α_2M 制剂 625 μg , 观察其对辐照细胞 3H -TdR 掺入计数的影响, 结果见表 3。从表 3 中可见 4×10^5 /皿细胞在照射前加 α_2M 制剂, 细胞 3H -TdR

掺入计数与对照组相比没有明显差别;在照射后加 α_2M 制剂细胞 3H -TdR掺入计数与对照相比则有显著意义($P < 0.05$)。

讨 论

电离辐射能直接或间接作用于细胞,破坏DNA与膜等生物分子引起细胞变性死亡。我们采用培养的单层细胞 3H -TdR掺入方法观察辐射对培养的成纤维细胞的影响。结果表明经0—500cGy钴-60照射后,细胞 3H -TdR掺入计数随照射剂量升高而减少。细胞 3H -TdR掺入计数与辐射剂量呈良好的线性关系($y = 33745.4 - 0.0036x$)。在 4×10^5 成纤维细胞受到500cGy照射后,其 3H -TdR掺入计数已明显下降,仅为不照射对照组的16%。我们还观察到同样数量的细胞接受30Gy照射后,细胞 3H -TdR掺入计数极度降低,只占不照射对照组的3.3%。

我们采用人胚肺成纤维细胞培养在含2.5ml培养液的25mm玻璃培养皿中,加入 $1 \mu Ci$ 3H -TdR培养48小时后测每分钟计数率。细胞在 10^5 — 10^6 范围内,其 3H -TdR掺入计数随细胞数增多而升高。考虑到我们所用的细胞培养条件和加入同位素的量要符合所使用的液闪测定仪的最佳条件,故选用浓度为 4×10^5 细胞。应用 3H -TdR掺入法研究电离辐射对培养细胞的影响是经典、简单、能够反映辐射对细胞损伤的研究方法。我们的结果说明在适当条件下,用 3H -TdR掺入计数方法观察外加因素对细胞的影响,仍不失为良好的手段之一。但是当 3H -TdR浓度过高时会破坏DNA的正常结构,影响细胞的正常生长。

业已证明成纤维细胞膜上有 α_2M 受体。甲 $_2$ 巨球蛋白是由四个亚基组成的一种蛋白酶抑制剂,大量存在于血清中,它几乎能与所有的内肽酶形成复合物,当 α_2M 与蛋白酶结合后很快与细胞表面 α_2M 受体结合,从而进入细胞,再经receptosome到溶酶体内逐渐分解。Mosher^[3]曾用L- ^{35}S 甲硫氨酸放射免疫分析法证实,肺成纤维细胞能合成 α_2M 且很快从细胞分泌。

由于在细胞增殖的同时伴随着释放大量的蛋白酶,而 α_2M 能抑制多种蛋白水解酶,因而 α_2M 能调节细胞周围的环境,有益于保护细胞膜的完整性,Saksela^[4]也证明正常细胞可合成与吞饮 α_2M ,从而调节细胞周围蛋白水解作用。Dickson、Maxfield^[5,6]以 ^{125}I - α_2M 及碱性蕊红- α_2M 方法证明, α_2M 在生理浓度时与胰酶结合从而结合到成纤维细胞表面受体上,他们用电镜观察了细胞摄取 α_2M 的过程。说明在30分钟后 α_2M 已大部分进入细胞的溶酶体中,并且提出细胞摄取 α_2M 的过程有类似转谷酰胺酶的活性作用,可能在维持细胞内环境方面包括对于氨基酸及蛋白水解酶的调节上起到积极的作用,从而保护细胞的完整性。Hanover^[7]等所作的 ^{125}I - α_2M 结合到细胞膜上受体的实验证明当 α_2M 浓度大于3mg/ml时,它与细胞膜受体的结合率可降低85—90%。我们的结果也表明当高浓度 α_2M 时,它能极度抑制细胞 3H -TdR的掺入。

本结果表明 4×10^5 成纤维细胞接受500cGy照射后加625 μg α_2M ,细胞 3H -TdR掺入计数与照射组相比有明显升高,提示在照射前加 α_2M 对细胞生长没有预防作用。在照射后加 α_2M 对细胞生长有保护作用。与临床使用 α_2M 治疗放射性皮肤粘膜损伤有效的结果^[2]相一致。电离辐射引起蛋白酶活性增高,由于 α_2M 是广谱蛋白酶抑制剂,它能抑制辐射引起细胞内外蛋白水解酶的活性,从而调节细胞的微环境^[8,9]。Hoffman等^[10]认为 α_2M 能抑制激活的巨噬细胞产生超氧化物。在感染趋化作用过程中蛋白酶抑制剂能抑制 O_2^- 自由基的产生。电离辐射作用使自由基产生增多,而 α_2M 是蛋白酶抑制剂,因而它的辐射防护作用可能与它是自由基的清除剂有关。至于 α_2M 的辐射防护作用是否直接作用于它能清除电离辐射引起的大量自由基,从而保护细胞的生长,值得进一步研究。

摘 要

用 3H -TdR掺入方法观察电离辐射对培养

的人成纤维细胞的影响。在 0—500 cGy 钴-60 γ 射线照射剂量范围内, 细胞 ^3H -TdR 掺入计数与照射剂量呈线性关系。 $y = 33745.4 e^{-0.0038x}$ 。低浓度 $\alpha_2\text{M}$ 对细胞 ^3H -TdR 掺入没有影响, 高浓度 $\alpha_2\text{M}$ 能抑制细胞 ^3H -TdR 掺入。 4×10^5 细胞经钴-60 γ 射线 500 cGy 照射后加 $\alpha_2\text{M}$ 制剂, 细胞 ^3H -TdR 掺入计数与不照射对照组相比有明显升高 ($P < 0.05$)。在照射前加 $\alpha_2\text{M}$ 制剂与对照组相比无明显差别。

参 考 文 献

- [1] Hanna, M. G. et al., 1967, *Science.*, 157 1458—1462.
[2] 翁志根等, 1981, 中华放射医学与防护杂志

- 1: 33—36.
[3] Mosher, D. F. et al., 1977, *J. Clin. Invest.*, 60: 1036—1045.
[4] Saksela, O. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 2942—2946.
[5] Dickson, R. B. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 3454—3459.
[6] Maxfield, F. R. et al., 1986, *Biochemistry.*, 20: 5353—5358.
[7] Hanover, J. A. et al., 1984, *Annals NY Academy Science*, 410—423.
[8] Mosher, D. F. et al., 1983, *Annals NY Academy Science.*, 327—331.
[9] Borth, W., 1984, *Cell Relat Res.*, 4: 83—94.
[10] Hoffman, M, et al., 1983, *Biochim. Biophys. Acta.*, 760: 421—423.

实验技术

生物素标记检测在基因探查中的应用

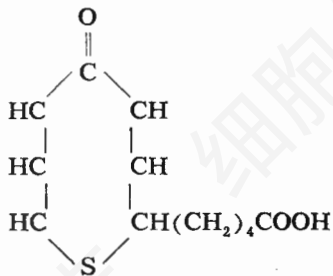
熊 辛* 郭 征

(北京市肿瘤所细胞遗传室)

从 1969 年分子原位杂交技术问世以来^[1], 为检测其杂交结果, 形成了以放射自显影技术为主的检测手段。但因此技术涉及到对人体有害的同位素, 而促使人们寻找其他的方法以代替同位素的使用。为此, 生物素标记检测体系的建立和发展受到了人们的青睐。本文拟就生物素标记检测体系的建立、应用及前景作一概述。

生物素特性 属于脂溶性维生素 B 族。具有噻吩与尿素相结合的骈环, 并带有戊酸侧链。为小分子水溶性物质^[2]。

生物素的分子结构式如下:



生物素(Biotin)可与存在于鸡蛋清中的一种碱性蛋白质——抗生物素蛋白(Avidin)相结合。和(Avidin)理化特性相似, 存在于链霉菌中的链抗生物素蛋白(Streptavidin)亦能与生物素结合。生物素与这两种蛋白之间的结合极为牢固, 其亲和力为 $\text{KD} = 10^{-15}\text{M}$ ^[3,4]。而且这种结合是特异性的^[5]及不可逆的^[6]。

生物素检测原理 其原理可以认为是基于免疫酶组织化学及分子杂交原理。前者属于抗原抗体反应范畴, 即籍助于酶、荧光素等标记抗体与待检标本中的相关抗原相结合。由于酶经过一定的显色处理, 可呈现醒目的阳性色彩, 而荧光素则可发出荧光, 这样, 在显微镜下即可根据颜色反应和所发荧光来准确定位待检抗原物质。它将显微镜的高度精确性和抗原抗体反应的高度敏感性融为一体^[7]。而分子杂交原理则是: 溶液中的 DNA 分子被加热变性后, 两

* 昆医附一院肿瘤所。