

表 2 悬浮培养、固体培养 CO<sub>2</sub> 释放量的比较

培养方式	培养时间 (天)	5	10	15	20	35
悬浮培养	细胞增长量(倍数)	2.08	2.36	5.40	16.65	17.13
	CO <sub>2</sub> PPM/小时·克鲜重	2.97	9.58	1.13	0.96	0.46
固体培养	细胞增长量(倍数)	1.53	1.92	3.59	8.58	11.80
	CO <sub>2</sub> PPM/小时·克鲜重	4.50	10.20	9.44	1.54	1.37

增加并不明显。如以单位克鲜重,单位时间 CO<sub>2</sub> 释放量计算,显然 CO<sub>2</sub> PPM 数较高。以后,随着细胞数量的迅速增加,平均每克细胞每小时 CO<sub>2</sub> 释放量逐渐减少。悬浮培养与固体培养的结果趋势是一致的。

从蔗糖的利用和 CO<sub>2</sub> 的释放量与人参悬浮培养细胞的生长曲线对照分析,可以看出,在一个生长周期内,前两者下降,后者上升。到某一点时,后者的上升速度减慢,甚至停止。显然,要进一步提高人参细胞的生长量,需要及时补充养料和新鲜空气。因此,就有进一步进行半连续培养和连续培养研究的必要。

## 参 考 文 献

[1] 丁家宜等 1981,南京药学院学报(2):61—66

[2] 丁葆祖等 1981,细胞生物学杂志,第3卷第3期 27—30.

[3] 中国科学院上海植物生理所细胞室编译,1978,植物组织和细胞培养,上海科学技术出版社,73—88.

[4] Chang W. C., et al., 1979, *Natinal Science Council Monthly R. O. C.* 7: 147—154.

[5] Bayliss, M. W. et al., 1974. *J. Exp. Bot.* 25: 772—781.

[6] Cox, B. J. et al., 1973. *J. Exp. Bot.* 24: 159—174.

[7] Henshaw, G. G. et al., 1966, *J. Exp. Bot.* 17: 362—377.

[8] Short K. C. et al., 1969. *J. Exp. Bot.* 20: 572—790.

[9] Rose, D. et al., 1972, *Can. J. Bot.* 50: 1301—1308.

[10] Wilson, S. B. et al., 1971. *J. Exp. Bot.* 22: 177—179.

## 用改良的姐妹染色单体分化染色法对白鲢肾细胞增殖动力学和化学药品诱发姐妹染色单体交换频率的初步研究\*

李 康 李渝成 周 曦

(武汉大学生物系)

自 Latt<sup>[1]</sup>首先使用 Hoechst 33258 对 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 掺入的人淋巴细胞姐妹染色单体分化染色 (SCD) 以来,一些 SCD 永久制片法已陆续有报道<sup>[2]—[4]</sup>。我们采用一种改良的 SCD 法,即 硫堇-UV-Giemsa 法,对离体短期培养 的白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 肾细胞增殖动力学和丝裂霉素 C (MMC)、敌枯双 (N,N-甲撑-双:2-氨基-1,3,4-噻二唑) 在白

鲢肾细胞所诱发的姐妹染色单体交换 (SCE) 频率进行了初步研究。

### 材 料 与 方 法

白鲢取自武汉市水产科学研究所,为一斤左右(一冬龄)的鱼。

\* 本工作是在余先觉教授指导下进行的。

### (一) 细胞培养和染色体标本制备

培养方法与 Yamamoto 和 Ojima<sup>[5]</sup> 所建立的方法大致相同。肾细胞取自鱼的中肾。培养基是含 20% 小牛血清的 1640 培养液，加 10 毫克分子 HEPES，培养温度是 25℃。培养开始时，每 5 毫升培养液加 0.2 毫升 PHA(用广东鸡子豆按盐水法<sup>[6]</sup>提取)。实验分两组，一组同时加入 BrdU，终浓度 8 微克/毫升，分批收获；另一组培养至 18 小时加入 BrdU，终浓度 5 微克/毫升，培养 42 小时加入 MMC 和敌枯双，76 小时左右收获。秋水仙素均于收获细胞前 2 小时加入。低渗采用 0.0375 克分子 KCl 处理，气干法制片。

### (二) 硫堇-UV-Giemsa 姐妹染色单体分化染色改良的 SCD 法程序如下：

(1) 硫堇( $10^{-3}$  克分子，用蒸馏水配制)染色 20 分钟。

(2) 蒸馏水简单冲洗，用滤纸吸去玻片上的水。将玻片平放入盛有 1 克分子  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.2—8.3) 的培养皿或盘中，使溶液浸没玻片，培养皿置于恒温水浴锅上，其中溶液保温 45—50℃，20W 紫外灯照射 15—30 分钟，照射距离 3—5 厘米。

(3) 自来水洗涤 Giemsa 染色。

对于某些鱼(如鳊鱼)，先用 1 克分子  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.2) 60℃ 处理 15—20 分钟，可以加强 SCD 效果。

## 结果与讨论

### 一、关于硫堇-UV-Giemsa 分化染色方法

鱼类染色体一般较哺乳类染色体小，用常规方法难于进行 G-带分析，表明其染色体结构有某些异于哺乳类染色体的特征，因此在鱼类姐妹染色单体分化染色也较困难。迄今这方面的研究报道仍然很少。我们曾分别采用热盐法<sup>[3]</sup>、UV-Giemsa 法<sup>[4]</sup>以及 Goto 等提议的硫堇-日光-Giemsa 法(Thionine-light-Giemsa method)<sup>[7]</sup> 处理白鲢肾细胞，均未获得清晰的姐妹染色单体分化染色图象和稳定的效果。但改良的硫堇-UV-Giemsa 法集中了上述三种方法的一些特点，对 BrdU 掺入的姐妹染色单体有较强烈的分化染色作用，能得到令人满意的结果。我们将这一方法用于白鲢、鳊鱼、鲤鱼、鲫鱼肾细胞以及人类淋巴细胞(见图 1、2、3)，

效果都很好。用国产 IdU 代替进口 BrdU，也能产生清晰的分化染色图象。

运用硫堇-UV-Giemsa 法，从稍微弯曲成弧的两条姐妹染色单体分化染色的结果来看，处于外侧的 BB-染色单体(DNA 的两条核苷酸链均有 BrdU 掺入，取代胸苷，T)染色较浅，相对的 BT-染色单体(DNA 双链中仅一条链有 BrdU 掺入)染色较深(见图 2)。这与上述三种方法以及 FPG 法(Hoechst 33258-light-Giemsa method)的分化染色结果相同。Goto 等曾提出在 FPG



图 1 白鲢肾细胞有丝分裂中期相，加入 BrdU 后经历两个复制周期，硫堇-UV-Giemsa 分化染色。

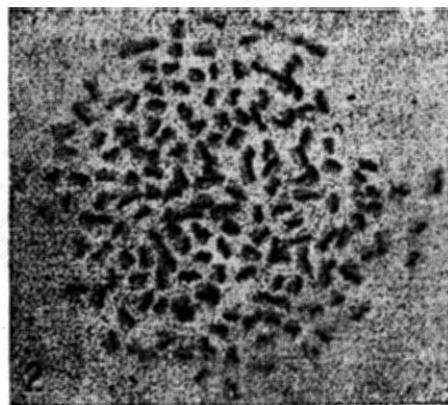


图 2 鲫鱼肾细胞的 SCD，染色方法同图 1。

法中，DNA 的光照分解反应是姐妹染色单体分化染色的主要原因。Scheid<sup>[8]</sup> 也提出了类似看法。我们使用硫堇-UV-Giemsa 法，发现随着

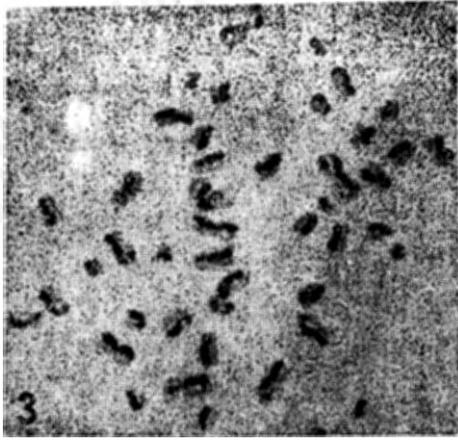


图3 人淋巴细胞的SCD, 染色方法同图1。

UV照射时间的延长, BB-染色单体染色变浅。这与 Goto 等的看法是吻合的。

## 二、短期培养白鲢肾细胞的增殖动力学

SCD技术在短期培养细胞增殖动力学的研究上, 提供了快速简便的方法。国内已有一些这方面的报道。根据 DNA 半保留复制的原则, 在 BrdU 存在下, 第一次分裂周期的细胞, 两条姐妹染色单体都是 BT-染色单体, 不分化染色(见图4); 第二次分裂周期的细胞, 两条姐妹染色单体中一条为 BB-染色单体, 另一条为

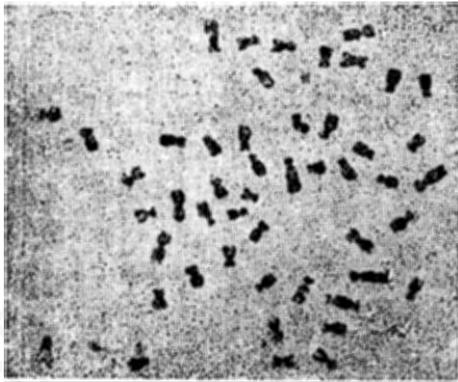


图4 白鲢肾细胞有丝分裂中期相, 加入 BrdU 后经历一个复制周期, 染色方法同图1。

BT-染色单体, 所有染色体均分化染色(见图1); 由于染色体在有丝分裂时随机分配到两个后代细胞, 第三次分裂周期的细胞, 大约有 1/2 分化染色的染色体, 其余 1/2 染色体着色均较浅, 为两条 BB-染色单体(见图5)。

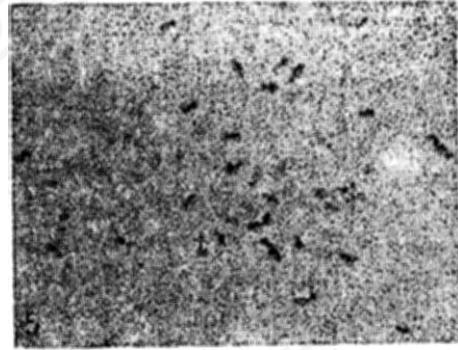


图5 白鲢肾细胞有丝分裂中期相, 加入 BrdU 后经历三个复制周期, 染色方法同图1。

白鲢肾细胞增殖动力学的观察结果列在表1。在培养18小时收获, 高细胞密度滴片中, 已可观察到第一次分裂周期的细胞, 但数目很少, 每个视野平均不足1个。可见此时基本上是肾细胞培养中出现第一代分裂细胞的起始时间。培养至38—42小时收获, 分裂细胞的数目大大增加, 每个视野5—6个, 但大多数是第一次分裂周期的细胞, 第二次分裂周期的细胞仅占11.5—18.1%。培养62小时开始出现第三次分裂周期的细胞, 占3.8%。培养72—76小时, 第二次分裂周期细胞达到51.5—59.2%, 这一时间可认为是第二代分裂细胞达到高峰期的时间。但此时第一次分裂周期的细胞仍有27.9—38.0%, 可见整个短期培养过程中, 都有肾细胞陆续启动增殖。

上述结果仅是白鲢肾细胞增殖动力学的一些基本数据。由于培养过程中, 使用 PHA 不同,

表1 短期培养白鲢肾细胞增殖动力学观察结果

培养时间 (小时)	检查分裂 细胞数	第1次分 裂(%)	第2次分 裂(%)	第3次分 裂(%)
18	20	100	0	0
38	200	88.5	11.5	0
42	204	81.9	18.1	0
62	210	63.3	32.9	3.8
72	200	38.0	51.5	10.5
76	201	27.9	59.2	12.9

接种细胞密度差异,细胞生长情况将稍有变化。一般说来,随着细胞生长环境渐趋恶劣,增殖将逐渐变缓。

### 三、MMC 和敌枯双所诱发的 SCE 频率变化

业已证明 MMC 和敌枯双可诱发哺乳类培养细胞的 SCE 频率明显增加<sup>[9][10]</sup>。我们的实验结果(列入表 2)表明白鲢肾细胞对这两种化学药品的诱变作用也是十分敏感的(见图 6)。随着对培养细胞施加药物剂量的增大, SCE 频率也高度显著地增加( $p < 0.01$ )。唯一的例外是敌枯双剂量在 0.05 毫克分子时, SCE 频率的增加虽然是显著的,但不是高度显著的( $0.01 < p < 0.05$ )。Perry 和 Evans<sup>[9]</sup>认为,相当多的诱变剂,在施用亚致死剂量时,往往减低 SCE 的最大频率。在培养白鲢肾细胞中,敌枯双施加剂

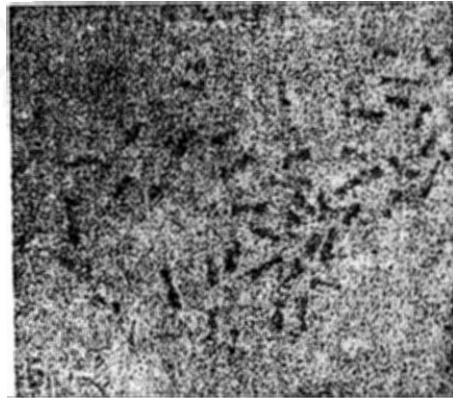


图 6 MMC 在白鲢肾细胞中所诱发的 SCE 频率增高,染色方法同图 1。

量在 0.05 毫克分子时,实验所观察的 SCE 频率可能有所减低,这一剂量对于白鲢肾细胞可能达到亚致死剂量。实际上,施立明等<sup>[10]</sup>报道赤麂细胞在敌枯双的施加剂量达 0.1 毫克分子时,细胞增殖即被阻断。

表 2 MMC、敌枯双在白鲢肾细胞中诱发 SCEs 的观察结果

处理	剂量	检查细胞	SCE 总数	每个细胞 SCE 数		P
				范围	平均数±标准误	
空白		50	231	1—10	4.62±0.32	<0.01
MMC	4毫微克/毫升	50	597	5—22	11.94±0.61	<0.01
	12毫微克/毫升	50	880	7—30	17.60±0.84	<0.01
	48毫微克/毫升	50	1148	10—48	22.96±0.96	<0.01
敌枯双	0.005 毫克分子	50	429	4—23	8.58±0.56	<0.01*
	0.01毫克分子	50	569	4—24	11.38±0.55	<0.01
	0.05毫克分子	50	667	5—22	13.34±0.55	<0.05

\* 与空白平均数比较。

由于 SCEs 具有灵敏度高的优点<sup>[11]</sup>,将其应用于水质污染的生物监测和评价的研究是很有前途的。鱼类在污染水体中生活所积累的遗传损伤,完全可能由 SCEs 检出。

### 参 考 文 献

[1] Latt, S. A., 1973. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 70: 3395—3399.

[2] Perry, P. and S. Wolff, 1974. *Nature (Lond.)* 251: 156—158.

[3] Korenberg, J. R. and E. F. Freedlander, 1974. *Chromosoma*, 48: 355—360.

[4] 赵寿元, 李昌本, 马正蓉, 丁斐, 1981. *实验生物学报*, 14(2): 123—128.

[5] Yamamoto, K. and Y. Ojima, 1973. *Japan J. Genet.*, 48: 235—238.

[6] 吴旻, 凌丽华, 1964. *天津医学杂志输血及血液学研究附刊*, 2(1): 53—59.

- [7] Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu and T. Sugiyama, 1975. *Chromosoma*, 53: 223—230.
- [8] Scheid, W. 1976. *Exp. Cell Res.*, 101:55—58.
- [9] Perry, P. and H. j. Evans, 1975. *Nature*

(*Lond.*), 258: 121—125.

- [10] 施立明, 贺维顺, 陈玉泽, 1980. 动物学研究, 1(3):297—302.
- [11] 贺维顺, 刘爱华, 陈松强, 保海仙, 朱慧香, 王桂清, 1981. 动物学研究, 2(2): 113—118.



## 介绍两种新颖的薄切片塑料

徐 是 雄

(香港大学植物系)

不久前曾先后<sup>[1,2]</sup>介绍了两种乙二醇甲基丙烯酸酯(简称GMA)薄切片塑料。现在我再介绍两种供高分辨率光学显微镜观察的塑料产品。这两种产品经我们用植物材料试做切片,发现它们各有一定的优点。现将应用这两种塑料包埋剂的经验介绍如下:

### I. GMA-Quetol 523 塑料

GMA-Quetol 523 塑料包埋剂, 是日本人Kushida<sup>[3,4]</sup>等首先使用的。基本配方包括三种试剂: (1)GMA; (2)Quetol 523; (3)QCU-1。有关GMA塑料的性能,在《塑料薄切片和超薄切片技术》一书<sup>[5]</sup>中已有详尽的报道,就不重复了。Quetol 523 则为一种能与GMA混合的塑料(名叫 methoxy polyethylene glycol 400 methacrylate),其粘度为21厘泊,比GMA略稠(GMA的粘度约为9.15厘泊)。QCU-1(化学名为2,2'-azobis isobutyronitrile)是一种糊状液体。这三种试剂是由日本日新EM株式会社\*供应的。

在使用时,按以下配方,配成混合液:

GMA	85 毫升
Quetol 523	15 毫升
QCU-1	0.05 克

混合液在60°C,约需12小时便可固化。如把QCU-1的份量加高至0.4克,在39°C只

需36小时,便可固化。固化的包埋头,是透明的。

Kushida和Kushida<sup>[6]</sup>在以后将配方进行改良,在配方中增加了MMA(methylmethacrylate)(但据我们试用,发觉加不加MMA对塑料的性能无多大改变),改良的配方如下:

GMA	68 毫升
Quetol 523	2 毫升
MMA	30 毫升
QCU-1	0.05 克

使用GMA-Quetol 523塑料包埋的具体步骤与GMA包埋方法<sup>[5]</sup>基本相同,一般可采用以下方法:

**材料** 3<sup>3</sup>毫米或略大的小块

**固定** 用2—6%戊二醛在室温固定4小时。固定液用磷酸或二甲胂酸钠缓冲液(0.2M)配制。

**清洗** 用上述缓冲液清洗2次,每次停留半小时。

**脱水** 50%,70%,80%,90%乙醇各30分

- \* Nissin EM Co., Ltd., Yotsuya Songyo Bldg. 2 Samon-cho, Shinjuku, Tokyo, 160 JAPAN.
- \*\* Polaron Equipment Ltd., 21 Greenhill Crescent, Holywell Industrial Estate, Watford Hertfordshire WDI 8 x G, England.
- \*\*\* 购自Miles Lab. Ltd., P.O.Box 37, Stoke Court Stoke Poges, Slough SL 2 4LY, England.