

氏环氧树脂好;所以电镜工作我们还是用Spurr氏环氧树脂为主。最近我们还试用了一种新近出产的塑料叫LRwhite,但经我们试用,发现效果并不好,所以就不介绍了。

### 参考文献

- [1] 徐是雄 1980 细胞生物学杂志 4: 31—36.
- [2] 徐是雄 1981 细胞生物学杂志 4: 43—46.
- [3] Kushida, T., Nagato, Y., Kushida, H. 1975. 10th Int. Cong. Anat., Tokyo. page 503.
- [4] Kushida, H. 1977. *J. Electron Microsc.* 26: 351—353.
- [5] 徐是雄 1980 《塑料薄切片和超薄切片技术》北京大学出版社.
- [6] Kushida, H., and Kushida, T. 1981. *J. Electron Microsc.* 30: 77—80.
- [7] Kushida, H. 1978. *J. Electron Microsc.* 27: 59—60.
- [8] Kushida, T., Nagato, Y. and Kushida, H. 1979. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 56: 1—22.
- [9] Berlyn, G. P. and Miksche, J. P. 1976 «Botanical Microtechnique and cytochemistry» Iowa State Uni. Press.
- [10] Carlemalm, E., Garavito, R. M. and Villiger, W. 1982. *J. Microscopy.* 126: 123—149.
- [11] Roth, J., Bendayan, M., Carlemalm, E., Villiger, W., and Gara Vito, R. M. 1981. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 663—669.

## 经验交流

### 异种细胞融合诱导熟前染色体凝聚(PCC)

蒋清 茅一萍 王世浚

(南京铁道医学院 生物学教研室)

在某种细胞促融剂介导下,同种或异种细胞能相互融合形成单个的新细胞。观察分析这种融合细胞的结构和机能的变化,在细胞生物学、细胞遗传学和细胞免疫学等研究中,已逐渐得到重视和应用。我们在开展同种和异种细胞融合选择杂种的同时,参考有关文献<sup>[1]</sup>,进行了细胞融合诱导熟前染色体凝聚(premature chromosome condensation, PCC)的实验。结果表明,经化学促融剂——聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的介导,有丝分裂期(M期)细胞,在种内和种间均能诱导间期核产生不同时相的PCC。所得图象清晰,其中以赤鹿细胞的PCC最为典型。

### 材料与方 法

#### 一、细胞和细胞培养

1. 雄性赤鹿成纤维细胞, (KIZ-7901), 由昆明动物研究所引进。
2. 中国仓鼠成纤维细胞系 (Wg3-h) 由复旦大学

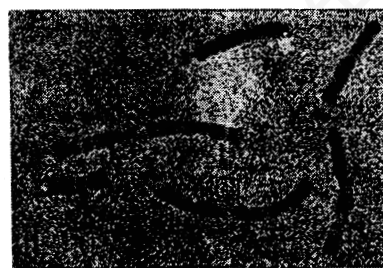


图1 赤鹿细胞的核型  $2n = 7, XY_1Y_2$

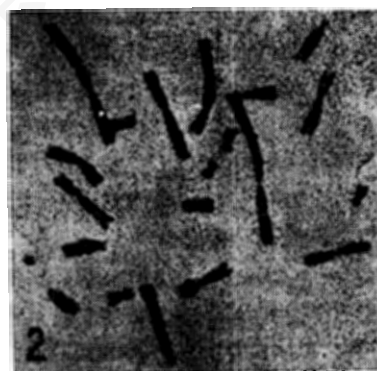


图2 中国仓鼠 Wg3-h 细胞系核型, 染色体数 21—23

遗传研究所引进。

上述两种细胞均用含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 37—38℃ 培养, 当细胞进入对数生长期, 按下列步骤分别收获它们的有丝分裂期(M期)细胞和间期(I期)细胞, 供细胞融合用。

## 二、M期细胞和 I 期细胞的制备

1. M期细胞通过胸腺嘧啶核苷(TdR)一次同步结合秋水仙素阻断法取得。由于赤麂和中国仓鼠两种细胞的群体倍增时间不同, 故同步化处理的时间也各异: 赤麂细胞以 2mM TdR 作用 24 小时, 经 Hanks' 液漂洗解除 TdR 的作用后, 换用正常培养液继续培养 4—6 小时, 再用秋水仙素(0.02 微克/毫升)阻断 12 小时; 中国仓鼠细胞以同浓度 TdR 处理 12 小时, 同法解除后, 加秋水仙素(0.1 微克/毫升)阻断 6 小时。最后, 都以与细胞生长面平行的方向反复振荡培养物, 或用滴管轻轻敲打细胞层的表面, 使大部分圆亮的M期细胞自然脱壁而悬浮于培养液之中。将上述两种 M 期细胞分别收集于刻度离心管内。

2. I 期细胞取自对数生长期或经上述同步化处理并摇去M期细胞后的底层贴壁细胞, 按常规胰酶消化法收获。

3. 对上述收获的M期和 I 期细胞, 分别作活细胞计数, 每类细胞不少于  $10^6$  个。

## 三、异种细胞融合和 PCC 标本的制备

1. 混合M期和 I 期细胞 将中国仓鼠的M期细胞和赤麂 I 期细胞, 按 1:1( $1-2 \times 10^6$ )的配比混合于离心管中, (同法混合赤麂 M 期和中国仓鼠 I 期细胞), 用 Hanks' 液洗涤 1—2 次, 去除其中的血清和秋水仙素。

2. 细胞融合 离心后去净上清液, 继以手指轻轻弹击管壁, 使管底的两种细胞充分混匀, 随即在 37℃ 水浴中慢慢加入预温的 50%PEG 溶液 0.5—0.7 毫升: (PEG: 分子量, 1000, 上海产品。加温熔融呈液态状后, 与 37℃ 预温的无血清 RPMI-1640 培养液等量混合配制, pH7.2, 随用随配), 边加边用滴管轻轻搅匀, 使细胞悬浮于 PEG 之中, 37℃ 水浴静置孵育 90—120 秒钟。随后缓慢地加入 37℃ 预温的无血清的 RPMI-1640 培养液 10 毫升, 同时用滴管轻轻混匀细胞, 以逐渐稀释并终止 PEG 的作用。

3. PCC 标本的制备 在 37℃ 继续温育 5—10 分钟后, 用无血清的 RPMI-1640 培养液或 Hanks' 液洗涤细胞 1—2 次, 再换入含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 3 毫升, 37℃ 悬浮孵育 30—60 分钟, 最后按常规染色体标本制备法, 分别收获这些细胞制成 PCC 玻

片标本, Giemsa 染色, 镜检并显微摄影记录分析。

## 结果与体会

在低倍镜下已可可见M期细胞和 I 期细胞彼此随机融合并诱导产生多种类型的 PCC 图象。它们分散在许多未融合的单个M期和 I 期细胞之间。其中有中国仓鼠M期细胞诱导赤麂细胞产生各种形态的 PCC; 也有赤麂M期细胞诱导中国仓鼠细胞产生的 PCC; 一个M期细胞有时可以同两个异种 I 期细胞融合并诱导后者同时产生不同时相的 PCC。现将油镜镜检所见描述如下:

### 一、G<sub>1</sub> 期 PCC

#### 1. 早 G<sub>1</sub> 期 PCC

图 3 的中央是中国仓鼠M期细胞诱导赤麂细胞产生的 G<sub>1</sub> 早期 PCC, 为扭曲状的单线染色体, 较粗短。围绕在 PCC 周边的是中国仓鼠 M 期染色体。

#### 2. 晚 G<sub>1</sub> 期 PCC

图 4 的右方是赤麂M期细胞诱导的中国仓



图 3 赤麂细胞早 G<sub>1</sub> 期 PCC



图 4 中国仓鼠细胞晚 G<sub>1</sub> 期 PCC



图5 赤麂细胞早S期PCC

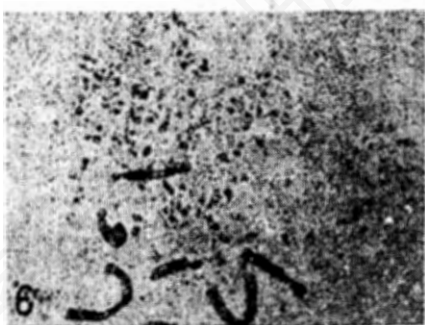
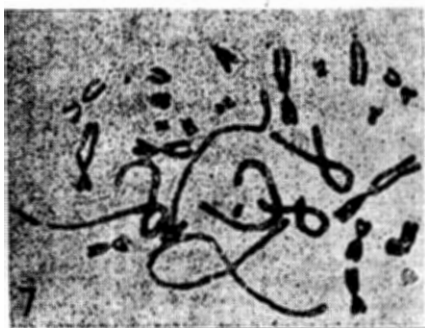


图6 中国仓鼠细胞晚S期PCC

图7 赤麂细胞早G<sub>2</sub>期PCC

鼠细胞的G<sub>1</sub>晚期PCC,为细长并缠绕成团的染色单体,呈线状。其左方粗大而浓染的是赤麂M期染色体。

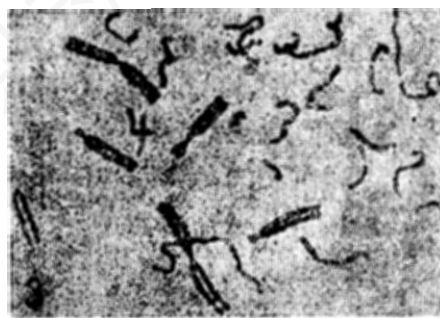
## 二、S期PCC

### 1. 早S期PCC

图5的右下方粉碎性颗粒状结构是中国仓鼠M期细胞诱导的赤麂细胞S早期PCC。

### 2. 晚S期PCC

图6的右上方是赤麂M期细胞诱导中国仓鼠细胞产生的S晚期PCC,亦呈粉碎性颗粒状,但其中已有双线的染色单体片段散在。

图8 中国仓鼠细胞晚G<sub>2</sub>期PCC图9 多核图象,含赤麂细胞的G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>期PCC

## 三、G<sub>2</sub>期PCC

### 1. 早G<sub>2</sub>期PCC

图7的右下方较细长的7条双线PCC,是中国仓鼠M期细胞诱导赤麂细胞产生的G<sub>2</sub>早期PCC。

### 2. 晚G<sub>2</sub>期PCC

图8的右上方是赤麂M期细胞诱导的中国仓鼠细胞G<sub>2</sub>晚期PCC,亦为双线的染色体,但较短。

## 四、多核图象

中国仓鼠M期细胞同时诱导两个赤麂细胞产生不同时期相的PCC。图9左下方是G<sub>1</sub>期PCC,右下方是G<sub>2</sub>早期PCC。

PCC的形态取决于细胞融合时,间期细胞在细胞周期中所处的生长时相<sup>[2]</sup>。G<sub>1</sub>早期到G<sub>1</sub>晚期单线状PCC,由较短逐渐变为细长;G<sub>2</sub>早期到G<sub>2</sub>晚期双线状PCC,由细长逐渐变粗短;S期的粉碎性颗粒状PCC,则由单线粉碎型逐步过渡到双线粉碎型<sup>[3]</sup>。其中不连续部分,已

被证实是 DNA 的复制区<sup>[4]</sup>。PCC 的这些形态变化,说明染色体在细胞周期中经历着连续的“凝聚” $\rightleftharpoons$ “解聚”的循环,在有丝分裂中期,染色质高度凝聚为最粗短的染色体,而在 DNA 合成期,染色体则解聚为最细长的染色质。

我们实验证实,化学细胞促融剂——国产 PEG 介导细胞融合诱发 PCC,使用简便,效果良好,性能也较稳定。但 PEG 对细胞的毒性作用却不可忽视,细胞经 PEG 处理后,死亡率可高达 30—40%,这直接影响细胞的融合率和 PCC 的诱导率。

M 期细胞和 I 期细胞的适当配比,是直接影响细胞融合率和 PCC 诱导率的另一个因素。我们所选用的两种细胞均是成纤维细胞,其形态大小、培养特性也较相似,故采用 1:1 的配比比较为适宜。

细胞融合后的孵育时间也是影响 PCC 诱导率的又一个因素,这是由于 PCC 的诱导,实质上就是异相细胞在融合后的同步化过程<sup>[5]</sup>。它是在一定的孵育时间内逐步完成的。我们实

验的结果是,细胞融合后孵育 30 分钟诱导率可达 20—25%。

我们选用染色体数目较少且易于分析的赤鹿和中国仓鼠两种细胞,证实了间期细胞 PCC 的诱发无物种特异性,这一结果与前人的研究相一致<sup>[6]</sup>。在实际应用方面,对某些血液病患者间期细胞 PCC 的观察分析,已可为预测其病程的现状和发展提供依据;同时也为研究某些理化因子对间期细胞染色体的效应提供条件。

### 参 考 文 献

- [1] 叶秀珍等 (1980) 实验生物学报 13 (2): 203—217.
- [2] Sperling, K. and Rao, P. N., 1974. *Humangenetik*, 23: 235—258.
- [3] Schor, S. L., Johnson, R. T., and Waldren, C. A., 1975. *J. Cell Sci.* 17: 539—566
- [4] Rohme, D., 1975. *Hereditas*, 80: 145—149.
- [5] Obara, Y. et al., 1973. *J. Cell Biol.* 58: 608—617.
- [6] Ikeuchi, T., and Sandberg, A. A. 1970. *J. Natl. Cancer Inst.* 45: 951—963.

## 初生小鼠脾脏细胞培养制备 SCE

虞世嘉

(江西医学院)

近年来,一些实验室多采用外周血、骨髓和睾丸等为材料来制备 SCE<sup>[1-5]</sup>,尚未见到利用淋巴器官内的淋巴细胞来制备 SCE 的报道。小鼠是生物学、医学等学科研究中最常用的实验动物之一,作者利用初生小鼠的脾脏细胞体外培养制备 SCE,取得了成功。

生后 3—5 天的杂种小白鼠幼鼠,经体表消毒后剖腹取脾脏。除去结缔组织,用 Hank's 液洗去表面血污,移置于玻璃细胞匀浆器内,加少量培养液(RPMI 1640,内含 10%小牛血清,双抗,调 pH7.0—7.2),轻轻地将组织研碎,静置 5 分钟,在细胞团块自然沉降后吸取上层

细胞悬液,计算分离的活细胞数,细胞密度调整到  $10^6$  个/毫升培养液。用上述密度的细胞悬液 3 毫升左右,置于 10 毫升的小玻璃瓶内,加 PHA (广州医工所产,最终浓度 200 微克/毫升培养液),37℃ 培养 24 小时后,加 BUdR (最终浓度 20 微克/毫升培养液),避光培养 48 小时。在终止培养前 4 小时加秋水仙素 (最终浓度 0.02 微克/毫升培养液)。终止培养,收获细胞,低渗、固定、滴片等操作过程按常规进行;制成的染色体标本用简化紫外线—Giemsa 法染色<sup>[6]</sup>。

作者共培养了 8 个初生小鼠脾脏样品,每次都获得了一定数量的染色单体差别染色清晰