



## 淋巴细胞的分离及其荧光偏振检测

丰美福 吴政安 刘树森

(中国科学院动物研究所)

董志伟 王杰 万文徽

(北京市肿瘤防治研究所)

淋巴细胞在机体免疫机制中起着重要的作用，并同细胞识别、免疫监视及免疫治疗等问题均有密切关系。随着细胞学和免疫学等研究的不断深入，采用淋巴细胞进行的体外实验日见增多。因此，需要一种纯度和活力较高，既简便易又能保证一定收率的淋巴细胞的分离方法。

从人外周血分离淋巴细胞的方法已有不少报道，一般常用的是 Ficoll——泛影钠（或泛影葡胺）密度梯度离心法。该法的缺点之一是难以完全去除最终样品中所混杂的少量的单核细胞及粒细胞。因此在淋巴细胞的纯度方面不能满足某些实验的需要。例如淋巴细胞胞浆基质结构的测定<sup>[1,2]</sup>（简称 SCM 试验）中需要制备没有单核细胞的高纯度的淋巴细胞样品。我们通过在 Ficoll——泛影钠或泛影葡胺密度梯

度分离前和分离后，分别加用羰基铁粉处理和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  胀溶红细胞这两个步骤，得到了纯度较高的淋巴细胞。下面将此法的具体步骤及结果作一介绍。

### 材料和方法

**玻璃器皿的硅化：**用 2% 甲基硅油（北京化工厂 400# 甲基硅油，用苯配制）均匀涮洗玻璃器皿的内壁，于 200℃ 下烘烤 2 小时。

**淋巴细胞分层液（Ficoll——泛影葡胺或泛影钠）的配制：**将 35.6% 泛影钠 10 份和 8.2% Ficoll 28 份均匀混和（ $d = 1.0810 - 1.0820$ ），或将 33.9% 泛影葡胺 10 份和 9% Ficoll 24 份均匀混和（ $d = 1.0770 - 1.0780$ ）后，用同一双臂比重并称量法，在 25℃ 水浴中平衡 15 分钟，精确测定并校正分层液的比重，使为  $d = 1.0770 - 1.0780$  或  $d = 1.0810 - 1.0820$ 。并且用冰点降低法测定并校正其渗透压，使达到 320—330

联，并且不同的异染色质在卵子发生的不同时期分散。Jones 认为这些事实提示卵子发生过程中，不同的高度重复顺序按照一定的时间程序调节染色体一定区域的浓缩或分散，从而调节与卵子发生有关的基因活动。

高度重复顺序的功能还不甚清楚。通过上述几方面的研究，对其进化和在发育过程中的作用提供了一些线索。MRC 哺乳类基因组研究组把细胞杂交和重组 DNA 技术结合起来分离性染色体的高度重复顺序研究其结构和功能（见第 27 页）。x 染色体和胚胎分化的关系，以及高度重复顺序 DNA 结构和功能的研究，在思路和方法学上很好地说明了细胞生物学和分子生物学相互渗透、相互促进的状况。这是反映

当前细胞生物学研究特点的一个颇有代表性的例子。

### 5. 其它方面

瑞典 Wenner-Gren 研究所和乌布萨拉大学动物系曾经是海胆实验胚胎学研究的中心。自从 Runnström 和 Hörstadius 教授相继去世和退休后，这方面的研究已经衰落了。参观 Wenner Gren 研究所时，B. A. Afzelius 教授出面接待我们。他长期从事精子亚显微结构的比较研究。近来转向用这方面的经验解决瑞典易见的遗传病问题。瑞典居民中有一种纤毛运动障碍的遗传病，患者呼吸道上皮纤毛失去活动能力，痰液无法清除，易患气管炎。同时，精子也不活动。电子显微镜观察发现这种不活动的精子的尾丝内缺少 Dynein arm，因而不能摆动。（下转封四）

毫渗量 (mOSM/千克)。然后经 0.22 微米微孔滤膜过滤, 分装消毒小瓶中, 放在 4℃ 冰箱遮光保存备用。

**羰基铁粉—阿刺伯胶液的配制:** 按每 10 毫升血 0.1 克铁粉的比例, 称取 200 毫克羰基铁粉 (平均粒度 2—8 $\mu$ ), 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗 2 次后, 取细颗粒约 100 毫克, 加入用 PBS 配制的阿刺伯树胶液 5 毫升 (按每毫升 PBS 加阿刺伯树胶粉 20 毫克) 均匀混和, 即为阿刺伯胶包裹的羰基铁粉液。PBS 液按 Dulbecco 方法配制<sup>[3]</sup>, 但 NaCl 含量为 9 克/升。

**淋巴细胞的分离:** 将 11 毫升新鲜肝素抗凝血 (50 单位/毫升), 与 5 毫升阿刺伯胶包裹的羰基铁粉液充份混匀, 按 20—30 转/分, 在 37℃ 下均匀转动 30 分钟, 于磁石上放置 10 分钟后, 吸取上部血液沿管壁徐徐加入到每管 (内径约 1.4 厘米) 5 毫升分层液之上, 共装 3 管。以 2200 转/分 550g 离心 20 分钟, 吸出分层液表面上的淋巴细胞层。用生理盐水, PBS 各洗 1 次后, 加入事先在 37℃ 中温育的 Tris—HCl—0.83% NH<sub>4</sub>Cl 5 毫升, 2200 转/分离心 5 分钟以胀溶红细胞。最后再用 PBS 洗 2 次后, 悬浮于 PBS 中, 放 4℃ 冰箱中待用。

**淋巴细胞的存活率、回收率和纯度鉴定:** 用苔酚蓝染色测定细胞的存活率。将分离所得淋巴细胞加一

滴血清混合后作涂片, 甲醇固定和 Giemsa 染色。镜检 100 个细胞, 以计算淋巴细胞的纯度, 同时计算 100 个白细胞中淋巴细胞数, 乘以每毫升肝素血中白细胞数, 再乘以肝素血毫升数, 即为淋巴细胞数的理论值。分离所得淋巴细胞悬液毫升数, 乘以百分纯度, 即为实际所得的淋巴细胞数。淋巴细胞实际数与理论数的比值乘以 100, 即为百分回收率。

**淋巴细胞的荧光偏振检测:** 1. 将分离所得人外周血淋巴细胞, 按每毫升  $6 \times 10^6$  浓度悬浮于 PBS 中, 取 0.1 毫升细胞悬液, 在 37℃ 保温 1 小时后, 或取 0.1 毫升细胞悬液加入 10 微升 PHA (植物血凝素, Difco 1:10) 37℃ 保温 1 小时后, 加入 1 毫升二醋酸荧光素 (FDA), 立即用 RE-502 荧光分光光度计在 25℃ 恒温下同时连续测定 6 分钟内平行和垂直于激光偏振光轴方向的荧光偏振光强度, 即  $I_{VV}$  和  $I_{VH}$ 。然后, 将细胞滤掉, 测定滤液的荧光偏振光强度, 应用外推法求得过滤时刻细胞内荧光偏振光强度, 再根据下列公式, 计算出细胞内的荧光偏振度  $P$ <sup>[4]</sup>。测定

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad G = 0.62$$

所用激发光波长为 470 毫微米, 发射光波长为 510 毫

表 I 人外周血经 Ficoll—泛影葡胺一步处理后的分离结果

例数	采血量	产 量	淋巴细胞纯度	污 染 率			回 收 率	存 活 率
				红 细 胞	单核细胞	粒 细 胞		
12	5.45 毫升 (4—7毫升)	$5.53 \times 10^6$ ( $2-9 \times 10^6$ 个细胞)	$71.33 \pm 11.82\%$ (55—88%)	24.2% (5—39%)	1.2% (1—3%)	3.5% (1—8%)	43.2% (12—67%)	95.9% (94—99%)



图 I 人外周血经 Ficoll—泛影葡胺梯度离心后的分层图

微米。G 为荧光单色器的校正因子, 在本实验条件下, 经测定为 0.62。2. 淋巴细胞的显微荧光活度观察。取一滴淋巴细胞与二醋酸荧光素 (FDA) 的混和液置于载玻片上。在荧光显微镜下, 观察细胞内所激发荧光的情况。

## 结果和讨论

一、人外周血淋巴细胞经 Ficoll—泛影葡胺 ( $d = 1.0770-1.0780$ ) 梯度离心一步处理后, 所得的分离结果见表 I 和图 1。

由表 I 可见, 人外周血经 Ficoll—泛影葡胺一步处理后所得淋巴细胞的平均纯度为  $71.33 \pm 11.82\%$ , 其中红细胞污染最严重, 占

24.2%，其次是粒细胞和单核细胞，分别占3.5%和1.2%。所得淋巴细胞的平均回收率为43.2%，平均存活率为95.9%。

二、人外周血经 Ficoll——泛影葡胺梯度离心，Tris—HCl—0.83% NH<sub>4</sub>Cl 胀溶红细胞二步处理后分离结果见表 II。

表 II 人外周血经 Ficoll——泛影葡胺，Tris—HCl—0.83%NH<sub>4</sub>Cl 二步处理后的分离结果

例数	采血量	产 量	淋巴细胞纯度	污 染 率			回 收 率	存 活 率
				红 细 胞	单核细胞	粒 细 胞		
8	3.69 毫升 (3—5毫升)	3.75 × 10 <sup>6</sup> (6—12 × 10 <sup>6</sup> 个细胞)	88.75 ± 4.76% (78—94%)	2.1% (1—6%)	1.3% (1—3%)	1% (1—4%)	29.3% (13—54%)	93.9% (90—100%)

由表 II 可见，人外周血在 Ficoll——泛影葡胺梯度离心后，经过 NH<sub>4</sub>Cl 胀溶二步处理，分离所得淋巴细胞平均纯度为88.75 ± 4.76%，与表 I 结果相比有所提高。其中红细胞的污染大大降低，由24.2%下降到2.1%，但仍混染有一定数量的单核细胞和粒细胞，分别为1.3%和1%。淋巴细胞的平均回收率为29.3%，平均存活率为93.9%。

II 和图 III。

由表 III 可见，经过羧基铁粉，NH<sub>4</sub>Cl 胀溶等三步处理后，使分离所得淋巴细胞的平均纯度大为提高，由71.33 ± 11.82%上升到98.18 ± 1.52%。表明不同处理方法的差异是显著的 (P < 0.05)。吞噬了铁粉的单核细胞和粒细胞在磁铁的吸引下被沉降，从而达到分离的目的。但当铁粉用阿刺伯胶液包裹后，更易于这类细胞所吞噬，并可减少溶血现象。在铁粉处理的过程中不宜剧烈振荡，而且要尽量把未被吞噬的铁粉去干净，否则容易引起溶血并影响分层效果。

三、人外周血经羧基铁粉，Ficoll——泛影葡胺（或泛影钠）和 Tris—HCl—0.83% NH<sub>4</sub>Cl 胀溶三步处理后的分离结果见表 III、图

表 III 人外周血经羧基铁粉 Ficoll 梯度离心 NH<sub>4</sub>Cl 胀溶三步处理后的分离结果

例数	采血量	产 量	淋巴细胞纯度	污 染 率			回 收 率	存 活 率
				红 细 胞	单核细胞	粒 细 胞		
34	8.78 毫升 (5—11.5毫升)	4.88 × 10 <sup>6</sup> (0.7—10 × 10 <sup>6</sup> 个细胞)	98.18 ± 1.52% (95—100%)	0.8% (32.35%有污染从1—5%)	0.59% (偶见)	0.7% (1/2偶见)	24.8% (12—44%)	96.8% (97—100%)

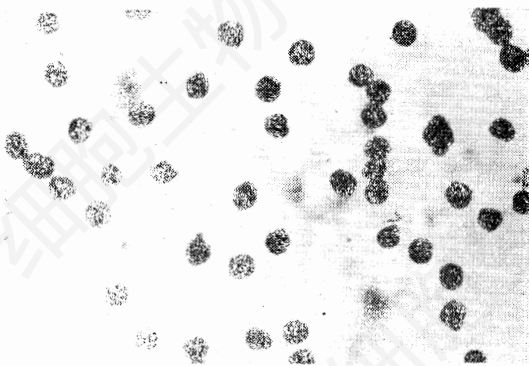


图 I 人外周血经羧基铁粉，Ficoll 梯度离心和 NH<sub>4</sub>Cl 胀溶三步处理后所得的淋巴细胞 × 540

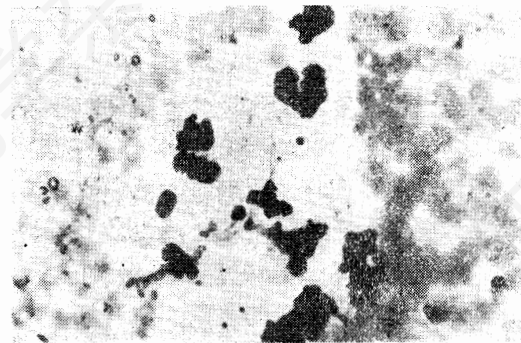


图 II 吞入 Fe 颗粒的单核细胞及粒细胞

分层液的比重, 以及与细胞接触的一些试剂的渗透压的精确测定是很重要的。因为我们不但希望有纯度高和一定数量的细胞, 更希望有活力较高, 保持体内生理功能的反应细胞。采用的同一双臂比重并 25°C 称量法及冰降法分别测定比重及渗透压, 前者的测量精度可达小数点第四位。

从以上分离结果看来, 三步处理法可以得到高纯度、高存活率和一定产率的淋巴细胞, 分离过程也较简单, 因而在要求较高的实验中, 与其它种种方法相比, 有其可取之处。

淋巴细胞的荧光偏振检测, 目前在国内还是一项较新的技术。根据 29 例正常人淋巴细胞的测定结果, 其细胞内荧光偏振度 P 的平均值为  $0.182 \pm 0.024$ 。接受 PHA 刺激后, P 值平均下降 20% 左右, 表现仍具有正常生理功能

的正常人淋巴细胞的反应特性。

淋巴细胞的显微荧光活度观察结果也表明, 所分离的细胞具有正常的膜的通透性。当 FDA 与细胞接触后很快就透过细胞膜进入细胞浆, 经脂酶水解而显出翠绿色的荧光。凡属活力低的细胞发出的荧光强度也弱, 甚至无荧光可见。

### 参 考 文 献

- [1] Cercek, Lea and B. Cercek, 1977, *Europ. J. Cancer.*, 13; 903—915.
- [2] 董志伟 刘树森, 生物科学参考资料 第 11 集 97 页.
- [3] Dulbecco, R, and M. Vogt, 1954, *J. exp Med.*, 99: 167.
- [4] R. F. Chen, & R. L. Bowman, 1965, *Science Vol.*, 147: 3653—3659 p. 729.

## 用两相法纯化具有生物活性的质环\*

何俊坤 朱心良

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

质环的纯化国外多半采用超离心技术<sup>[1-5]</sup>, 也有采用硝基纤维素柱过滤<sup>[6]</sup>、甲基化蛋白柱<sup>[7]</sup>、制备电泳<sup>[8]</sup>及酸酚抽提法<sup>[9]</sup>的报道。前者需要超离心机, 后者操作烦琐、费时。我们参照 Guerry 等人<sup>[10]</sup>和 Ohlsson 等人<sup>[11]</sup>的方法, 加以改进。本文介绍的方法纯化质环, 既不受仪器设备的限制, 又能做到快速、简便和节约。

两相法纯化质环的原理是: 由于质环是共价闭合环状 DNA (Covalent closed Circular DNA), 共价闭环 DNA 热变性后复性的动力学与染色体之间有很大的差别, 前者复性比后者容易。利用这种特性, 质环 DNA 和染色体 DNA、RNA 的混合物, 经热变性后迅速冷却于干冰酒精中。质环 DNA 即复性为双链状态,

而染色体 DNA 仍为单链。在两相分配系统中, 双链 DNA 留在聚乙二醇相(上相), 单链 DNA、RNA 留在葡聚糖相(下相), 从而达到了分离的目的。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 材 料

##### 1. 药品、试剂:

葡聚糖(Dextran T<sub>500</sub>) 以下简称 Dextran 瑞典产品; 聚乙二醇(以下简称 PEG), 上海奉贤光明化

\* 本文摘要曾在第三届全国生物化学学术会议上宣读。参加工作的还有军事医学科学院逯好英和武汉大学张楚富, 冯锦明参加部分实验。电镜工作由龚启蕙、王妙珠同志担任; 文章内电泳照片由许海滨同志拍摄, 特此致谢。