

米, 上开三口, 中间口安装球形搅拌杆。500毫升瓶直径7厘米、高16厘米, 上开五个口, 中间口安装球形搅拌杆, 周围四个口需要时可以安装取样器、空气—CO₂混合气体进出口等。球形搅拌杆下部为一空心玻璃球, 内装磁铁, 上部用橡皮塞固定在培育瓶中间口上, 中间以硅橡胶管联接。当电磁搅拌器上磁铁转动时, 由于磁力作用带动球形搅拌杆以一定角度围绕培育瓶垂直中心线搅动, 搅动营养液使微载体悬浮起来。

二、微载体培养装置的应用

我们使用自制实验室微载体培养装置成功地培养了鸡胚原代细胞, 用以繁殖新城鸡瘟病毒, 以及培养 BHK₂₁ 细胞, 用以繁殖口蹄疫病毒。在使用500毫升培育瓶时, 装液量200毫升, 微载体 Cytodex 1 2毫克/毫升, 搅拌转速35—45转/分, 接种原代鸡胚细胞40万/毫升, 细胞均能在微载体上很好地贴附, 贴球率接近100%, 3—4天基本长成愈合单层, 满球率为84.1%(图4见封四), 细胞产量为 4.66×10^6 /毫升。接种新城鸡瘟病毒后48小时收获, 病毒滴度 >7.5 TCID₅₀/毫升。使用100毫升瓶, 装液量40毫升, 搅拌转速50—55转/分, 也得到了同样的结果。

在细胞微载体培养中搅拌是一个重要因素。必须使培育瓶中微载体成均匀的混浊悬液, 任何部分没有沉积物, 同时, 搅拌也要尽可能的温和, 防止因为搅拌产生的剪力 (shear force) 使细胞从微载体上剥离。要防止转速恒

定后的突跳现象。我们设计制作的电磁搅拌器在外界电压波动的情况下仍能维持恒定的转速, 采用球状杆搅拌器比通常的桨式搅拌器能够在较低的转速下使所有的微载体呈悬浮状态, 不产生沉积物。同时具有结构简单、容易制作的优点。采用水浴恒温, 温度控制精确 ($\pm 0.2^\circ\text{C}$), 不需要放置在恒温室里, 同时, 电磁搅拌器产热和震动也不影响培育瓶中的微载体。总之, 这台实验室微载体培养装置具有体积小、结构简单、使用方便、性能可靠的优点。

在培育瓶中营养液中 pH 变化, 在通常500毫升以下时可以通过营养液中所加指示剂酚红的颜色变化直接观察, 并通过更换营养液来控制 pH。我们也是采用上述方法来观察和调节 pH 的。如能采用通入一定比例的空气—CO₂混合气体来维持 pH, 则能收到更好的效果。

参 考 文 献

- [1] van Wezel A. L., 1973. *Tissue Culture Methods and Applications* ed by Paul F. Kruce, Academic Press p. 372—377.
- [2] Pharmacia Fine Chemicals, 1981. *Microcarriers Cell Culture: principles & methods* p. 35—37.
- [3] H. M. Smith et al., 1966. *Laboratory Practice* 15:864—866.
- [4] 张兴义等, 1978. 生物制品通讯 7(5):214—216.
- [5] 施坚等, 1982. 病毒学集刊, 1:143—148.
- [6] 朱德厚等, 1982. 细胞生物学杂志, 4(2): 32—36.

基础知识

细胞定量吸收光度方法及误差分析

胡 匡 祐

(中国科学院生物物理所, 北京)

细胞定量吸收光度方法对于生物学、医学和农学的研究有着十分重要的意义。该方法能对生物样品进行化学成份的超微量分析(小于

10^{-15} 克)和光谱分析, 特别对微区(直径小于 $0.1 \mu\text{m}$)样品的分析, 更显示其优越性。

当用统计方法研究一群细胞、组织或生物

体的显微特征时,一般采用三个基本形式:

(1) 确定被测样品中某种化学物质微小变化量的平均值。

(2) 研究被测样品各参数的曲线和分布特性。

(3) 分析被测生物体的同异性,并区分和辨别两群生物体。

随着新技术的出现,显微吸收光度术这个实验技术也在不断地发展,并更趋于完善。只有正确运用和掌握各种测量方法,并善于克服各类误差,才有可能获得正确的测量结果。

基本原理

细胞吸收光度方法是将窄带单色光,聚焦成微束光,并以不同波长的光波透射样品。通过被测物质的特异性光谱吸收的峰值位置和吸收值,来确定被测物质的含量。依据 Beer-Lambert 定律,比较光波通过被测物质前后光强来推算透射率:

$$T = \frac{\int_{\lambda_a}^{\lambda_b} I_{\lambda} \cdot G_{\lambda} \cdot 10^{-E_{\lambda}} d\lambda}{\int_{\lambda_a}^{\lambda_b} I_{\lambda} \cdot G_{\lambda} d\lambda}$$

其中: I_{λ} —入射光强; E_{λ} —消光; G_{λ} —检测相对灵敏度; $I_{\lambda} \cdot 10^{-E_{\lambda}}$ —出射光强; λ_a 至 λ_b —光谱宽度

平行的单色光透射均匀吸收层时,其消光值是透射率倒数的对数

$$E = \lg \frac{1}{T} = \epsilon ch$$

其中: ϵ —克分子吸收系数; C —浓度; h —吸收层厚度

以上公式要求被测物质均匀分布,光源为平行单色光,而且样品的浓度不能很高或很低,因此在仪器结构和测量方法上要着重考虑克服和减小测量误差。

测量方法

在测量过程中,被测生物样品内常常是不均匀的,所引起的误差可用扫描积分方法,双

波长方法和一波长两区域等方法来克服。下面阐述几种基本测量方法:

一、单波长方法

当被测物质分布比较均匀或吸收光密度值小于 0.1_{OD} 时,可认为样品是均匀的,用单波长方法比其它方法测量效果更好一些^[1]。通过测量消光值,可计算出样品的浓度 C 和物质的含量 m :

$$C = \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{E}{h}$$

$$m = V \cdot C = \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{V \cdot E}{h} = \frac{S \cdot E}{\epsilon}$$

式中: V —样品体积; S —样品面积。在相对含量测量中, ϵ 为常数,相对含量为:

$$M = S \cdot E$$

单波长方法简便,但在样品浓度较大、分布不均匀时,将产生显著误差。

二、双波长方法^[2]

双波长方法有效地改善了单波长技术,较大程度上减小了物质分布不均匀所产生的误差。该方法是建立在概率性分析的基础上,并运用被测样品的固有光谱特性,从而获得被测物质的总质量:

$$m = \frac{S}{\epsilon(\lambda_2) \cdot \ln 10} \cdot [1 - T(\lambda_2)] \cdot R$$

计算常量:

$$R = \frac{1}{2 - Q} \cdot \ln \frac{1}{Q - 1}$$

其中:

$$Q = \frac{1 - T(\lambda_1)}{1 - T(\lambda_2)}$$

在相对测量中 $\epsilon(\lambda_2)$ 为常量,因此相对含量:

$$M = S \cdot [1 - T(\lambda_2)] \cdot R$$

上式亦可用透射率表示:

$$M = \frac{[1 - T(\lambda_2)]^2 \cdot S}{1 - 2T(\lambda_2) + T(\lambda_1)} \lg \frac{1 - T(\lambda_2)}{T(\lambda_2) - T(\lambda_1)}$$

其中: $T(\lambda_1)$ —吸收光谱峰处的透射率; $T(\lambda_2)$ —吸收峰值一半处的透射率(见图 1)。

双波长方法的计算和操作较麻烦,这方面

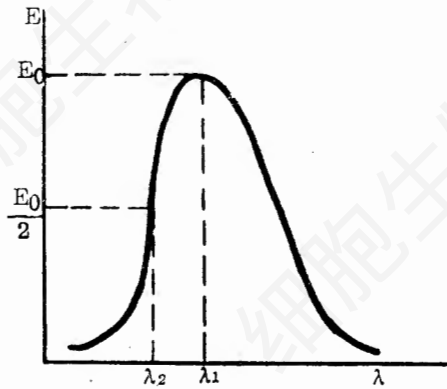


图1 吸收光谱示意图

已有不少研究者设法解决这一弱点, 包括利用简化计算表和运用计算机直接读出结果。然而, 由于物质的特异性吸收光谱受着染色量和非样品讯号的干扰而变化着, 因此在确定 λ_1 和 λ_2 时, 会引起测量误差。如常用的 Feulgen 染色的 λ_1 在 565—580 nm, λ_2 在 505—510 nm 范围内变化。

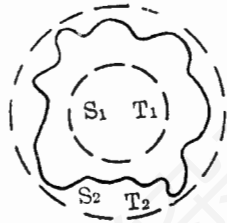


图2 一波长两区域方法原理图

三、一波长两区域方法^[3]

继双波长之后, 建立起一波长两区域方法。图2所示的两区域面积 $S_1 < S_2$, 分别包括有被测物质的吸收区和没有被测物质的非吸收区, 其总透射率由下式给出:

$$T_2 = T_1 \frac{S_1}{S_2} + \frac{S_2 - S_1}{S_2}$$

因此 $T_2 S_2 = T_1 S_1 + S_2 - S_1 = (T_1 - 1) S_1 + S_2$

即: $S_1 = \frac{(1 - T_2) S_2}{(1 - T_1)}$

测得通过样品面积为 S_1 的透射率 T_1 , 再测出包括全部样品和空白面积 S_2 的透射率 T_2 , 此时样品某成分的相对含量为:

$$M = E_1 S_1 = \frac{(1 - T_2) S_2}{(1 - T_1)} \cdot \lg \frac{1}{T_1}$$

一波长两区域方法, 十分适合于测量形状不规则的样品, 应用简便, 在一定程度上克服了样品分布不均匀的误差, 并可避免双波长方法由于吸收波长微小变化所引起的测量误差。但该方法两个区域的尺寸要选择得合适, 才能获得较好的测量精度。

四、扫描积分方法

扫描方法是建立在严格数学基础上的方法。由于测量光点比被测样品小得多, 在此区域内的样品是近似均匀分布的。图3是扫描步

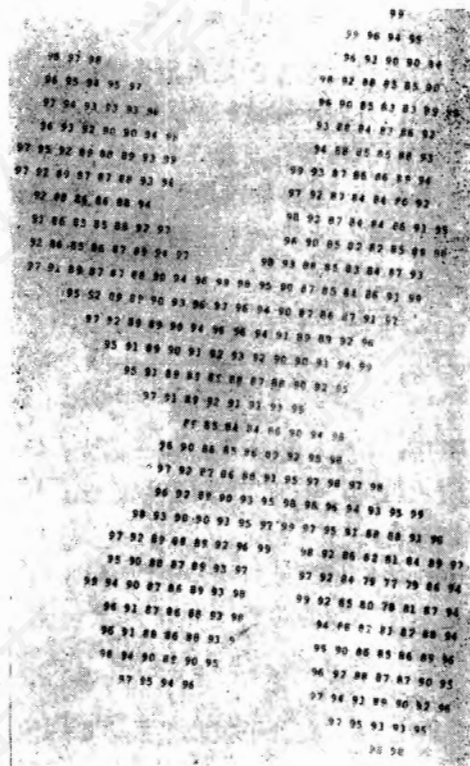


图3 染色体扫描光密度分布图

距 $0.25 \mu\text{m}$ 的染色体扫描光密度分布图。样品中物质总量, 由逐点的吸收值和面积乘积的总和给出:

$$M = m_1 + m_2 + \dots + m_n = (E_1 S_1 + E_2 S_2 + \dots + E_n S_n) \frac{1}{\epsilon}$$

即 $M = \frac{S}{\epsilon} \sum_{i=1}^n E_i$

扫描是沿着扫描方向或沿着积分面积的连续积分，其平均光密度由下公式表示

线扫描：
$$E_l = \int_0^L E_i dL$$

面扫描：
$$E_s = \frac{\rho}{S} \sum_{j=1}^n \int_0^{L_j} E_i dL$$

其中： E_i —测量点的光密度变化值； L —扫描线长； ρ —扫描邻近线距离。

扫描方式有两种：对样品直接扫描和经光学透镜放大后的影像扫描。前者是载物台的机械扫描，扫描步距有 $10\ \mu\text{m}$ 、 $2.5\ \mu\text{m}$ 、 $0.5\ \mu\text{m}$ 和 $0.25\ \mu\text{m}$ 。后者是新近发展的一种高分辨率的扫描系统，该系统的一种是反射镜扫描 (Mirror Scanner)，其等效扫描步距为 $0.1\ \mu\text{m}$ ；另一种为透镜扫描 (Lens Scanner)，可获得等效于物体测量面上的两点间隔为 $0.05\ \mu\text{m}$ ，这就有可能对染色体进行形态和结构的定量分析^[4]。

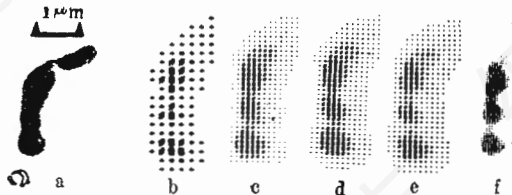


图4 不同扫描参数染色体q臂光密度点阵图象

图4为中期15号染色体q臂，在不同扫描参数条件下的光密度点阵图像^[5]。图中a为摄影像，b(扫描步距 $0.2\ \mu\text{m}$ 、光阑 $0.2\ \mu\text{m}$) 仅能区分三个带，c(步距 $0.1\ \mu\text{m}$ 、光阑 $0.3\ \mu\text{m}$)、d(步距 $0.1\ \mu\text{m}$ ，光阑 $0.2\ \mu\text{m}$)、e(步距 $0.1\ \mu\text{m}$ ，光阑 $0.1\ \mu\text{m}$)可辨别四个带，而f(步距 $0.5\ \mu\text{m}$ ，光阑 $0.16\ \mu\text{m}$)则四个带清晰可分。以上说明步距与光阑合理的配合，才能获得高的图像分辨能力。



图5 扫描点的运动方式

扫描点的运动形式分三种：搜索扫描 a，梳形扫描 b 和迂迴扫描 c (见图5)。前一种用于确定样品大小和位置，后两种用于辨别样品的形态和特征。

扫描方法误差主要决定于扫描定位精度和扫描点的重复性。该方法不仅给出被测样品的吸收光信息，而且能给出物质分布、大小形状和微细结构。由于精细细胞自动扫描技术的完善和分析细胞的计算机软件的迅速发展，使得能以快速和精确的特点开展对细胞图像的识别和分类，实现以机器模拟或代替人某些智能活动。计算机可根据细胞扫描图像的各种特征，诸如核浆比、染色质颗粒粗细、核形状、核位置、核膜及胞浆形状等特征，来判断细胞所属的类别。

误差来源与误差分析

测量中，所有误差可归结于两类：系统误差和统计误差。系统误差一般是由于仪器结构和缺陷、不正确的调节与操作而产生测量平均值与真值之间的偏差，这种偏差是可以采取各种手段减少和消除的。统计误差是随机的，只能用统计处理的方法来克服，下面分别讨论这两种误差。

一、系统误差

1. 来源于仪器系统 (1) 闪光误差 标本、透镜和其它光学器件上的异物，诸如油迹，灰尘以及过大的照明场均引起闪光。闪光导致光密度值的下降。合理地减小照明场的尺寸，将光学玻璃表面镀抗反射膜，保持光学器件的清洁，可将闪光误差控制在1%以内。(2) 单色器的杂散光、室内照明光和日光等对测量光

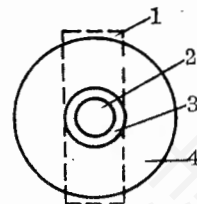


图6 合轴

束的干扰,应控制在0.8%以内。(3)照明场聚光物镜的数值孔径(NA)的大小直接影响测量精度。据Beer-Lambert定律的要求,透射样品的光点应为平行光,而实际光路为聚焦光,使得通过样品四周光线比光轴中心处光程要长,引起透射光强减弱。减小聚光物镜的数值孔径,使光束为准平行光,有助于克服非平行光的影响。但随着数值孔径的减小,显微系统的分辨率下降,光源能量的损失增大。因此一般选择数值孔径为0.1—0.6之间。(4)各光学器件偏离光轴,造成测量光的损失,甚至导致错误的测量结果。光轴的重合情况如图6所示。通常要求单色器的出射狭缝1、测量光阑2、照明场光阑3和视野照明光阑4的光轴严格重合。(5)光学系统和讯号电子学放大系统的非线性引起的误差^[6]。测定测量光能量B与透射率T的关系曲线来考核线性度,由于光能量 $B \sim S = \frac{\pi D^2}{4}$ (S为测量光阑面积, D为直径),又因 $D^2 \sim T$,因此B—T的关系曲线可用 $D^2—T$ 的曲线来表征。在光能量变化8倍的情况下,平均线性度应小于 $\pm 1\%$ 。如仪器线性度较差,则应作校正曲线,纠正非线性偏差。

此外,光源的稳定性、单色器波长精度及分辨率、样品聚焦的清晰度、放大系统线性度和动态跨导、光电倍增管的暗流大小及均匀场照明的调整等直接影响测量结果。在测量中必须找出产生系统误差的原因,才能消除它。通常借助于精度较高的仪器、标准参考材料(如经计量标定的中性滤片)、制备典型的生物样品^[7],来考核和提高仪器的精度。

2. 来源于生物样品系统 (1) 生物样品本身固有特性引起测量结果的误差。生物标本常出现大小不等的微颗粒,因其不同的折射率而引起散射;微细光束透过有一定结构的样品会产生衍射光而发生干涉;某些物质的定向排列而产生双折射,生物材料双折射度一般较小,在0.01—0.001之间。(2) 生物材料一般分布是不均匀的,因此产生分布误差。相对分

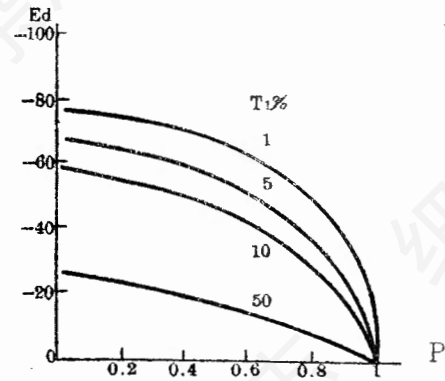


图7 分布误差Ed与透射率 T_1 和系数P的关系曲线

布误差可用下式表示:

$$Ed = f(P, T_1) = \frac{P \cdot \lg T_1 - \lg [P(T_1 - 1) + 1]}{P \cdot \lg T_1}$$

上式可用图7的曲线来表示。当被测物质的透射率 T_1 分别为1%、5%、10%、50%时,相对分布误差Ed与被测物质占有光度场的百分数P的关系曲线,可得到如下几个结论:被测物质占有光度场百分数P越小,相对误差Ed越大;被测物质浓度越小(即透射率大),误差也越小,因此对于吸收较大的物质,利用不同的制备方法,将样品面积增大,降低吸收来减小误差,当被测物质占有整个光度场,亦即 $p=1$ (均匀分布),则 $Ed=0$ 。(3)当制样技术不符合要求时,会造成显著误差。如细胞重叠或过于密集,样品纯度不好,混有其它非测量细胞和细胞碎片。制出样品要力求背景均匀,使用的载玻片,盖玻片,试剂染液,封固剂及操作方法要力求较好的重复性和稳定性。

二、统计误差

统计误差表征测量结果平均值的分散度。在测量过程中,在消除了引起系统误差的一切因素后,仍然会存在随机误差。这是因为生物样品存在着个体差异,亦造成群体生物量的变异。生物的品系越纯,其个体差异亦小,结果就准确。对于取决于几率的误差,如误差的大小和方向,可用增加测量次数的方法,使偶然误差的算术平均值尽量减小。

统计误差遵守 Gaussian 定律的统计分布，用标准偏差表达：

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{N-1} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N}$$

其中： σ —标准偏差； x_i —单个测量值； N —测量值的总目数； \bar{x} — N 个数值的平均值，被测样品的真值从理论上是很难以确定的，但测得结果精确的范围可用下式表示：

$$\text{上限} \quad x + \sigma (f_N / \sqrt{N})$$

$$\text{下限} \quad x - \sigma (f_N / \sqrt{N})$$

$$\text{精确的区间} \quad \pm \sigma (f_N / \sqrt{N})$$

其中 f_1 —与 N 值相关的计算因子。

资料

建国以来我国自建的一些细胞株或系(二)

人体恶性胸膜间皮瘤细胞系 SMC-1

材料取自一男性恶性胸膜间皮瘤患者的右全部胸膜和全肺切除标本，采用组织块静置培养法而建成的一长期传代的细胞系。

该系细胞呈多形性、具有明显的重叠生长特征，细胞群体倍增时间约 32 小时，最高分裂指数达 46-50%，染色体众数为 60-70。异种移植之肿瘤及原培养材料三者具有同一的组织化学特征。此系细胞至今已在体外培养传代 120 多代，目前细胞生长良好，传代稳定，保存在上海市胸科医院肿瘤实验室内。

参考文献：

吴善芳、王恩忠、苏建中、徐蕙萱、林震琼、沈慈源、徐昌文、陈瑞铭、叶秀珍、朱德厚、杨正洪，1984。中国科学，1：53-57。

(中国科学院上海细胞生物学研究所朱德厚撰稿)

草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901 S₁ 介绍

ZC-7901 细胞株取材于健康的 7-8 月令小

参考文献

- [1] Розанов, Ю. М., 1968, *Цитология*, 4:521-522.
- [2] Horst Piller, 1977, *Microscope Photometry*, 187-188.
- [3] Alfredo, M. G., 1965, *J. Histochem, Cytochem.* 13:161-167.
- [4] Rugar, D. et al., 1980, *J. Microscopy* 120:193-194.
- [5] Wayne, A. W. et al., 1981, *J. Microscopy*, 124:165-167.
- [6] 胡匡祐等, 1983. 中国生物医学工程学报, 2(4):243-249 页。
- [7] 胡匡祐等, 1983. 生物化学与生物物理进展, 2:56-58 页。

草鱼的吻端表皮。先以组织块法静止培养，5-6 天后，选择生长晕上细胞生长旺盛而茂密者，进行传代培养。传代成功率不高，长成单层细胞的时间在 20 多天至 2 个多月不等。5~6 代后，细胞逐渐稳定在 4 天左右传代一次。至 1979 年 12 月，细胞连续培养 12 个多月，传至 63 代，建立了细胞株，定名为 ZC-7901；当该细胞传至 11 代时，用毛细管从中分离到一个亚株，定名为 ZC-7901 S₁，至 1979 年 12 月，传至 35 代。两株细胞以含 15% 小牛血清的 199 为培养液，酸碱度调节到 pH 7 左右，正常培养温度为 25-28℃。

ZC-7901 细胞株为上皮样细胞和梭形细胞混合型，ZC-7901 S₁ 为上皮样细胞型。两株细胞在 2-4℃ 下可保存 7 天至数月，在 12℃ 下有极缓慢生长增殖，20℃ 增殖加快，25-28℃ 增殖最佳，30-32℃ 生长过旺而很快衰老，36-37℃ 时细胞死亡。两株细胞的染色体数目为 2n=48，在 120 代内，染色体数目仍保持在正常范围以内。

两细胞株的早代细胞于 1979 年 11 月保存在中科院上海细胞生物学研究所和本所实验