

- [5] Messier, P. E. et al., *Cytogenet Cell Genet* 1986, 43 : 207—210.
[6] Rasmussen, S. W., *Chromosoma* 1976, 54 : 245—293.

- [7] Ruzicka F., *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, Vol 7 (Van Nostrand, Reinhold, and Camp, New York) 1977.

用荧光激活细胞分选仪检测细胞存活的两种不同染色方法的比较

李永镛 冷 勇 林国妹

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

荧光激活细胞分选仪(FACS)的主要功能之一是利用荧光标记抗体来检测细胞表面标志,进行细胞类群的分析及其功能的研究。在这类研究中,通常要求所检测细胞为活细胞,否则荧光标记抗体可能渗入胞内造成假象。为此在检测细胞表面标志的同时,最好能测定染色细胞存活的情况。

以前向散射(Forward scatter, FSC)为指标, FACS可以检测细胞的存活。但是,由于引起细胞死亡的原因不一,它们的FSC的变化也就不同。尤其当所测细胞样品中,细胞大小变化较大时,将严重影响以FSC来检测细胞存活的结果。另一类方法是用某些荧光染料染细胞,以细胞有没有荧光来决定细胞存活与否。碘化乙啶(Propidium iodide, PI)^[1]和荧光生成化合物——二乙脂荧光素(Fluorescein diacetate, FDA)^[2]是两种常用的染料。PI和FDA的酶解物——荧光素均可用可见光(488 nm)激发,前者使死细胞着红色荧光,后者使活细胞着绿色荧光。因此,用荧光染料染色法来检测细胞存活可以避免以FSC为指标的方法的缺点。同时,已经知道用于细胞表面标志研究用的荧光抗体的常用的荧光素有异硫氰酸荧光黄(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、罗达明(Rhodamine, Rho)和藻红蛋白(Phycocrythrin, PE),它们的激发光波长与PI和

FDA相近,均可用488 nm光来激发,发射光分别为绿色(如FITC)和红色(如Rho和PE)。因此,对比PI、FDA和Rho、PE、FITC的上述特性,两者结合起来,就可以达到同时检测同一个细胞的表面标志及其存活情况。本文比较了用FACS检测细胞存活率的PI和FDA两种染色方法,以进一步肯定其可行性。

材 料 和 方 法

1. 细胞样品的制备

取小鼠脾脏,以机械方法制成脾细胞悬液。脾细胞悬液的溶液为含2%新生牛血清的磷酸缓冲生理盐水(BS-PBS)。调整细胞悬液的浓度为 $2 \times 10^7/\text{ml}$,以锥蓝除外试验测定细胞的存活率为95%左右,以此作为活细胞悬液。另外,将细胞悬液置于56℃水浴中加温30分钟,锥蓝除外试验表明约98%细胞死亡,以此为死细胞悬液。将上述两种细胞悬液以不同比例混合,制备成存活率不同的细胞样品。

2. 细胞样品的染色

1体积细胞样品加4体积BS-PBS,然后加入5体积PI或FDA溶液。PI的终浓度为0.05 mg/ml, FDA的终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。前者于冰浴染色10分钟,后者于37℃温育染色30分钟,然后进行FACS分析。

3. FACS的分析

所采用的荧光激活细胞分选仪是Becton-Dickinson公司的产品——FACStar^{plus}。用5^W的氩离子激光,激发波长为488 nm,功率为200 mW。检测的发

射光波长;测量时 FL 1, 加 530 nm 高通滤片; FL 2 加 585 nm 高通滤片。测量结果以单参数直方图和双参数点阵图表示。数据采集和处理用的计算机为 HP 9000 Series 300。

结果和讨论

1. 两种染色方法的可靠性及一致性

将活细胞悬液和死细胞悬液以体积按 90:10、70:30、50:50 混合, 制成不同存活率的细胞样品, 然后分别按方法所述进行染色和 FACS 分析。已经知道, PI 是一种能与 DNA 结合的荧光化合物, 它不能穿越活细胞膜, 但

能穿越死细胞膜进入细胞, 与 DNA 结合。这样死细胞带上红色荧光(FL 2)。FDA 是一种荧光生成化合物, 本身不会发生荧光。它能穿越细胞膜进入细胞内部, 受到脂酶水解产生游离荧光素。游离的荧光素不能穿透活细胞膜, 但能穿越死细胞或垂死的细胞膜而逸漏到细胞外。因此活细胞显示为强绿色荧光(FL 1), 死细胞却不具有强荧光。

附图是 FACS 检测结果的直方图。图中 A 为 PI 染色法的结果, 可清楚地看到分别代表死活细胞的两个峰, 左侧的峰代表活细胞(不显示荧光), 右侧的峰代表死细胞(显示强荧

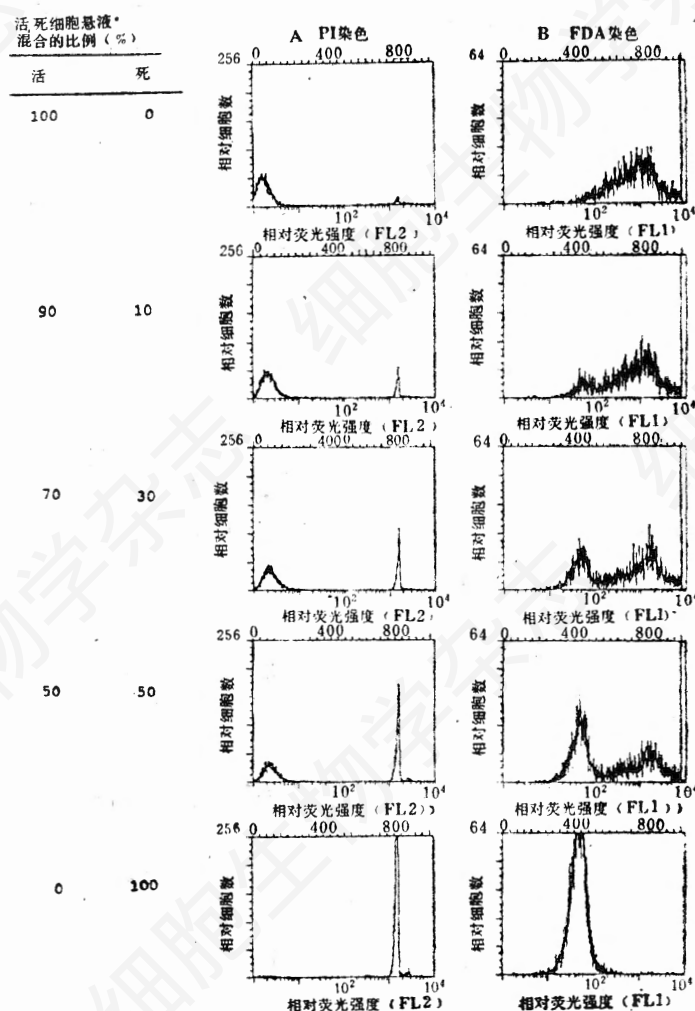


图 FACS 分析细胞存活的直方图

* 见表 1 注解

光), 这些峰的大小随着细胞样品中死、活细胞的比例而出现相应的变化。图中B是FDA染色法的结果, 右侧峰代表活细胞(显示强荧光), 左侧峰代表死细胞(不显示强荧光), 峰的大小也随着样品中细胞的存活率而发生相应的变化。表1是图的直方图统计计算的结果。结果表明两种不同染色方法所求得存活率之间无明显的差异, 同样它们与样品中死、活细胞的比例变化存在着相应的变化。因此, 可以认为用两种不同染色方法来检测细胞存活率是能正确反映样品细胞实际情况的, 同时也表明两种不同的染色方法所得结果是一致的。

表1 不同荧光染色检测细胞存活率的比较

活、死细胞悬液* 混合的比例(%)		细胞存活率(%)	
活	死	PI	FDA
100	0	92.1	92.6
90	10	79.8	82.3
70	30	65.6	66.4
50	50	45.2	47.8
0	100	1.3	1.9

* 用锥蓝除外试验表明, 活细胞悬液的细胞存活率约95%, 死细胞悬液的细胞存活率约2%。

2. 两种染色方法的稳定性

细胞样品经PI或FDA染色和FACS检测, 再置冰浴放置2小时, 然后再进行FACS分析。分析结果列于表2。经比较表1和表2的结果表明: 虽然样品在冰浴中放置2小时以上, 但它们的存活率没有发生明显的变化。因此, 可以认为检测细胞存活率的这两种不同的染色方法是十分稳定的。

3. 两种染色方法的互不干扰性

为了说明PI和FDA两种染料染细胞时与否相互影响, 将细胞样品先用PI染色, 再用FDA染色, 或者反之。实验结果列于表3。结果表明两种染料均不相互干扰对死、活细胞的染色。进而说明两种染料检测死、活细胞是特异的。

表2 不同荧光染色后2小时检测细胞存活率的比较

活、死细胞悬液* 混合的比例(%)		细胞存活率(%)	
活	死	PI	FDA
100	0	90.2	92.6
90	10	78.1	84.7
70	30	61.4	67.5
50	50	43.3	49.7
0	100	1.7	4.4

* 见表1注解。

表3 两种荧光染料染色细胞的荧光检测结果

死、活细胞悬液* 混合的比例(%)		荧光阳性的细胞百分率(%)			
		首次染色后**		再次染色后**	
活	死	FL 1***	FL 2***	FL 1***	FL 2***
100	0	97.2	—	94.7	4.9
		—	5.3	92.5	7.2
0	100	0.7	—	0.9	98.8
		—	97.5	3.4	96.2

* 见表1注解。

** 细胞样品首先用FDA染色, 再用PI染色; 或者先用PI染, 再用FDA染。

*** FL 1: 绿荧光。

FL 2: 红荧光。

小 结

从上述实验结果可以认为:

1. PI和FDA两种染色法均能正确地反映细胞存活的情况, 而且两种方法检测的结果是一致的。这样有利于根据实验设计选择使用。

2. PI和FDA两种染色方法互不干扰, 分析前不需去除细胞样品中游离的染料, 方法十分简便。

3. PI和FDA两种染色方法十分稳定, 这为实验过程提供了充裕的时间。

4. 更值得提出的是PI和FDA对细胞存

活的检测是互为正负的,也就是说 PI 使死细胞带荧光, FDA 使活细胞带荧光,而且前者是红荧光,后者绿荧光。这些特点使不同目的的实验设计有了充分的选择余地。

总之,对 FACS 的应用来说,检测细胞存活的 PI 和 FDA 两种染色法是十分有用和必要的基本方法。

摘 要

本文比较了用 PI 和 FDA 两种不同染料,

通过 FACS 来检测细胞的存活,表明两种不同染料所得结果均能正确反映细胞存活的情况,而且两者的结果是一致和稳定的。并讨论了这两种方法应用于 FACS 检测中的优点。

参 考 文 献

- [1] Slezak, S. E. and Horan, P. K. 1989. *J. Immunol. Methods.*, 117: 205—214.
- [2] Rotman, B. and Papermaster, B. W. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55: 134—141.

介绍一种显示小型寄生线虫染色体的方法 ——利用马来丝虫虫卵制备染色体

王芃芃 邓珊珊

(浙江省医学科学院寄生虫病研究所)

在利用马来丝虫生殖腺制备染色体的同时,以该雌虫子宫内虫卵为材料,对 Imai 法^[1]加以改动,用来探索制备丝虫染色体的方法,获得较满意的效果。操作步骤如下:

1. 将马来丝虫雌虫置于培养液 RPMI 1640 + 20% 小牛血清(含 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 秋水仙碱)中 37℃ 培养 4—6 小时,取出虫体置解剖镜下,用解剖针取出虫体子宫的前面部分;
2. 放入 0.6% 柠檬酸钠中低渗 30 分钟;
3. 置实验材料于一清洁的载玻片上,稍微倾斜玻片,在玻片上滴约 0.5 ml 新鲜的固定液 I (冰醋酸:甲醇:蒸馏水 = 3:3:4),使固定液缓慢地流过材料,由下端排出;
4. 置玻片于解剖镜下,用滴管加 2 滴上述固定液于材料上,并迅速撕破子宫,虫卵逸出而分散;
5. 在材料干前,加 3 滴新鲜的固定液 II (冰醋酸:甲醇 = 1:1),30 秒后将玻片倾斜除去固定液;
6. 立即加冰醋酸 3 滴,约 30 秒后除去冰醋酸,平放玻片,空气自然干燥;
7. 用 10% 姬氏液染色 15—20 分钟(pH 6.8 磷酸缓冲液),即可获得丝虫虫

卵染色体图象(见图)。

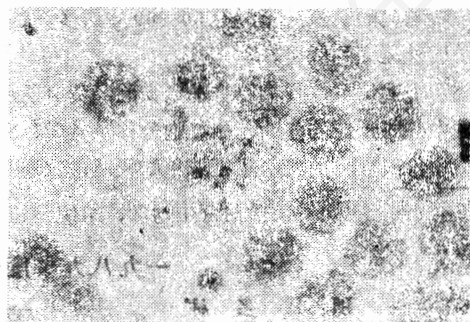


图 示马来丝虫受精卵分裂中期相染色体 (2n = 10)

该方法较常规方法^[2]简易,由于省去了离心过程,从而避免大量细胞丢失。因而,此法尤其适于制备小型虫体染色体。

参 考 文 献

- [1] Imai, H. T. et al., 1977, *Chromosoma (Berl.)*, 59: 341—393.
- [2] 黄跃进、何麟, 1988, 动物学杂志, 23(1): 32—33.