

认为可能是羊水低渗液浓度与比例不适于绒毛直接法,但改用1%枸橼酸钠液与0.075 mol/L KCl 1:1低渗液,则染色体扩散与显带均收效良好。

#### (2) 秋水仙素浓度

纺锤丝微管(microtubules)连接于中心粒与着丝粒之间。秋水仙素有抑制微管蛋白的聚集能使微管解聚<sup>[8]</sup>,所以秋水仙素浓度与染色体扩散有一定关系。

我们用不同浓度的秋水仙素(0.5微克/毫升,1微克/毫升,2微克/毫升等)测试,在染色体扩散合适,和染色体的单体又不分开方面进行比较,结果发现其最适浓度为1微克/毫升。

(3) 固定 simoni<sup>[2,7]</sup> 报告中的固定时间为10分钟。按照我们的经验,三次固定时间总共以1小时零10分钟为宜。短时间(如10分钟)固定,其形态不佳,弯曲,发毛。而固定时间较长者,很少有上述现象发生。

我们认为以上三点是不可分割的,是相互影响的。

(4) 制片时室温控制在25℃以内(夏天绒毛制片时室温到30℃染色体丢失现象严重,当室内安装空调室温在25℃以下则染色体不丢失)。

Simoni等<sup>[9]</sup>(1985)报告446例母龄≥35岁者,发现有24例核型异常,53例母龄<35岁者则未发现核型异常者,这一现象与我们

所观察相似

### 摘 要

本方法对绒毛滋养层细胞直接制备染色体作了改进。分别将制片手法,低渗液配制,秋水仙素浓度与固定时间等方面给以改良。后三者不同于Simoni及国内报道,作者认为低渗液成分,秋水仙素浓度与固定时间是不可分割与相互影响的。此法所得分裂相中,染色体形态及分散良好和显带清晰,方法稳定,有利于孕早期诊断的染色体结构分析。

### 参 考 文 献

- [1] 韩安国等, 1973, 中华医学杂志, 9: 521.
- [2] Simoni, G et al., 1984, *Hum Genet.*, 66: 252—259.
- [3] Tracy B Perry et al., 1985, *Am. J. Obstet Gynecol.*, 15: 161—166.
- [4] 崔梅影、陈保江、周宪庭等, 1985, 优生快讯 8: 3—6.
- [5] 孙念恬、王凤云等: 1985, 遗传与疾病, 2(1) 1—4.
- [6] 杨大森、马庭元等, 1984, 优生快讯 4: 1.
- [7] Simoni, G. et al., 1983, *Hum Genet.*, 63: 349—357.
- [8] Vogel, F. and Motulok, A. G. 1982, *Human Genetics*, 22—23 Springer-Verlag.
- [9] Simoni, G. et al., 1985, *Cytogenetics of chorionic villi sampling: Technical Developments and Diagnostic Applications In: First Trimester Fetal Diagnosis Edited by M. Fraccaro G. Simoni B. Brambati 99—108 Springer-Verlag.*

## 用柠檬酸胰酶消化分散细胞

熊绍银 肖成祖

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

通常用于消化分散细胞的有胰酶、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),以及两者的混合液,但它们消化分散细胞的效果并不理想。我们参考Adams用柠檬酸胰酶作消化剂获得了满意的效果,方法如下:

### 细胞

人正常二倍体肌皮细胞(SM<sub>2</sub>)、人喉癌细胞(Hep-2)、人肺癌细胞(A 549)、人宫颈癌细胞(HeLa)、鼠成纤维传代细胞(L<sub>929</sub>)、地鼠肾传代细胞(LLC-

MK<sub>2</sub>)。

### 消化剂

1. 0.25% 柠檬酸胰酶, 胰酶(1:250)2.5 克, 柠檬酸钠 2.96 克, 氯化钠 6.15 克, 加 1% 的酚红 1.5 毫升, 加蒸馏水或去离子水 1 升溶解。用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.6, 普通滤纸过滤后再用 G-6 滤器除菌、小量分装、低温保存。

为方便起见, 可配制 1% 的柠檬酸胰酶作母液, 用前再用灭菌的蒸馏水或去离子水按 1:3 稀释, 用碳酸氢钠溶液调至 pH 7.8。

2. 0.25% 胰酶, 用不含钙、镁离子的 Hanks 液溶解, G-6 滤器除菌, 分装后低温保存, 用前调 pH 7.0—7.2。

3. 0.02% EDTA-2 Na, 用不含钙、镁离子的 Hanks 液溶解, 15 磅 20 分钟高压灭菌、室温保存、用前调 pH 7.0。

### 消化分离细胞

倾掉细胞培养瓶中的营养液, 用 PBS 或 Hanks 液洗涤细胞 1—2 次, 加消化液至细胞单层, 每瓶 (30—100 cm<sup>2</sup>) 1 毫升, 使其广泛与细胞接触, 约半分钟后倒掉消化液, 培养瓶放 37℃。待单层出现麻布样网孔时, 用手摇动培养瓶使细胞脱离瓶壁, 加入适量 MEM 营养液 (每毫升含 5% 小牛血清, 谷氨酰胺 0.293 毫克、青霉素 100 单位、链霉素 100 微克、pH 7.2—7.4), 再用小口吸管吹打 3—4 次, 即可获得分散的细胞悬液。

## 结果与讨论

### 1. 三种消化剂消化不同细胞所需要的时间

用 PBS 洗涤细胞 2 次, 分别用上述三种消化剂消化之。结果表明, 柠檬酸胰酶和胰酶消化 SM<sub>2</sub>、HeLa、Hep-2、A 549 和 L 929 细胞的时间基本相同 (2—3 分钟), 但比 EDTA-2 Na 消化的速度快 1—2 倍。

### 2. 三种消化剂对细胞的分散能力

分别计数每种细胞悬液里已分散开的单个细胞数, 以及未分开的细胞团块中的细胞数, 以分散率表示消化剂分散细胞的能力。结果表明, 对 SM<sub>2</sub>、A 549、Hep-2、和 HeLa 4 株细胞, 柠檬酸胰酶的分散率高达 93—100%, EDTA-2 Na 为 81—95%, 略高于胰酶。

比较柠檬酸胰酶和胰酶-EDTA<sub>2</sub>Na 发现, 虽然两者组成相似 (均为胰酶与螯合剂组成), 但后者分散细胞的效果不及前者。而单用 EDTA-2 Na, 其消化或分散细胞的能力均较柠檬酸胰酶差。尤其用含有钙、镁离子的 Hanks 液洗涤细胞后, 前者的消化能力大大降低, 消化时间明显延长, 30 分钟尚不能将 SM<sub>2</sub> 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞消化下来, 后者却不受影响。

### 3. 消化剂对细胞活性的影响

用台盼蓝染色, 以细胞的死亡率来比较消化剂对细胞活性的影响。发现经柠檬酸胰酶和胰酶消化的细胞极少死亡, 而用 EDTA-2Na 消化的细胞其死亡率高达 5—7%。为究其原因, 用 EDTA-2 Na 消化 Hep-2 细胞, 加入培养液后不吹打或吹打细胞 4—5 次。结果是, 未吹打组未发现死亡细胞, 而吹打组细胞的死亡率高达 7.7%。然而改用柠檬酸胰酶或胰酶作消化剂并进行同样吹打, 却并未造成细胞大量死亡。由此推测, 用吸管吹打和 EDTA-2 Na 本身对细胞的共同作用是导致细胞死亡的原因。

综上所述, 用胰酶作消化剂突出的优点是消化速度快、省时间, 但细胞不易分散。用 EDTA-2 Na 消化细胞需时较长, 且对细胞有一定的损伤。而柠檬酸胰酶既有 (胰酶) 消化细胞快又有 (螯合剂) 分散细胞好的优点, 而且对细胞无毒害, 特别适合于细胞长期连续传代和需要计数细胞数目的实验研究。我们的工作实践还证明, 用柠檬酸胰酶消化胚胎组织亦十分理想。

\* 分散率 = 分散的细胞数 / (分散的细胞 + 未分散的细胞) × 100%