

# 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 微量血培养 和染色体标本制作的方法

罗丽华 陈宜峰 单祥年 曹筱梅

(中国科学院昆明动物研究所)

## 摘 要

本文介绍了大鼠微量血培养和制备染色体标本的简易方法。通过多次反复实验, 确证了这个培养方法是有效的和可采用的。在结果讨论中, 还比较分析了各种因素(包括培养时间、PHA剂量、pH值和肝素剂量)对细胞生长分裂的影响。同时初步确定了大鼠淋巴细胞分裂周期为16小时左右。

大鼠是一种常用的实验动物, 由于来源容易, 繁殖期短, 仔数多, 因此是细胞遗传学研究的一种较好的材料。迄今, 大鼠血培养方法曾有过一些报导(Nichols等, 1962; Schrek等, 1963; Dowd等, 1964; Mac Kinney等, 1964; Newton等, 1977), 从报导的方法看来, 因需要血量多, 操作程序复杂, 难以采用, 也往往得不到满意的结果。由于技术方法上的困难, 目前国内大多数研究者仍采用体内注射秋水仙素, 制作骨髓细胞染色体标本的方法; 每次取材都须杀死动物, 无法在一只动物身上获得连续的实验数据。而采用血培养方法可弥补这个缺陷。

本文系在我们原有实验动物外周血培养方法的基础上, 以不同的培养时间、不同剂量的PHA、不同的pH值和用BUdR—Giemsa显示姐妹染色单体分化染色法等几方面, 摸索了大鼠微量血培养和染色体标本制作的方法。已获得良好结果。现报导如下。

## 材 料 和 方 法

实验动物为本所饲养繁殖的大鼠, 体重约200—250克, 雌雄各2只。外周血淋巴细胞培养和染色体制片的方法, 与猕猴所采用的方法基本相同(陈宜峰等, 1976)。但有

本文于1980年1月23日收到。

本工作曾得到苏莘和钱翰翔二同志的帮助, 特此致谢。

所改进。具体步骤如下:

(1) 植物血球凝集素(*Phytohemagglutinin*, PHA)提取方法(吴旻等, 1964):

将菜豆(*Phaseolus vulgaris*)磨成细粉末状, 1克豆粉加0.85% NaCl 5毫升, 置冰箱中, 浸泡48小时, 以每分钟4000转离心30分钟, 吸取上清液, 先用定性滤纸过滤, 再以0.85% NaCl 稀释4倍, 用5号玻璃滤器过滤后, 分装小瓶, 放在冰箱中保存(0°C)。

(2) 培养基的制备:

培养瓶为链霉素瓶, 每瓶含有RPMI 1640培养液4毫升、小牛血清1毫升、PHA 0.15毫升。每毫升培养基加青、链霉素各100单位, pH为7.4左右。

(3) 采血方法:

用2毫升灭菌注射器吸取适量肝素(500U/毫升), 可多至按肝素与血为1:3的量, 从心脏取血, 而后直接把血加入盛有上述培养基的瓶中, 每瓶加全血约0.15—0.2毫升, 摇匀, 置38°C温箱中培养。

(4) 染色体标本制作法:

a. 在细胞收获前6小时加秋水仙素, 使其在培养基中的最终浓度为0.025—0.05微克/毫升, 加完后放回温箱继续培养。

b. 用预温的38°C蒸馏水低渗20分钟。

c. 用甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定二次, 每次约20—30分钟。

d. 采用空气干燥法制片。

e. 用5% Giemsa (pH 6.8)染色20—30分钟。

(5) 培养条件:

(a) 为了探讨不同培养时间与有丝分裂指数的关系, 我们选择了36小时、48小时、56小时、72小时、102小时和126小时为细胞收获的时间, 均在制片前6小时加秋水仙素。

(b) 为了了解不同剂量的PHA和有丝分裂指数的关系, 在实验中我们采用了如下的PHA剂量: 0.02毫升、0.05毫升、0.1毫升、0.15毫升、0.3毫升和0.5毫升, 细胞收获时间均为72小时。

(c) 为了了解不同pH值与有丝分裂指数的关系, 我们把大鼠血分别培养在pH值为7.0、7.4、7.7和8.0培养基中, 仍在72小时收获细胞。

(d) 为了测定大鼠淋巴细胞分裂周期, 采用BUdR—Giemsa显示姐妹染色单体染色法: 每毫升培养基加BUdR 8微克, 在38°C避光培养72小时, 终止培养前6小时加秋水仙素, 制片步骤和一般染色体制片法相同。把制好的片子放在37°C温箱存放24小时, 或在室温存放2—100天, 然后进行姐妹染色单体分化染色, 采用紫外线加Giemsa染色(UPG)方法。其步骤如下, 在玻片上加几滴 $1 \times$ SSC液(等量的0.3M氯化钠和0.03M柠檬酸钠溶液相混合), 盖一小张擦镜纸, 把玻片放在一个培养皿中的玻棒上。培养皿底部铺有湿滤纸, 内加 $1 \times$ SSC溶液, 溶液的高度以不超过玻片为准, 然后培养皿放在45—48°C电热板上, 以30瓦紫外线灯管垂直照射30分钟, 照射距离为6厘米。照射完毕, 以蒸馏水冲去擦镜纸, 用% 3 Giemsa染色(pH 6.98) 10—12分钟, 干燥, 镜检。

## (6) 观察指标

(a) 在低倍镜下 (200X) 随机统计每只大鼠1000个有核细胞 (包括有丝分裂细胞), 求出有丝分裂细胞的百分数。

(b) 判断细胞周期的依据, 主要参看田竟生等 (1978) 一文中所叙述的标准: 凡两条染色单体深染者分为第一次细胞周期; 一条染色单体深染, 另一条染色单体浅染者分为第二次细胞周期; 1/4条染色单体深染, 3/4条染色单体浅染分为第三次细胞周期。我们随机观察了一个供体的401个细胞。

## 实验结果

## (一) 大鼠微量血培养的结果:

1. 在培养实验中, 我们用0.15毫升PHA, pH=7.4和较大肝素量 (肝素和血量之比为1:3) 的培养组合并在72小时收获细胞的条件下, 曾先后对来自不同个体的11个血样品进行了重复实验。大部分样品都获得较佳的结果。从表1可以看出, 在11031个有核细胞中出现725个有丝分裂细胞, 有丝分裂指数平均为6.6%, 其波动范围为3.4%—12.3%。但从总的结果看来, 这些培养物在38°C下培养72小时, 都能出现较旺盛的有丝分裂活性和分散良好的中期染色体图象 (见图3、4、5)。

表1 大鼠微量血培养的结果 (培养条件为PHA0.15毫升, pH值7.4, 适量肝素和培养72小时)

样品数	观察细胞总数	有丝分裂细胞数	有丝分裂指数(%)	有丝分裂指数平均值(%)
1	1000	67	6.7	6.6
1	1000	89	8.9	
1	1008	80	7.9	
1	1000	70	7.0	
1	1000	41	4.1	
1	1000	62	6.2	
1	1007	43	4.3	
1	1016	125	12.3	
1	1000	51	5.1	
1	1000	34	3.4	
1	1000	63	6.3	
总数11	11031	725		

2. 通过实验表明pH值变化对血细胞有丝分裂活性是有影响的。从表2可以看出, 随着培养基的pH值增高 (7.0、7.4、7.7和8.0), 其有丝分裂指数也随之提高, 它们分别为2.1%、4.9%、5.6%和9.6%。此乃表明, 大鼠淋巴细胞在pH值偏高的条件下,

生长情况较佳。其中pH=7.4的实验条件,我们重复了11个血样品,大部分样品都获得了较满意的结果。

表2 不同pH值对大鼠淋巴细胞有丝分裂活性的影响

pH值	动物数(只)			观察细胞总数	有丝分裂细胞数	有丝分裂指数的平均值(%)
	雄性	雌性	总数			
7.0	2		2	2000	43	2.1
7.4	2	1	3	3000	148	4.9
7.7	1	1	2	2000	112	5.6
8.0	1	1	2	1700	156	9.6

3.在实验中,我们对含不同肝素量的培养物进行了比较培养(肝素量少至仅润湿注射器与0.5毫升血混合,大至按肝素和血之比为1:3的量),通过11个血样品培养所获得结果表明,虽然在含少量肝素的培养物中,也能看到少数可分析的中期染色体图象,但用含肝素量较多的血样品培养,能得到较好的结果。

#### (二) 不同培养时间的有丝分裂指数变化的结果:

表3和图1的结果表明,淋巴细胞在体外培养36小时,已出现有丝分裂,其分裂指数平均为0.7%、48小时为1.8%、56小时为4.3%、72小时为7.6%(达最高峰)、102小时下降至5.1%和126小时降至2.6%。

表3 不同培养时间出现的有丝分裂指数

培养时间(小时)	动物数(只)			观察细胞总数	有丝分裂细胞数	有丝分裂指数的平均值(%)
	雄性	雌性	总数			
36	2	2	4	2513	25	0.7
48	2	2	4	3500	66	1.8
56	2	2	4	3720	168	4.3
72	2	2	4	4008	306	7.6
102	2	2	4	4000	205	5.1
126	2	2	4	4000	102	2.6

#### (三) 不同剂量PHA对淋巴细胞有丝分裂指数的影响:

由表4和图2可见,随着PHA量递增,有丝分裂指数不是直线上升的。PHA剂量0.02毫升、0.05毫升、0.1毫升、0.15毫升、0.30毫升和0.5毫升时,有丝分裂指数平均值依次为2.9%、3.4%、5.8%、6.7%、6.9%和2.1%。其中以0.15毫升和0.3毫升的有丝分裂指数为最高。从实验中,我们观察到0.5毫升PHA的培养物,不但培养液呈现轻度混浊,细胞生长状况不良,而且染色体形态较差。这也说明了PHA剂量太大,对细胞生长是不利的。通过多次实验的结果,我们认为PHA对大鼠淋巴细胞作用有效剂量是0.15毫升左右。

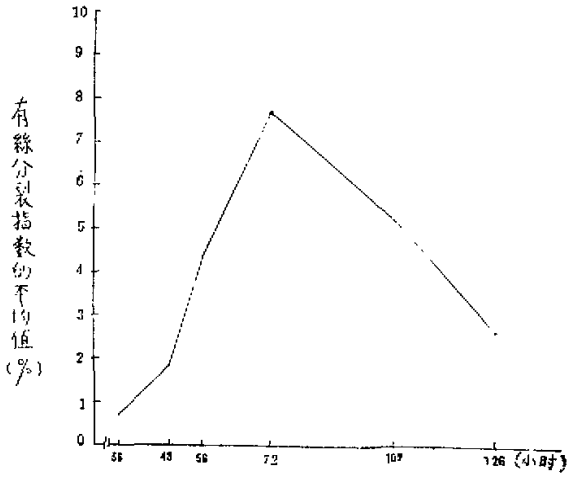


图1 培养时间与大鼠淋巴细胞有丝分裂指数的关系

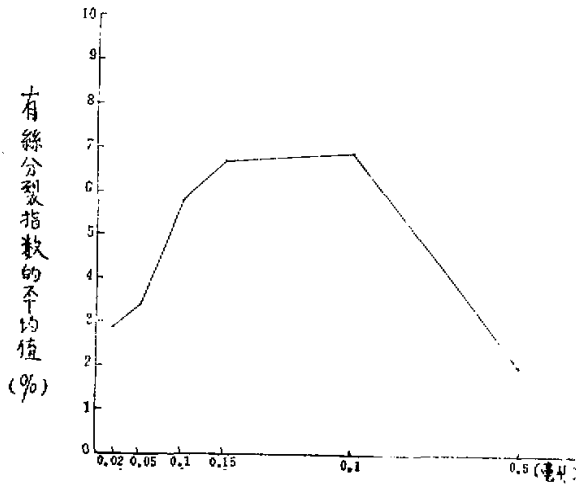


图2 PHA剂量与大鼠淋巴细胞有丝分裂指数的关系

注：图2横座标上的第二个0.1毫升应改为0.3毫升(0.3错写为0.1)。

表4 不同剂量PHA对大鼠血培养结果的影响

PHA剂量 (毫升)	动物数(只)		样品数	观察细胞总数	有丝分裂细胞数	有丝分裂平均值 (%)
	雄性	雌性				
0.02	1	2	4	4000	116	2.9
0.05	2	2	5	5016	170	3.4
0.10	2	2	4	4012	234	5.8
0.15	2	1	4	4023	271	6.7
0.30	2	1	4	3596	263	6.9
0.50	2	2	5	4200	102	2.1

## 讨 论

### 一、有关大鼠淋巴细胞体外培养的条件问题

在实验过程中,我们发现大鼠的血容易凝固,这是大鼠血培养不易成功的原因之一。Paul(1959)提到即使肝素量达到0.2毫克/1毫升,也不能防止血凝固。因此,Mac Kinney等(1964)把动物血用旋转法去纤维,然后加入PHA(20毫升血加1毫升PHA)以助红血球沉降,再将血混合物放在40°C下30—60分钟,然后以400r.p.m(30×g)离心5分钟,通过这一系列过程才得到含有丰富白细胞的血清。Nichols等(1962)采用6%葡聚糖(dextran)或6%滤过的纤维蛋白原(filtered fibrinogen)作分离因子,然后离心,才得到白细胞的混悬液。通过我们多次实验,发现不必采用这些步骤,只要在抽血时,注射器含有适量肝素,最好肝素和血量的比例为1:3,就能达到抗凝血的良好效果;按照我们上述条件,用这种血样品培养,大部分培养物都能获得较满意的结果。

体外培养血细胞,其培养基的pH值也是影响细胞生长的重要因素。从我们实验得出初步结果来看,pH=7.0对大鼠淋巴细胞生长是不利的。pH值偏高些较好,在pH值为7.4、7.7、8.0时,其有丝分裂指数都比较高;所以,我们认为培养基的pH值在7.4以上较为适宜。

Nowell(1960)已证明PHA是一种白细胞有丝分裂的刺激剂。但不同动物对由不同种菜豆提取的PHA反应是不同的。Triman等(1975)在小鼠血细胞体外培养实验中,发现即使能有效促使这种动物白细胞进行有丝分裂的PHA,但剂量不同时其结果也是不相同的。我们在实验中,同样发现PHA剂量太小和太大都不能获得较高的有丝分裂指数;特别PHA剂量太大,反而会使细胞中毒,影响细胞生长分裂。实验结果表明,我们实验室提取的PHA浓度,其有效剂量在0.1—0.15毫升的范围。

### 二、关于大鼠淋巴细胞体外培养的细胞周期

通过实验,我们发现大鼠淋巴细胞培养36小时已出现有丝分裂,其有丝分裂指数随着时间延长而递增,直至72小时达最高峰,以后开始下降。对同一供体大鼠淋巴细胞,用显示姐妹染色单体分化染色法,观察了培养72小时的410个细胞,结果表明,处于第三

次细胞周期的细胞占80.2%、第二次分裂占12.4%、第一次分裂仅占7.3% (图6)。因此, 我们认为大鼠淋巴细胞分裂周期约为16小时左右 (Crossen等, 1977)

#### 参 考 文 献

陈宜峰、罗丽华、宋继志、单祥年 1976 猕猴 (*Macaca mulatta*) 染色体的 Giemsa带型分析。遗传学报 3(4), 309—312。

田竞生、徐新来、陈采琴、樊容、李玉环 1978 BUdR—Giemsa显示姐妹染色单体分化染色法对人类淋巴细胞周期的初步分析。生物化学与生物物理进展 3, 18—20。

吴旻、凌丽华 1964 利用周围血细胞短期培养进行人类染色体研究的方法。天津医药杂志 输血及血浆学附刊 2(1), 53—59。

Crossen, P. E. and W. F. Morgan 1977 Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 104(2), 453—457。

Dowd, G. K. Dunn, and W. C. Moloney 1964 Chromosome studies in normal and leukemic rats. *Blood* 23(5), 564—571。

Mac Kinney, A. A. JR. and W. L. Kopp 1964 Tissue culture of rat leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117(2), 463—465。

Nowell, P. C. 1960 Phytohemagglutinin, An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20(4), 462—466。

Nichols, W. W. and A. Levan: 1962 Chromosome preparations by the blood tissue culture technic in various laboratory animals. *Blood* 20(1):106。

Newton, M. F., B. Bahner and L. J. Lilly 1977 Chromosomal aberrations in rat lymphocytes treated in vivo with 1-Phenyl-3, 3-Dime-thyltriazenes and N-Nitrosomorpholine. A further report on a possible method for carcinogenicity screening. *Mutation Res.* 56(1), 39—46。

Paul, J. 1959 Cell and tissue culture. 48. E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London。

Schrek, R. and Y. Rabinowitz 1963 Effects of phytohemagglutinin on rat and normal and leukemic human blood cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113(1), 191—194。

Triman, K. L., M. T. Davisson and T. H. Roderick 1975 A method for preparing chromosomes from peripheral blood in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 15(3), 166—176。

## A MICROCULTURE METHOD FOR RAT WHOLE BLOOD

LUO LI-HUA CHEN YI-FENG SHAN XIANG-NIAN CAO XIAO-MEI

*(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)*

### Abstract

This study has introduced a simple microtechnique for obtaining metaphase chromosomes from cardio-blood of living rat. Through repeated experiments, we have confirmed that this culture method is effective and can be used. In the paragraphs of "results" and "discussion", we compared the effect of various factors, including different cultural time, PHA doses, pH values and heparin doses, on cell division and growth. Meanwhile, we have preliminarily determined the division cycle of rat lymphocytes, which is about 16 hours.

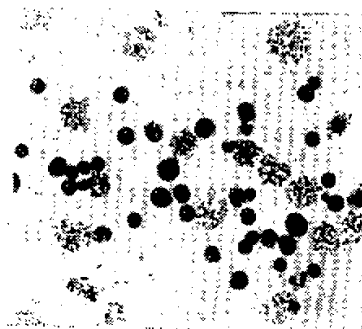


图3 大鼠微量血培养72小时出现的有丝分裂图象(200x)



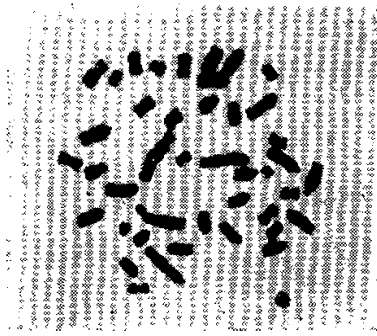


图4 大鼠中期染色体(♂) (900x)

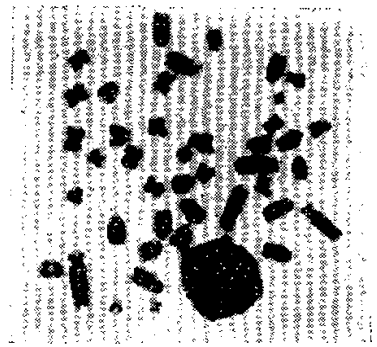


图5 大鼠中期染色体(♀) (900x)

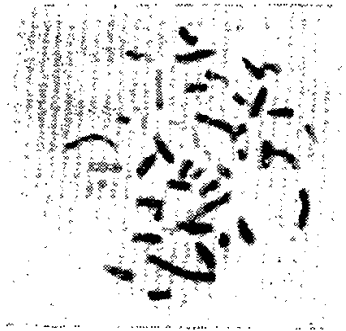


图6 大鼠淋巴细胞的第三次细胞周期(900x)