

细胞数的荧光测定与校正

丰美福 崔 婕 黄汉华 沈 杰 彭建霞

(中国科学院动物研究所,北京 100080)

摘要 动物细胞 DNA 能特异地与一种荧光染料 H33258 相结合,结合后 H33258 的发射波长从 490nm 转移到 458nm, 荧光强度显著增强。在一定范围内, DNA 含量与荧光强度呈线性关系, 细胞数与 DNA 量成正比。由此建立了一个简单、快速、灵敏和重复性较好的细胞计数法。通过标准曲线由荧光强度可精确地求出样品的细胞数,或直接通过荧光值对实验数据作一校正。

细胞计数是细胞生物学实验中一项最基本的工作。然而, 要想做到细胞的精确计数却非十分容易。由于细胞分布的不均匀性, 取样操作的误差, 以及一些人为的主观因素等, 使计数结果的误差较大。故为以数量为基础进行的各种细胞生物学反应的测试与比较带来可信性和重复性的问题。另外, 在一些特殊情况下进行测定时, 如: 要测定一个伴随有对细胞生长的抑制或促进作用较长周期的细胞生物学反应时, 就必须对细胞数进行校正, 这样才有可能获

得真实的数据。

常用的计数法有血细胞计数板法, 细胞计数仪法等。计数板法最经济简易, 但耗时、烦琐且误差较大, 特别是当需要同时计数多个或大量细胞样品时, 如: 在测定 T 细胞的抗原特异性和 MHC (主要组织相容性复合物) 限制性时要计数多种靶细胞, 在药物试验中需测庞大受试样品时等更是如此。细胞计数仪虽简单快速, 但亦有一定的缺点与不足^[1], 且成本太高, 有一定局限性。

本文将介绍一种简单、快速、灵敏和重复性较好的细胞计数法。其原理是基于细胞 DNA 能特异地与荧光染料 H33258 相结合^[5-6], 结合后 H33258 的发射波长从 492nm 转移到 458nm, 荧光强度显著增强。在一定范围内, DNA 含量与荧光强度呈线性关系, 细胞数与 DNA 量成正比^[7]。通过标准曲线由荧光强度可求出样品的细胞数, 或直接通过荧光值对实验结果作一校正。在有普通荧光光度计或酶标荧光计的实验室, 可采用此法进行细胞的精确计数与校正。

一、材料与方 法

(一) 试剂和细胞

1. PBS: 0.01 mol/L 磷酸盐 (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), 0.15 mol/L NaCl, pH7.2—7.4
2. 低渗液: 无离子水
3. 高盐缓冲液: 0.05 mol/L PBS, 2 mol/L NaCl, pH 7.4
4. Hoechst 33258 (2-(2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl)-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol] · 3HCL. Fluka) 200ug/ml, 无离子水配制, 4°C 避光保存, 至少可达 6 个月。
5. DNA 样品: 小牛胸腺 DNA (Sino American Biotec) 500 ug/ml。用高盐缓冲液配制, 4°C 保存。
6. NBT-PMA 液 用无酚红的 HBSS 在临用前新鲜配制 1mg/ml 的 NBT (硝基蓝偶氮四唑, Fluka)。在使用前加入终浓度为 1μg/ml 的 PMA (佛波醇 Sigma); 混匀备用。
7. 细胞: U937 (人骨髓样白血病细胞株), 培养在 RPMI 1640, 10% FCS (Gibco), 2 m mol/L glutamine, 50 ug/ml gentamycin, 37°C, 5% CO₂ 中。

(二) 方 法

1. DNA 浓度曲线 用高盐缓冲液按下列浓度配制一系列 DNA 样品。

- A 组: 0.05 0.1 0.2 0.4 0.8 μg/ml
 B 组: 1.6 3.2 6.4 12.8 μg/ml
 DNA 在 1—15 μg/ml 范围内, 加 1 μg/ml

H33258 (即加 15 μl 200 μg/ml H33258)。DNA 小于 1 μg/ml, 加 0.1 μg/ml H 33258 (即加 15 μl 20 μg/ml H33258)。混匀后荧光测定, 测量体积为 3ml。

2. 细胞计数 待测细胞用 PBS 洗 2 次后吸干, 加入 1.5ml 无离子水, 振荡 30—60 秒后 (镜检无完整细胞), 加入 1.5ml 二倍浓度的高盐缓冲液, 摇匀, 加入 0.1 μg/ml (10^4 — 10^5 /ml 细胞) 或 1 μg/ml (10^5 — 10^6 /ml 细胞) 的 H33258, 再摇匀, 10 分钟后, 荧光测定。

3. 荧光测定条件 荧光分光光度计 Shimadzu RF-510 LC. λ_{ex} 356nm, λ_{em} 458nm。狭缝 10nm, 光电倍增管增益 “2x”。高压每次用标准荧光源校正荧光强度在 “30” 的位置。

4. 细胞数与实验数据的校正

(1) 巨噬细胞激活因子 (MAF) 的活性测定

原理: 细胞受 MAF 激活后, 呼吸爆发释放 H₂O₂, 它使 NBT 还原生成蓝色沉淀, 经溶解后可测 O.D 值。激活作用愈强, 产生 H₂O₂ 愈多, O.D 吸收值愈高。

方法: 待测细胞 (本实验中为 U937) 一式二份, 一份实验组与对照组细胞培养于 RPMI—1640, 10% FCS 中, 两组各含 2×10^5 个细胞。实验组中加入 10% MAF 的上清液。反应总体积 3ml。37°C, 5% CO₂ 中培养 48 小时后, 经 NBT—PMA 等处理, 最后于 620 μm 测 O. D 吸收。

另一份实验与对照组同上经 MAF 作用 48 小时, 但之后用 PBS 洗 2 次吸干, 按方法 2 处理, 即加 H33258 作细胞数的荧光测定与校正。

(2) 数据的校正 原理: 荧光强度 (F) 与细胞数 (C) 成正比

$$\frac{C_{0\text{对照}}}{C_{\text{实验}}} = \frac{F_{0\text{对照}}}{F_{\text{实验}}}$$

对照组: $O.D_{\text{校正}} = O.D_{\text{实验}}$

$$\begin{aligned} \text{实验组: } O.D_{\text{校正}} &= O.D_{\text{实验}} \times \frac{C_{0\text{对照}}}{C_{\text{实验}}} \\ &= O.D_{\text{实验}} \times \frac{F_{0\text{对照}}}{F_{\text{实验}}} \end{aligned}$$

为了计算更加方便, 将对照与实验的

$O.D_{\text{实验}}$ 同时分别 $\times \frac{1}{F_0} \times 10^3$ 。即:

$$\text{对照组 } O.D_{\text{校正}} = O.D_{\text{实验}} \times \frac{1}{F_0} \times 10^3$$

$$= \frac{O.D_{\text{实验}}}{F_0} \times 10^3$$

$$\text{实验组 } O.D_{\text{校正}} = O.D_{\text{实验}} \times \frac{F_0}{F_t} \times \frac{1}{F_0} \times 10^3$$

$$= \frac{O.D_{\text{实验}}}{F_t} \times 10^3$$

二、结果与讨论

采用 H33258 与 DNA 特异性结合的方法进行细胞的计数与校正, 结果如下:

(一) 不同浓度的 DNA 及其荧光强度的数据(见表 1 和图 1)

由表 1 和图 1 的结果可见, 随着 DNA 浓

表 1 小牛胸腺 DNA 的浓度与荧光强度

DNA $\mu\text{g/ml}$	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8
荧光强度 F	0.13 ± 0.06	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.36	2.1 ± 0.3	4.43 ± 0.57	13.9 ± 0.1	29.1 ± 0.29	58.1 ± 1.2	115.8 ± 0.81

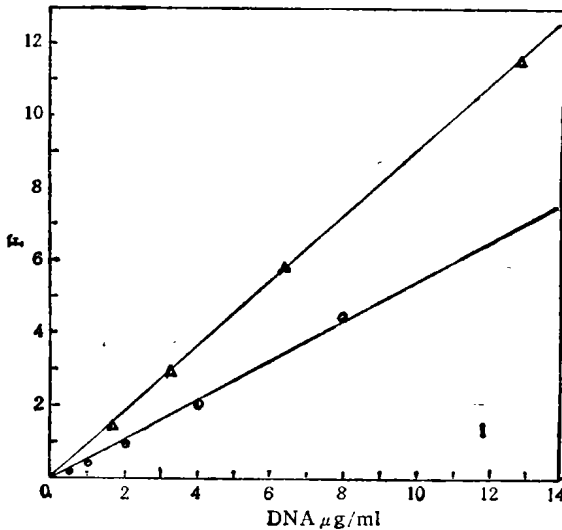


图 1 小牛胸腺 DNA 的浓度与荧光强度; ○: 当 DNA 的浓度 $\times 0.1$ 时的荧光强度 F; △: 表示当图中 F 值 $\times 10$ 时的荧光强度 F_0 。

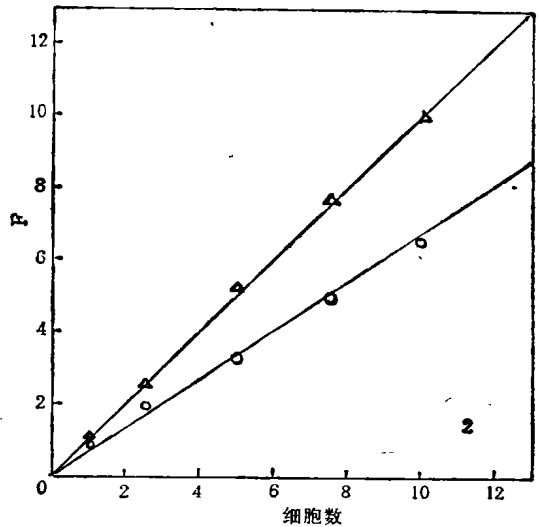


图 2 U937 的细胞数与荧光强度, ○: 当细胞数为 $0 \times 10^4/\text{ml}$ 时的荧光强度 (F); △: 当细胞数为 $\Delta \times 10^4/\text{ml}$ 时的荧光强度 ($F \times 10$)。

度的增加, 荧光强度有一线性增强, 表明 H33258 的荧光测定法能很好地反映 DNA 含量的变化。

表 2 U937 的细胞数与荧光强度 (F)

细胞数 (ml)	F	细胞数 (ml)	F
10^4	0.9 ± 0.07	10^5	10.3 ± 1.8
2.5×10^4	2.0 ± 0.56	2.5×10^5	25.3 ± 3.8
5.0×10^4	3.3 ± 0.27	5.0×10^5	52.2 ± 2.5
7.5×10^4	5.0 ± 1.1	7.5×10^5	76.6 ± 2.8
10^5	6.5 ± 1.0	10^6	100.2 ± 4.7

(二) 细胞数与荧光强度的数据(见表 2 和图 2)

由表 2 和图 2 可见, 在 10^4 ~ $10^6/\text{ml}$ 范围内, 细胞数与荧光强度的线性关系很好。说明在一个非同步化的较大的细胞群体中, 细胞数与其总 DNA 量成正比, 由荧光强度可以正确地反映细胞数的多少。因此, 通过事先对某一细胞反复地精确计数, 绘制出标准曲线后, 就可方便地在以后的实验中, 用荧光法对这种细胞进行比较精确的计数与校正。

(三) 细胞数与实验数据的校正结果(见表 3)

表 3 MAF 对 U937 细胞的激活作用

u937	对照	实验
(NBT 还原) O.D _{实验}	0.213±0.036	0.201±0.019
(H33258) F	66.8	46.9
$\left(\frac{O.D_{实验}}{F} \times 10^3\right)$ O.D _{校正}	3.19	4.29

由表 3 可见,对照的荧光强度大于实验组,说明在 MAF 作用于 U937 细胞的同时,伴随有对细胞生长的抑制作用,因而实验组的细胞数少于对照数,使荧光强度值下降。这样在细胞数不相等的情况下评价 MAF 的活性,就不能客观地反映实际情况。从表 3 可见,实验组的 O. D 值与对照无显著差异,似乎 MAF 对 U937 细胞并无激活作用,或 MAF 无活性。但当对细胞数作一校正后,实验结果就不同了。

实验中选用小牛胸腺 DNA 作标准样品,是因为考虑到它和哺乳类 DNA 有类似的碱基组成。在实际测量中,各种样品均可有各自的标准曲线,或分别以各自的对照来校正。

本法的计数范围较广,约从 10^1-10^6 /ml 个细胞数,正处于通常使用和计数细胞的范围。当细胞数在 10^1 以下时,荧光强度与细胞数的线性关系不太好,可能此时细胞的 DNA 总量较微,不易测准。但有文章报道,可测至 $2-3 \times 10^3$ 个细胞^[7]。

由于 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 H 33258 能产生相当于 $0.6 \mu\text{g/ml}$ DNA 量的试剂对照值。因而在 DNA 总量 $<1 \mu\text{g/ml}$ 时,即约 10^4-5 /ml 个细胞时,宜加 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的 H33258 (依哺乳类二倍体细胞的 DNA 量约为 6pg 来估算)^[3]。但此时每单位 DNA 的荧光值会略低于加入 $1 \mu\text{g/ml}$ H33258 时的数值。

当细胞处于周期的不同阶段,其 DNA 量会发生变化。就单个细胞而言, G_1 期含量为 2C, S 期介于 2C—4C 之间, G_2 期为 4C, M 期由 4C 回复到 2C^[2]。那么,这是否会对实验

结果带来影响呢? 我们经反复多次的实验证明荧光强度确与细胞数成很好的线性关系。并且,从理论上讲,在一个非同步化的混合的细胞群体中,真正进入周期,并且 DNA 含量为 4C 的细胞数并不多,因此可以认为群体的 DNA 总量与其细胞数在统计学上是成正比的。当然,如果是一个同步化的群体,周期因素应该考虑。

H33258 能通过细胞质膜与核膜和 DNA 相结合。用低渗法破碎细胞的目的在于加速这一过程,缩短测定时间。当细胞不经低渗处理,加入 H33258 后 2.5 小时,亦可取得同样的结果。如能将细胞简单的超声,再加 H33258,则荧光强度迅速达到最大值。经低渗处理加入 H33258 后可立即进行测定,但若在室温下温育约 1 小时左右,荧光值会略有升高。但在其后的至少 16 小时内荧光值是稳定的(注意避光保存),因此这一方法也较方便,可选择方便的时间来测定。

本法对于生物材料如: 组织匀浆中 DNA 含量的定量测定特别有用,并且 RNA 和蛋白质的存在对测定几乎没有影响^[7]对于有酶标荧光计的实验室,可在 96 孔培养板中进行测定。本法除有一定的优点外,如同细胞计数仪一样,尚有不能区分死活细胞的缺点。但仍不失为一个好的计数方法,特别对相对测量和实验数据的校正很有用。

参 考 文 献

- [1] 李树民等 1988 一种改良的细胞计数方法 动物学杂志 (3): 36—37.
- [2] 汪德耀 1983 普通细胞生物学 320—322
- [3] 薛绍白等 1985 细胞繁殖的生物学 58—64
- [4] 鄂征等 1986 组织培养技术 16—24.
- [5] Carrano A. V. et al., 1979 Measurement and purification of human chromosome by fluorocytometry and sorting. Proc Nat. Acad. Sci. USA 76: 1382—1384.
- [6] Lai: S. A. 1973 Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 3395—3399.
- [7] Labarca c. et al. 1980 A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Analytical Biochemistry. 102: 344—352.