

在对照胶上是均一的,但在亲和胶上却被分成若干不同的带,表明这一凝集素,可能存在着对糖亲和力不同的若干同工凝集素。(4)用亲和电泳测得的解离常数与用其它方法测得的值一致。(5)可用来研究很弱的相互作用(解离常数达 10^{-1} 到 $1M$),用这一方法测得的解离常数一般在 10^{-1} 到 $10^{-6}M$ 之间。(6)方法简便,普通实验室里的圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳的设备,无需改良就可使用。

自 60 年代中期以来,亲和层析在生化分离技术方面已赢得了重要地位,而亲和电泳还刚刚出现,有待发展、完善。虽然迄今亲和电泳方面的实验大都以凝集素和糖蛋白为对象,但这一方法的原理普遍适用于研究各种生物分子间的相互作用。我们相信这一方法经适当改进后,可用于微量地,定量地研究核酸的相互作用、激素-受体、蛋白质-蛋白质、酶-底物等的相互作用。

本文承沈昭文教授热情指教与修改,谨表谢忱。

参 考 文 献

[1] Entlicher, G. et al.: *Experientia*, 25, 17, 1969.

- [2] Takeo, K. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 1, 1972.
- [3] Bøg-Hansen, T. C. et al.: *Analytical Biochemistry*, 81, 78, 1977.
- [4] Axelsen, N. H. et al.: *A Manual of Quantitative Immuno-Electrophoresis, Methods and Applications*, Universitetsforlaget, Oslo Scand. *J. Immunol.*, 2, Suppl. 1, 1973.
- [5] Bøg-Hansen, T. C.: *Analytical Biochemistry*, 56, 480, 1973.
- [6] Golovtchenko-Matsumoto, A. M. et al.: *J. Biochem.*, 87, 847, 1980.
- [7] Staněk, J.: *The Monosaccharides*, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 257, 1963.
- [8] Hořejší, V. et al.: *Methods Enzymol.*, 34, 178, 1974.
- [9] Hořejší, V. et al.: *Methods Enzymol.*, 34, 361, 1974.
- [10] Hořejší, V. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 499, 290, 1977.
- [11] Hořejší, V. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 499, 301, 1977.
- [12] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404, 1964.
- [13] Steward, F. C. et al.: *Am. J. Bot.*, 52, 155, 1965.
- [14] Reisfeld, R. A. et al.: *Nature*, 195, 281, 1962.

[本文于1982年2月25日收到]

微核试验及其在测定化学致癌剂中的应用

郭 长 兴 王 宏 秀

(北 京 药 品 检 验 所)

微核试验是染色体损伤短期突变性试验方法之一^[1],于七十年代初由 Matter 和 Schmide 建立。他们用哺乳动物骨髓细胞的多染性红细胞与致癌性化学物质相作用,发现微核出现率与染色体畸变有很好的相关性。通过近几年的应用,此方法已趋完善,并为国际环境致突变物和致癌物防护委员会所肯定。

微核试验的原理:正常的红细胞分裂到多染性红细胞时,其核应该消失;如果与诱变性化学物质或某些生物因子相作用,就会在细胞

DNA 复制合成前期(G_1 期或S期),合成期与合成后期(S期与 G_2 期)损伤染色单体,有时也会作用于有丝分裂的过程,损伤纺锤体的机能,导致染色体全部不分裂或无着丝点的碎片及多着丝点桥联。在细胞分裂末期,由染色体断裂遗留下来的断片演变而形成微核。

在正常情况下哺乳动物骨髓红细胞比较集中,其无核的细胞主要是成熟红细胞和多染性红细胞,并且多染性红细胞占多数。当有毒物质作用于骨髓细胞时,可造成一定比例的含有

微核的多染性红细胞。微核试验时多染性红细胞和成熟红细胞染色及形态不相同,因此可以予以区分。

近几年来,用化学致癌剂进行微核试验取代了观察骨髓细胞分裂中期染色体断裂的方法,这种方法往往由于中期染色体细胞数量不足,造成观察困难,而微核试验可以提供大量的多染性红细胞,便于观察。目前微核试验已广泛应用于电离辐射、食品添加剂、药物安全评价及医源性致癌等药理毒理的研究工作中,也可作为筛选化学致癌物的一种快速、经济的测定方法。

试验方法

1. 试验动物与给药方法 微核试验用小鼠股骨骨髓是比较理想的,有时也可用大动物小骨骨髓,或远系繁殖的青春期小鼠(年龄在7—12周,雌雄皆可)。由于细胞增殖周期是30小时,因此最好在第一次给药后24小时第二次给药,第二次给药后6小时取材。给药方式是采取口服灌胃、腹腔注射,或静脉注射,应取决于药物的性质。对于作用缓慢的药物可用分裂中期的细胞观察方法进行染色体的核型分析。

2. 实验步骤

(1) 股骨骨髓直接涂片法 小鼠脱颈处死,即刻固定在解剖板上,来苏儿消毒后切开腹腔取出股骨二根;用纱布擦净,剪去两端1/4的股骨,用大头针挑出骨髓,放在已滴有灭活过的小牛血清或人类AB型血清的载物片上;再用另一块边缘整齐的载物片将骨髓与血清调匀,以45°角推片;在空气中晾干,放入甲醇中固定5—10分钟;甲醇挥发后用1:6的Giemsa-磷酸缓冲液(pH6.8)染色10—30分钟;用缓冲液(pH6.8)冲洗,晾干或37℃烤干;再放入二甲苯中5—10分钟;取出,封片后进行镜检。

(2) 间接涂片法:骨髓的取出与直接涂片法相同,只是将骨髓注入含有1ml血清的离心管里,用毛细管轻轻吸取骨髓团使细胞分散,然后以1000—1500转/分离心5分钟,弃去上清液,取一滴沉淀细胞滴在载物片一端,以45°角

推片,其余操作同直接涂片法。

3. 微核的观察与鉴别 微核状态的序列见图1。无论是被染色体损伤剂或纺锤体毒所诱发,微核的形态总是相似的(图2):圆形暗色,一般为单个存在,边缘整齐光滑,大小约占细胞的1/20—1/5;亦有少数呈椭圆形、环形,多数情况下含有一个,少数含有二个或二个以上。用Giemsa染色后成熟红细胞呈粉红或桔红色,而多染性红细胞呈紫红色或紫蓝色。观察时可计算1000个多染性红细胞中出现的微核数,以千分比表示,正常的不超过千分之五。如果一个细胞中含有二个或二个以上微核,仍按一个计数。因为药物作用的不同或因观察上的困难,也可以计算成熟红细胞或成熟红细胞和多染性红细胞二者的微核出现的千分比。在观察时应注意嗜碱性颗粒、嗜碱性白细胞以及染色质遗留在细胞中的颗粒所造成的假象。

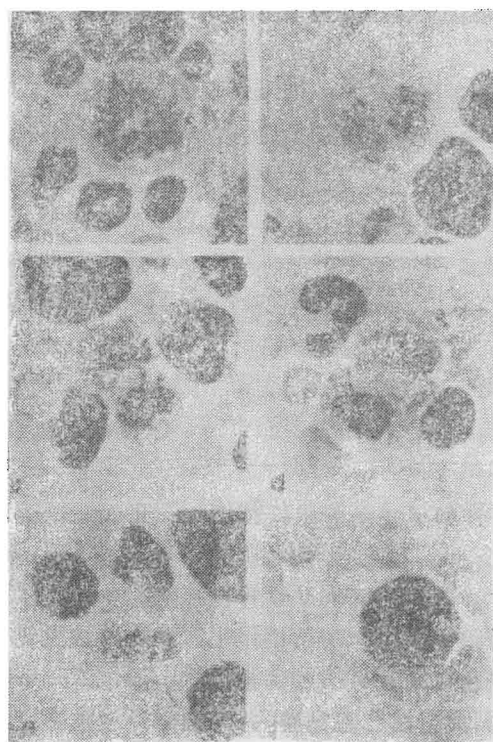


图1 微核状态的序列

小鼠股骨骨髓,用烷化剂处理,(a)纺锤体在细胞分裂中期的无着丝点碎片(b)迟延部分细胞分裂的后期(c)分裂后期桥联(d)核在末期的重组(e)红细胞的核脱离(f)微核在多染性红细胞中。

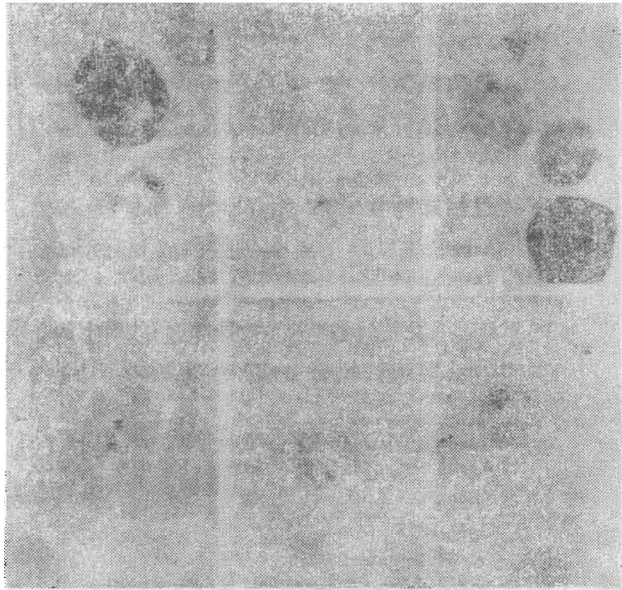


图 2 微核的特征

4. 实验数据分析:

表 1 列举了烷化剂、抗生素、纺锤体毒和抗

表 1 几种类型的化合物在微核试验中的效果

化合物	类型	注
烷化剂		
2,3,5-三(乙亚氨基)-对-苯醌	烷化剂	微核试验有很好的重现性 需要代谢激活的突变剂
环磷酰胺		
三-乙三聚氰酰胺 (TEM)		
甲(烷)磺酸甲酯 (MMS)		
甲(烷)磺酸乙酯 (EMS)		
三乙(烯)硫代磷酰胺 (This-TEPA)		微核试验重现性好 直接突变剂
细胞静止剂		
丝裂霉素 C	细胞静止剂	碎裂剂、骨髓抑制 剂
亚德里亚霉素		
博莱霉素		
纺锤体素		碎裂剂 DNA 修复 酶抑制剂
秋水仙胺	纺锤体素	
秋水仙碱		
长春新碱		
抗代谢物		
6-巯基嘌呤	抗代谢物	抑制 DNA 复制
氨甲蝶呤		
5-氟尿嘧啶		
1-β-D 阿拉伯呋喃胞嘧啶		
其 他		
咖啡因	其他	
甲基硝基亚硝基胍(MNNG)		

代谢物等化合物在微核试验中的效应。图 3 是烷化剂的某些剂量特性曲线。其中,三乙烯硫代磷酰胺是一个直接突变剂,它能导致染色体畸变。环磷酰胺在诱发突变作用时需要代谢激活。在体内外试验中丝裂霉素和博莱霉素是有效的碎裂剂。丝裂霉素和亚德里亚霉素在微核试验中结果都是阳性,但是,如果剂量高达 40mg/kg 时,反而不显阳性。

比较典型的纺锤体毒长春新碱,显示了一个典型的特性曲线(见图 4),它反映了细胞中期的作用。

抗代谢物一类化合物的作用,主要是抑制 DNA 的复制,所以在微核试验中多

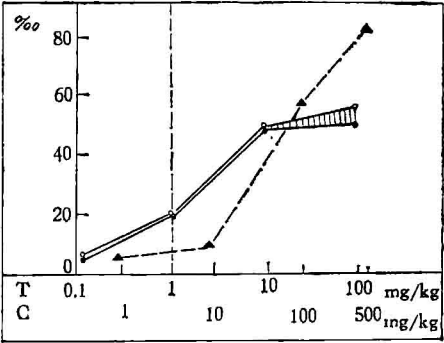


图 3 三乙烯硫代磷酰胺(T)和环磷酰胺(C)的剂量特性曲线

●: 有微核的多染性红细胞 ○: 有核红细胞人的治疗剂量

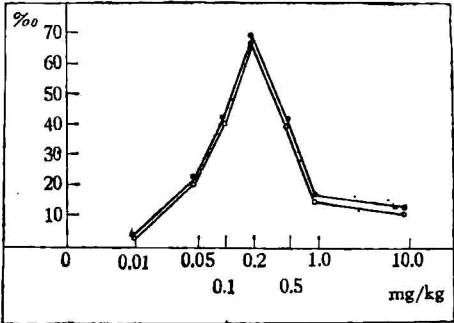


图 4 长春新碱剂量特性曲线

较低剂量时,使不成对的纺锤体部分单个染色体丧失。高浓度时纺锤体器官完全阻断,细胞核成四倍体,并且推迟了核的排出。

●: 有核成熟红细胞总数
○: 有核多染性红细胞。

染性红细胞明显减少。如果这一减少是不平行的,那是因为核的红细胞明显增加。图 5 表明了氨甲蝶呤的剂量特性曲线;在 24 小时时作用是最激烈的。

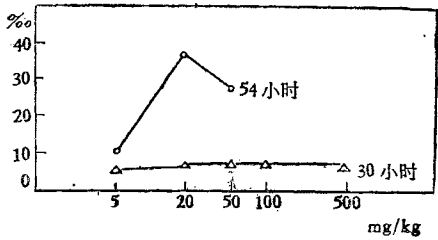


图 5 氨甲蝶呤的剂量特性曲线

△—△: 常规给药法,每 6 小时给药一次。

○—○: 第一次给药 24 小时后再给第二次药。

应着重指出:在微核试验中,某些化合物如果不能作用于细胞或者没有足够的浓度到达股骨髓的靶细胞,就不能诱发微核产生。这类化合物如特别的点突变剂和早期的抗生素以及甲基硝基亚硝基胍等。

效果与评价

微核试验作为一个染色体损伤的短期突变性方法,是评定药物毒性以及医源性致癌方法之一^[3]。其实验结果可与 Ames 法相互印证,两者具有相同特性的数据约 80%,预计值 90%。

Ames 法反映了点突变的体外试验系统,而微核试验法则反映了染色体损伤细胞突变的体内系统。在进行致癌剂和突变剂的测定时,将它们的结果进行综合分析,可提高其可靠性。

参考文献

- [1] ICPEM publication No.2; Mutation Res., 64, 155, 1979.
 - [2] A. Hollaender, *Chemical Mutagens principles and methods for their detection*. Vol. 4, 31.
 - [3] D. Janssen et al.; Mutation Res., 75 191, 1980.
- [本文于 1981 年 9 月 10 日收到]

用荧光偏振法比较两种不同抗体的亲和力

李 刚 杜国光 聂松青

(北 京 医 学 院)

影响抗体亲和力的因素很多。不同的抗原、不同的免疫时间等均可影响所产生抗体亲和力的大小。抗原性强弱的不同与其在体内诱发生成抗体的亲和力的大小有无一定的关系,一向为免疫学家所关注。用荧光偏振法测定抗体的亲和力,具有微量、准确等优点。本文以对兔抗原性较强的鸡蛋清蛋白的抗体和抗原性甚弱的狗血红蛋白的抗体为对象,用荧光偏振法分别测定它们的亲和力,并进行比较研究。

一、材料与方 法

1. 抗原的制备

重结晶鸡蛋清蛋白(下简称 EA)的制备采用吴宪、周启源氏法^[1]。

重结晶狗血红蛋白(下简称 Hb)的制备采用 Kabat 氏法^[2]。

2. 抗 EA-IgG 及抗 Hb-IgG 的制备

取约 2.5 公斤青蓝色雄性家兔 6 只,编号。分别静脉注入 EA (2 只)和 Hb (4 只)各 30 毫克。一周后用间接血凝法检测抗体滴度。每 3—5 天测一次(见图 1)。分别在第 16 天和第 36 天,每兔再加注同一抗原 30 毫克强化之。于第 40 天取血,分离抗血清。(有 2 只注 Hb 的兔因未能检测出抗体,故未取血)。

将相应家兔的抗血清分别盐析,透析去盐经 DEAE-纤维素柱层析,收集 $OD_{280} > 0.3$ 的洗脱液,浓缩冷冻干燥后放冰箱保存备用^[3]。此即为抗 EA-IgG 及抗 Hb-IgG。用时以 pH7.2