

CHO 同步细胞中 cAMP 含量的测定

吴同乐

张鸿卿

(中国科学院生物物理研究所) (北京师范大学生物系)

材 料 和 方 法

本实验系采用 CHO 细胞株, 将其置于含有 10% 小牛血清, 30% 的 0.5% 水解乳蛋白和 60% 的 Eagle 培养液中, 在 37℃ 下培养 30 小时后, 即可收集 M 期同步细胞。收集方法详见文献[2]。

将收集的 M 期细胞经过计数后分别放置在含有新鲜培养液的培养瓶中并依次编号, 除第一瓶(即 M 期)外, 其余几瓶仍置于 37℃ 温箱中继续培养, 按放射自显影术所测出的 CHO 细胞的周期时长(图 1) 并参照应用液体闪烁技术对 CHO 细胞周期各时相的测定结果^[3], 分别在培养后的 2、10、16 小时取出, 此时即应为 G₁、S、G₂ 期细胞。终止培养后即 0.25% 胰

细胞, 然后将冲洗下的细胞连同培养液一块倒进离心管中并计算细胞数。

往每毫升细胞培养液中加入 0.1 毫升的 1.5% EDTA 后, 轻轻摇匀, 置冰浴中 20 分钟后取出, 在 3000 转/分下离心 10 分钟, 倾出上液, 沉淀加 1.2 毫升的 20% TCA, 70℃ 下反应 10 分钟, 待凉后在 3000 转/分下离心 10 分钟去除蛋白, 上液加入 5 倍体积的水饱和乙醚再洗三次以除去 TCA, 然后置青霉素小瓶中, 在真空下抽干, 置冰箱中保存备用。在临分析前加 100 微升 Tris-EDTA 缓冲液 (pH7.5) 溶解, 摇匀。

cAMP 含量测定步骤 取微型离心管若干支, 并在每管中依次加入标准 cAMP (或样品) 40 微升(每瓶为 320 微微克分子, 临用前, 用缓冲液依次将其稀释成 16、8、4、2、1、0.5、0.25 微微克分子/40 微升), ³H-cAMP 30 微升(约 0.01 微居里/30 微升), 蛋白激酶 60 微升(20 微克/60 微升)(即 CX); 而空白管(B), 则不加标准 cAMP 或样品, 也不加激酶, 而以 100 微升的 Tris-EDTA 缓冲液代替。在总计数管(CT) 中只加 150 微升缓冲液及 30 微升的 ³H-CAMP。以上步骤均需在冰浴中进行。加完后, 放置在 0—2℃ 下温育 2 小时进行反应。终止反应后, 除 CT 管外, 其它各管分别加入 50 微升的吸附剂(5 毫升 Tris-EDTA 缓冲液中含有 100 毫克牛血清白蛋白和 300 毫克活性炭。在磁力搅拌器下搅拌 10 分钟后即可使用), 摇匀, 在 3000 转/分下离心 5 分钟, 然后用微量加样器小心吸取上清液 120 微升放入含有 PPO-二氧六环闪烁液 5 毫升的测量瓶中, 在 YS-2 型自动闪烁计数器中进行测量。

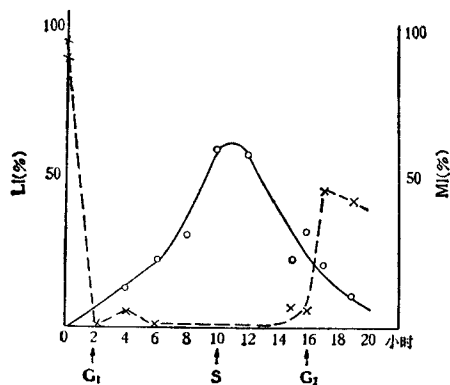


图 1 M 期同步化 CHO 细胞释放后不同时间之 LI (标记有丝分裂指数) 和 MI (有丝分裂指数) 变化
O—O—O LI X·····X·····X MI

蛋白酶消化, 消化时先将培养液倒掉, 加 10 滴 0.25% 胰蛋白酶洗一下, 然后再加 1—1.5 毫升胰蛋白酶消化 2 分钟(置 37℃ 温箱中), 消化毕倒掉酶液, 放置片刻, 加 1 毫升新鲜培养液冲打

cAMP 含量的计算 按每管所得的计数率减去空白管 (B) 的计数率而求出 C_0/C_x 值, 并以 C_0/C_x 值对微微克分子标准 cAMP 作标准曲线(图2)。如所测样品中 cAMP 含量大于 1 微微克分子时, 则从此标准曲线中查找。如果样品中 cAMP 含量在 1 微微克分子以下时, 则从 $C_x/C_T \times 100$ 求得结合百分率, 在半对数坐标纸上以结合百分率对微微克分子标准 cAMP 作标准曲线, 然后在此标准曲线中查找(图3)。再经过计算, 最后以 10^5 细胞中所含

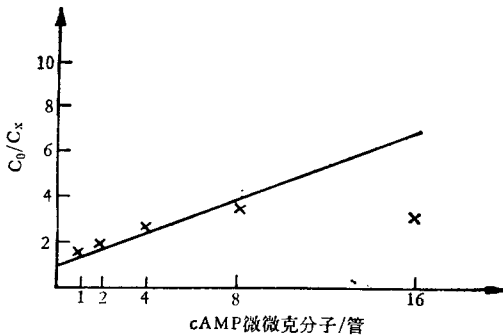


图2 cAMP 标准曲线

C_0 = 仅有 ^3H -cAMP 时, 结合的放射性
 C_x = 标准或未知样品存在时的放射性

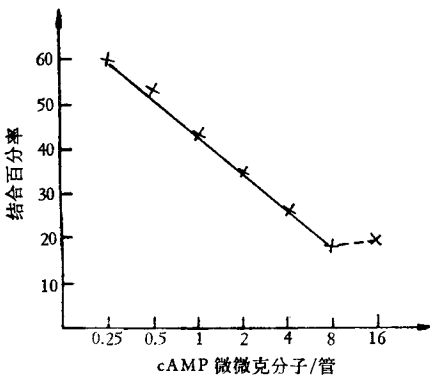


图3 cAMP 标准曲线

cAMP 的量来表示。

结果与讨论

关于 CHO 细胞周期各时相中 cAMP 浓度的变化 Sheppard 和 Prescott (1972) 曾有报道^[4], 根据他们的研究结果指出在有丝分裂期时 cAMP 浓度有着明显的下降, 而在有丝分裂后不久的早 G_1 期时 cAMP 水平立刻增长三

表1 CHO 细胞周期各时相中 cAMP 水平

细胞周期时相	10^5 细胞中所含 cAMP 微微克分子	平均 10^5 细胞中所含 cAMP 微微克分子
M	(1) 0.265	0.31 ± 0.03
	(2) 0.36	
	(3) 0.30	
G_1	(1) 0.46	0.5 ± 0.05
	(2) 0.59	
	(3) 0.45	
S	(1) 0.53	0.57 ± 0.22
	(2) 0.60	
	(3) 0.59	
G_2	(1) 0.89	0.74 ± 0.08
	(2) 0.70	
	(3) 0.625	

倍, 到 G_1 晚期 cAMP 浓度降至中等水平, 当细胞进入 S 期时 cAMP 浓度仍维持同样水平, 我们对 CHO 细胞周期各时相中 cAMP 水平的研究结果如表 1 中所示。从表 1 中可看出 cAMP 在细胞周期各时相中的变化, 在有丝分裂期时 cAMP 含量最低, 到有丝分裂后两小时的 G_1 期时, cAMP 水平略有升高, 在进入 S 期时, cAMP 水平仍基本维持在此水平, 而到 G_2 期时 cAMP 水平则较其它各期更高些, 这个结果与 Sheppard 和 Prescott 等所报道的是基本相吻合。Burger 等 (1972) 对小鼠 3T3 细胞和 Py 3T3 细胞的研究^[5]以及 Zeiling 等 (1974) 对 HeLa 细胞的研究^[6], 也曾指出 cAMP 水平在有丝分裂期时显著下降, 另外 Millis 等 (1973) 对一株人的淋巴细胞研究^[7]也指出 cAMP 浓度在 G_2 期时比 S 期或有丝分裂期时更高些。

通过以上结果可以看出细胞周期中 cAMP 的水平是有变动的, 一般来说, 细胞内 cAMP 浓度的最大变化是在有丝分裂时显著下降, 这一点在以上的研究结果中都已得到了证实, 至于有丝分裂期时 cAMP 水平降低的真正原因, 目前尚不清楚。但是据报道在有丝分裂期时细胞的化学组成和细胞表面结构, 以及做为维持细胞内 cAMP 浓度平衡的腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶的活性都有所改变, 而且, 在有丝分裂期时所有的 RNA 合成几乎都已停止, 此时做为

对维持一个正常的基本 cAMP 水平所必需的蛋白质合成速率极度下降。鉴于以上的某种因素,就有可能造成有丝分裂期时 cAMP 水平的降低。

结 论

CHO 细胞周期各时相中 cAMP 含量的变化,一般来说,在M期时含量最低, G_1 期略有升高,进入 S 期时仍基本维持在此水平,而在 G_2 期时 cAMP 水平则较其它各期更高些。

参 考 文 献

[1] Abell, C. W. and Monahan, T. M.: *J. Cell. Biol.*,

59, 549, 1973.

[2] 张鸿卿、吴同乐《北京师范大学学报》, 8, 1981.

[3] Barranco, S. C. et al.: *Cell tissue Kinetic*, 10, 355, 1977.

[4] Sheppard J. R. et al.: *Exptl. Cell. Res.*, 75, 293, 1972.

[5] Burger, M. M. et al.: *Nature, (London). New. Biol.*, 239, 161, 1972.

[6] Zeilig, C. E. et al.: *Fed. Proc.*, 33, 1391, 1974.

[7] Millis, A. J. T. et al.: *Biochem. Biophys Res. Commum.*, 49, 1645, 1972.

[8] D. M. Prescott *Reproduction of Eukaryotic Cells* Academic Press. 1976.

[本文于 1982 年 12 月 10 日收到]

^{35}S 、 ^{75}Se 双示踪测量淬灭校正方法的研究

李 洞 王 德 全

(西安医学院核医学教研室)

^{75}Se 是发射多种能量 γ 射线的核素,利用井型晶体测量,可以获得较高的计数效率;但它的 γ 射线与闪烁液作用产生康普顿电子,在液闪测量中,也有相当的计数^[1]; ^{35}S 是纯 β 发射体,用液闪测量有很高的计数效率。 ^{35}S 、 ^{75}Se 双示踪测量,实际上属于 β - γ 双标记测量问题。早期的 β - γ 双标记测量方法,常为双管法或吸收片法^[2];近十多年,多采用井型晶体—液闪测量法,但常不进行淬灭校正^[3,4];只有个别作者提到用内标准源法进行淬灭校正^[5]。内标准源法用于双标记样品的淬灭校正,不仅操作和计算繁杂,而且准确度差^[6]。

本实验的目的,就是在我室已经建立的 ^{35}S 、 ^{75}Se 双示踪井型晶体—液闪测量法的基础上,建立一个简便、准确的 ^{35}S 、 ^{75}Se 双示踪测量淬灭校正方法,并对与此有关的问题,作进一步的探讨。

一、基本 原 理

由于 ^{35}S 、 ^{75}Se 分别在液闪和井型晶体测量条件下具有较高的计数效率,故将 ^{35}S 、 ^{75}Se 双标记样品在这两种条件下测量,利用解联立方程的方法,可以分别求得其放射性强度^[7]。设井型晶体测量时的 ^{35}S 、 ^{75}Se 计数效率分别为 $E_{w.s}$ 、 $E_{w.se}$, 总计数率为 W ; 液闪测量的效率分别为 $E_{L.s}$ 、 $E_{L.se}$, 总计数率为 L ; ^{35}S 、 ^{75}Se 放射性强度分别为 S 、 Se (dpm), 则

$$\begin{cases} E_{w.s} \cdot S + E_{w.se} \cdot Se = W \\ E_{L.s} \cdot S + E_{L.se} \cdot Se = L \end{cases} \quad (1)$$

若 ^{35}S 在井型晶体的韧致辐射计数不能测出(参见后文),即 $E_{w.s} = 0$ 则

$$\begin{cases} E_{w.se} \cdot Se = W \\ E_{L.s} \cdot S + E_{L.se} \cdot Se = L \end{cases} \quad (2)$$

在相对测量中,若淬灭程度不变,以 cpm 计,则 $W_{se} = E_{w.se} \cdot Se$, $L_s = E_{L.s} \cdot S$, L_{se}