

引起 ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入率降低 50% 的剂量, x 线为 300r—400r 左右, ^{60}Co γ 线则为 250r—300r。有关电离辐射对骨髓细胞代谢的影响提到, 尽管实验条件不完全一致, 但是有两点共同的: 1. 稍低于致死剂量作用下, 不同标记前体向 DNA 的掺入都减少了 50% 左右。2. 射线对标记前体向 DNA 掺入作用的抑制, 在一定范围内与照射剂量呈比例关系, 剂量越大, 抑制越甚。

由此看来, 骨髓细胞在体内培养和我们所进行的血细胞体外培养条件下, 抑制 50% 所需的剂量非常近似, 抑制的规律相同。

我们的实验仅是开始, 有关辐射与血淋巴细胞转化的剂量效应关系有待进一步研究, 确切掌握变化规律, 特别是整体受照射后血淋巴细胞转化的变化尚待观察研究, 以期对放射损伤的诊断提供一点客观依据。

四、小 结

x 线和 ^{60}Co γ 线照射离体的人血细胞, 对淋巴细胞转化能力的影响具有一定规律; 25r 照射使 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入有所减少, 64r 以上导致淋巴细胞转化能力的降低与对照组比较有显著性差异。辐射剂量-效应之间呈现半对数线性关系。引起 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入率抑制 50% 的体外辐照剂量: x 线约为 300r—400r, γ 线为 250r—300r。

参 考 资 料

- [1] 苏州医学院卫生系放射损伤组:《苏州医学院科研资料》, 1974 年, 第 16 期, 第 77 页。
- [2] 苏州医院卫生系放射损伤组:《苏州医院科研资料》, 1974 年, 第 16 期, 第 77 页。
- [3] 苏燎原等: 应用 ^3H -胸腺嘧啶核苷测定血淋巴细胞转化的方法, 见本期。

[本文于 1975 年 10 月 20 日收到]

应用 ^3H -胸腺嘧啶核苷测定 血淋巴细胞转化的方法

苏燎原 林兴成 刘克良 汪 涛

(苏州医学院卫生系第三教研组)

核酸在生物学上的重要性已日益受到人们的重视, 机体的生长、发育、细胞的分裂和遗传等都与核酸的合成、分解过程紧密相关。血细胞的体外培养方法已广泛应用于临床和基础医学。淋巴细胞中的 T 细胞受到 PHA (植物血凝素) 等物资的刺激可以转化为淋巴母细胞, 而脱氧核糖核酸 (DNA) 合成是 T 细胞转化的物质基础。它们可反映机体的免疫和淋巴细胞的复制能力, 借以观察各种疾病时的变化。最早是应用光学显微镜观察淋巴细胞形态的转化。自从应用了液体闪烁计数器, 就使这项研究工作有了新的进展。它是测量 ^3H 、 ^{14}C 等软 β 射线的有效仪器。

胸腺嘧啶核苷 (TdR) 是 DNA 特殊的前

体, 测定 ^3H 标记的 TdR (^3H -TdR) 掺入到 DNA 的放射性能灵敏而又客观地反映 DNA 合成——淋巴细胞的转化。

现将我们所做的有关微量人血细胞在体外培养条件下, 用 ^3H -TdR 作掺入实验, 用国产 FJ-353 型双道液体闪烁计数器测定淋巴细胞转化的方法介绍如下:

一、闪烁液的配方及用量

这是进行液体闪烁测量首先需要解决的问题。在选择闪烁液配方时, 必须保证测量效果并注意节约。我们根据理论上的配方^[1]对闪烁液进行了质和量方面的改良, 实验结果如下:

(一) 测定不同配方的效果

以同量放射性 ^3H -TdR 加至 15 毫升各型闪烁液中与 FJ-353 型液体闪烁计数器附带闪烁液的测量效果进行比较,结果见表 1。

表 1 各型闪烁液测量的相对效果

分 组		1	2	3	4	5	6
配 方	PBD (克)	12	—	—	—	—	—
	PPO (克)	—	4	3	4	3	5
	POPOP (克)	0.6	0.6	0.4	0.4	0.6	0.05
	萘(克)	110	110	110	110	110	110
	二氧六环 (毫升)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
相对测量效率 (%)		100	94	93	85	81	53

结果表明:第二、三组配方测量效果与我们所用的液体闪烁计数器所附的闪烁液相近,说明适当减少闪烁剂用量效果不差。PPO 3 克、POPOP 0.4 克、萘 110 克、二氧六环 1000 毫升的配方是可取的。

(二) 比较不同量闪烁液的测量效果

将 0.2 微居里的 ^3H -TdR 加入同型不同量的闪烁液中测定,结果是 10 毫升 > 15 毫升 > 8 毫升 > 5 毫升。应该指出,本实验 10 毫升的测定效果比常规应用的 15 毫升好。5 毫升的测量效率相当于 10 毫升的 80%,从节约的观点来看还是可取的。

二、 ^3H -TdR 掺入实验

(一) 培养条件

取 0.1 毫升肝素抗凝血液,用注射器或吸管注入培养瓶中,瓶内盛有 3 毫升含 PHA 的 Eagle's 生长培养液。37℃ 下恒温培养。取 3 个健康人血在不同培养时间比较 ^3H -TdR 的掺入效果,培养三天的(最后 16 小时加入 ^3H -TdR 0.6 微居里)比培养二天的测定数据可提高 2.5 倍以上。

(二) 样品处理

1. 洗涤

培养结束时,必须将白细胞外的 ^3H 放射性去除干净。先将培养瓶的上清液吸去,然后用离心方法(3000 转/分)洗涤沉淀,采用下列几种溶液进行洗涤(注:第三次洗涤的上清液放射性为本底水平)。

(1) 生理盐水洗涤两次,第三次用 5% 三氯醋酸。

(2) 0.25% 皂素洗涤两次,第三次用生理盐水。

(3) 3% 冰醋酸洗涤三次。

(4) 两次生理盐水,一次低渗盐水或蒸馏水洗涤。

(2)、(3)、(4) 是溶解清除红细胞的方法。但 DNA 存在于细胞核中,红细胞没有核,亦无 ^3H -TdR 掺入。如果最终样品制备是用三氯醋酸提取,则不存在红细胞的颜色干扰,可不采取这些方法。低渗盐水及蒸馏水均能破坏白细胞,使沉淀物放射性偏低。实验结果认为(1)法最好。生理盐水是细胞的生理状态的溶液,不破坏细胞,第三次改用三氯醋酸,是因为此时细胞外放射性已经很低,三氯醋酸可使离心的沉淀压紧,将上清液倾弃干净后,制备的样品比较纯净。

2. 样品制备

应用 S-T-S 方法^[2],沉淀加 0.5 毫升 5% 三氯醋酸置 90℃ 水浴 15 分钟提取 DNA。离心后上清液透明无色,其中即含有已经掺入 DNA 的 ^3H -TdR 的放射性,吸取 0.2 毫升加到闪烁液中进行测量,此法效果较好。

我们也曾试用溶解细胞的方法:沉淀物加过氧化氢漂白,然后加下列各种细胞溶解液,如乙二醇乙醚,乙二醇丁醚,海胺,新洁尔灭等,溶液均呈轻微乳浊,测量效果远不及三氯醋酸提取法。用氢氧化钾溶解或过氯酸硝化液,加入本闪烁液中效果均差,而且费时。

关于 5% 三氯醋酸对闪烁液的淬灭作用问题,据我们实验认为,仅仅比水溶液增加 5%,影响很小。

我们按照所述方法(见摘要)测定了十例健康人血,每人血样重复数 4—5 个,测量数据按

B道减本底计算,结果见表2。

表2 正常人0.1毫升血液被³H-TdR掺入的测量数据

姓 氏	放射性计数/分*	³ H-TdR0.6μc (注入量)放射性计数/分	掺入率
石 胡 詹 杭	3394±1311	60020	5.7%
	8630±447		14.4%
	9436±1181		15.7%
	5861±472		9.8%
杜 张 陈 朱	6072±1194	49867	12.2%
	4948±599		9.9%
	4157±875		8.3%
	3514±256		7.0%
徐 刘	5286±237	61238	8.6%
	9739±814		15.9%

* $\bar{x} \pm SD$

0.1毫升血液被³H-TdR掺入的放射性计数波动在3394次—9739次/分。若以注入的0.6微居里TdR的计数率作100%计算,平均掺入率为10.8%。

应用本法可发现,用电离辐射对血液进行体外照射可影响³H-TdR掺入,在25r—1000r范围内剂量-效应呈线性关系。

三、讨 论

血液培养方法甚多,有些报道将血液分离出淋巴细胞进行培养。我们考虑分离过程操作较复杂,且增加污染机会,用血量多。本实验采用全血培养,操作简便,仅用0.1毫升血即可。

淋巴细胞在体外培养受PHA刺激,30—40小时开始第一次合成DNA。按我们实验此时³H-TdR掺入低。而三天培养时间掺入高,有利于进行实验观察。

(上接第4页)

以华国锋主席为首的党中央,继承毛主席的遗志,一举粉碎了王张江姚反党集团篡党夺权的阴谋,这一伟大的历史性胜利,极大地激发和调动了全国人民包括科技战线上广大革命群众的社会主义积极性,为我国科学技术现代化开辟了一个光辉灿烂的前景。我们一定要高举毛主席伟大红旗,在以华主席为首的党中央的领导下,学好文件抓住纲,深入揭批“四人帮”,鼓足干劲,力争上游,自力更生,奋发图强,树雄心,立壮志,赶超世界先进科学技术水平,加速实现科学技术现代化。每一个科学技术工作者都应当认清这个形势,抓住当前的有利时机,学习大庆、大寨人的革命精神,努力做好我们的工作,和全国人民一道,为在本世纪把我国建设成四个现代化的强盛的社会主义祖国,为最终实现共产主义而努力奋斗!

样品处理方法关键是两个:一是细胞外放射性必须洗净,二是样品制备适合于闪烁测量的要求。

二氧六环能容纳一定量的水分,使呈均相。5%三氯醋酸提取液透明无色,加入闪烁液中能均匀溶解,淬灭作用小。闪烁剂PPO及POPOP的效果和价格均较理想。

闪烁液的配方及用量都作了探讨,在我们的实验条件下,PPO/POPOP 3克/0.4克的比例,闪烁液用5毫升是可取的,既保证了质量又考虑了节约原则。

四、摘 要

本文介绍了应用微量血液测定DNA合成的方法:

0.1毫升肝素抗凝血液灌入3毫升含PHA的Fagle's生长培养液中,培养54小时后注入³H-TdR 0.6微居里,再培养16小时,吸弃上清液,沉淀用生理盐水洗涤两次,5%三氯醋酸洗一次。然后沉淀加0.5毫升5%三氯醋酸置90℃水浴15分钟,离心后吸取上清液0.2毫升加到5毫升闪烁液中进行测量。闪烁液配方:PPO 3克,POPOP 0.4 萘克、110 克、二氧六环 1000 毫升。

10例健康人血平均³H-TdR掺入率为10.8%。

参 考 资 料

- [1] 夏宗勤等:《液体闪烁测量法(讲义)》,1973。
- [2] David, G.: Method of Biochemical Analysis, 1, 290 1957.

[本文于1975年10月21日收到]