

## 参 考 文 献

- 1 Mueller P *et al.* *J Phys Chem*, 1963; 6:534
- 2 Tien H Ti, *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*, New York: Marcel Dekker Inc., 1974: 662—672
- 3 田心棣,感光科学与光化学,1987;3:30
- 4 田心棣,化学通报,1989;7:1
- 5 Janas T *et al.* *Bioelectrochem Bioenerg*, 1988; 19: 405
- 6 Tien H Ti *et al.* *Bioelectrochem Bioenerg*, 1989; 22:211
- 7 城田靖彦,電気化学,1986;54(4):303
- 8 野中勉,表面,1987;25(5):283
- 9 Leidheiser H *et al.* *Science*, 1988; 241:6
- 10 吉野勝美,化学,1985;40(5):317
- 11 Murray R W. *Acc Chem Res*, 1980; 13:135
- 12 田心棣,人造双分子层膜,北京:高等教育出版社,1987: 59—71

## 应用流式细胞仪检测网织红细胞

刘江惠 左连富 郭建文

(河北省肿瘤研究所,石家庄 050011)

## 提 要

网织红细胞内含有比成熟红细胞更多的RNA。它可与荧光染料派若宁 $\gamma$ 特异性结合发出荧光。应用流式细胞仪进行荧光强度的测定,可得出网织红细胞在人体末梢血中占红细胞的百分率。本实验与常规的煌焦油蓝法比较,重复性好,变异程度小,且与常规法呈高度相关。

**关键词** 网织红细胞,流式细胞术

流式细胞术是一种对单细胞定量分析和分选的新技术。它具有检测速度快、统计学精度高之优点。本文应用该技术对人体末梢血中的网织红细胞(Ret)进行检测,探索一种计数Ret的新方法。

Ret是一种未完全成熟的红细胞,含有一定量的RNA。利用特异性的RNA荧光染色方法,使荧光染料分子与RNA结合发出荧光。RNA分子越多荧光强度越强。应用流式细胞仪检测细胞的荧光强度,从而得出Ret的RNA含量和所占红细胞的百分比。

## 1 材 料 和 方 法

## 1.1 血样采集

血标本来自30例血红蛋白含量均在12g以上的正常人,其中男女各15人,年龄在3个月以上,因这一年龄组的正常人Ret无明显差

别<sup>[1]</sup>。

## 1.2 样品制备

血液是天然的单分散细胞悬液,无需特殊处理可获得良好的流式分析样品。样品制备方法参照文献[2]。具体操作如下:

a. 取末梢血 $5\mu\text{l}$ ,加入盛有 $1\mu\text{l}$ 3.8%枸橼酸钠或 $0.1\mu\text{l}$ 肝素抗凝剂的试管中,混匀。b. 加入2ml枸橼酸钠红细胞保养液离心去上清。c. 将1%戊二醛1ml和红细胞保养液1ml加入试管中,并且用吸管轻轻吹吸混匀。放置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱备检,可放置4周左右。若需马上检测可固定15min后,离心去上清,用pH7.5磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次。d. 加入 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的派若宁 $\gamma$ 工作液约1ml,常温染色30min离心去染液,用PBS洗2次,备检。

派若宁  $\gamma$  染色液的配制: 取派若宁  $\gamma$  1.0 mg 加入 100ml 蒸馏水配成母液。取 1.0ml 母液加入 99ml 枸橼酸钠缓冲液稀释为 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度,即为工作液。

### 1.3 上机检测

向试管中加入约 2ml PBS 将细胞悬浮。所用机型 FACS 420 流式细胞仪,激发波长 514 nm,功率为 300mW。每份样品计数  $2 \times 10^4$  个细胞。设置 Ret, RNA 荧光的电子窗口,直接可显示 Ret 计数,并将数据输入 HP-300 Consort 30 计算机进行处理,并打印出结果。

1.4 以煌焦油蓝染色光镜下计数 1000 个细胞,进行双盲对照。

## 2 结果和讨论

用流式计数 Ret 以直方图的形式显示(见图 1)。在 50 道前为成熟红细胞峰,从 50~250 道均为网织红细胞,尤以 130 道左右的细胞数最多,形成网织红细胞峰。30 份样品其结果最大值为 1.9%,最小值 0.5% ( $1.04 \pm 0.3$ ) 用光镜计数的结果最大值 1.4%,最小值 0.3% ( $0.85 \pm 0.3$ )。流式计数结果普遍高于光镜下计数,而且二者经直线相关系数分析 ( $r = 0.78$   $n = 30$   $p < 0.01$ ) 呈高度相关。

应用流式细胞仪测定,其结果重复性好。从 30 份样品中任意抽取 6 份,进行 5 个时间组的对照实验,分别为 1 天、1 周、2 周、3 周、4 周。Ret 均值变异系数范围在 5.0%—15.2% 之间,平均 10.3% (见表 1),低于煌焦油蓝染色光镜计数法。因此固定后的样品可在 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置 4 周左右。

表 1 流式细胞仪测定结果

样品号	时间					$\bar{x}$	S	CV (%)
	1天	1周	2周	3周	4周			
1	1.0	1.4	1.2	1.4	1.1	1.25	0.19	15.2
2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.2	1.03	0.05	5.0
3	1.0	1.2	1.1	0.9	1.1	1.05	0.12	11.4
4	0.9	1.2	1.0	1.0	1.0	1.03	0.13	12.2
5	1.2	1.3	1.3	1.1	1.0	1.23	0.10	8.1
6	1.2	1.0	1.1	1.3	1.1	1.14	0.12	10.1

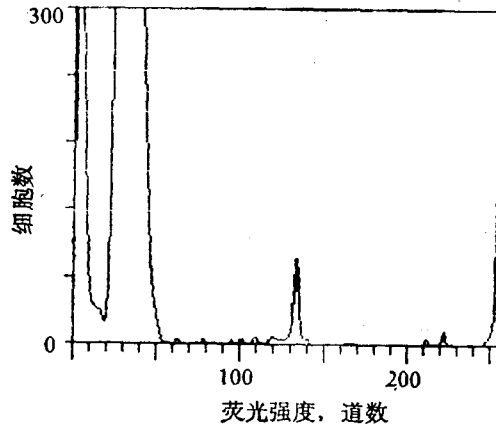


图 1 流式细胞仪测定 Ret 的 FL1 参数直方图

目前临床上通常采用煌焦油蓝染色光镜下计数,一般计数 500—1000 个细胞,加上涂片时细胞分布不匀,检验人员的主观差异,重复性差,统计学上不可靠<sup>[3,4]</sup>利用流式细胞分析仪计数,则大大提高其可信度,计数量大,速度快,在 2 min 内可计数  $2 \times 10^4$  个细胞,自动分析消除了人的主观差异,统计学上精度高。

在光镜下计数,肉眼难以分辨出 IV 型网织红细胞,而这类细胞在外周血中占 61%<sup>[5]</sup>。流式分析仪具有极高的灵敏度,可以完全分辨这类细胞,所测得的结果也普遍高于光镜下计数。

准确计数血液中网织红细胞的数目,对估价骨髓中红细胞的生成活性具有重要的意义。网织红细胞是红细胞正常发育的阶段之一,介于晚幼红和成熟红细胞之间,含量通常在 0.5%—1.5% 之间<sup>[1]</sup>。而在病理状态下,Ret 可升高或减低。如溶血性贫血、缺铁性贫血、巨幼红细胞贫血都可使 Ret 升高。而再生障碍性贫血的病人 Ret 则减低,随着治疗和病情发展情况,Ret 也随之改变,因此对此类病人来说,Ret 是观察治疗疗效的一个重要指标。

在计数 Ret 时,白细胞也混于悬液内,白细胞也含有少量的 RNA,所以白细胞也计数在内,只是在正常情况下白细胞较少,约相当于细胞总数的千分之一,实际上对计数影响很小,可忽略不计。若遇白细胞异常增高或重度贫血者,可通过血常规计数从细胞总数中减去白细胞数。

(下转第 300 页)

4).

**2.3 ConA-Sepharose 4B 吸附** Fn 是糖蛋白,主要含 N-连接型糖链,本实验用与糖基或糖链专一结合的 ConA 亲和层析柱来研究纯化的人血浆 Fn 糖链结构。结果列于表 2,提示 Fn 全部与 ConA 结合,且属于用 10 mmol/L  $\alpha$ -甲基甘露糖即可洗脱的弱结合部分。

表 2 人血浆 Fn 的 ConA-Sepharose 4B 亲和层析

	实验 1		实验 2	
	Fn(ng)	%	Fn(ng)	%
不吸附	0	0	156.0	7.8
弱吸附	2885.0	100	1730.0	87.6
强吸附	0	0	92.0	4.6

Fn 是存在于细胞膜及细胞间质的一类蛋白质,分子量为 450000 道尔顿左右。由二个基本相同的亚基通过近 C 端的二个二硫键相连而成,亚基中的若干结构域分别与肝素、肌动蛋白、明胶、DNA 乃至细菌、细胞结合<sup>[1]</sup>。本方法就是基于 Fn 分子中 45kD 的结构域能与明胶特异结合的特点,进行亲和层析分离的。由于 Fn 与明胶结合较紧,很难用盐洗脱,只能采用尿素洗脱。除去尿素后 Fn 仍保持其原有的抗原性,所以此法纯化的 Fn 同样适用于免疫方面实验。

在亲和层析前,血浆先通过 Sepharose 4B 柱,与该柱吸附而除去一部分杂蛋白质,旨在使明胶亲和柱尿素洗脱所得仅为与明胶特异吸附的蛋白质,以提高亲和层析效果,此外可增加柱的使用次数。

由于明胶除能结合完整 Fn 亚基,同时也吸附含有明胶结合结构域的 Fn 片段,因此只有通过分子筛效应才可将完整亚基及各不同分子量的片段区分,此作用为其它亲和层析如抗体亲和层析所不及。所得不同分子量片段可作片段中糖链有否的分析及进行其它特异结合如肝素、DNA 等结合的实验之用,也可作片段蛋白质序列测定。

人体各组织来源 Fn 均含有糖链,主要为 N-连接型糖链,但糖链的结构有组织差异<sup>[12]</sup>。本实验用 ConA-Sepharose 4B 亲和层析发现,所有血浆的 Fn 均处在 ConA 的弱结合部分,此部分糖链结构为不含分叉性 N-乙酰氨基葡萄糖的二天线,与文献报道相一致<sup>[13,14]</sup>。也可用 ConA-Sepharose 4B 亲和层析分离仅含二天线 N-连接型糖链的 Fn,但不适用于其它组织来源的含有二天线以外结构的 Fn,否则会导致因糖链结构不同而引起的 Fn 丢失。

参 考 文 献

- 1 Akiyama S K. *Advances in Enzymology*, 1987; 59: 1
- 2 Hynes R. *Ann Rev Cell Biol*, 1985; 1: 67
- 3 Hayman E G *et al. Exp Cell Res*, 1985; 160: 245
- 4 Thiery T P. *Ann Rev Cell Biol*, 1985; 1: 91
- 5 Humphries M J *et al. Science*, 1986; 233: 467
- 6 Cuatrecasas P. *J Biol Chem*. 1970; 245: 3059
- 7 郑榕岚等. *生物化学与生物物理学报*, 1988; 20: 198
- 8 郭春祥,郭锡琼. *上海免疫学杂志*, 1983; 3: 97
- 9 陈惠黎等. *上海免疫学杂志*, 1985; 5: 100
- 10 Mitra R S *et al. Appl Environ Microbiol*, 1984; 4: 1012
- 11 查锡良等. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21: 431
- 12 Carsons S *et al. J Clin Invest*, 1987; 80: 1342
- 13 Takasaki S *et al. J Biochem*, 1980; 88: 1587
- 14 Takasaki S *et al. J Biol Chem*, 1979; 254: 8548

(上接第 310 页)

制备样品和上机检测前应充分混匀,同时也必须注意不要剧烈振荡而造成细胞破碎。

这个实验方法的建立,将为临床上提供一个可靠的网织红细胞计数的数据,有利于对患者的治疗和疗效观察作出正确的评价。

参 考 文 献

- 1 上海第二医学院主编. *小儿内科学*, (第 1 版)北京: 人民卫生出版社, 1981: 396
- 2 Tank H J *et al. Blood*, 1983; 61: 1091
- 3 Savage R A *et al. Blood Cells*, 1985; 11: 97
- 4 Peebles D A *et al. Am J Clin Pathol*, 1981; 75: 713
- 5 Koepke J F *et al. Clin Lab Haemat*, 1986; 8: 169