

研究简报

梨形四膜虫衰老过程中 DNA 含量的变化

王 冰 刘沛生 邢怡茜

(湖北省老年医学研究所, 武汉 430071)

摘要 应用一种新型的细胞核内 DNA 含量测定方法——图像分析法, 测定真核细胞梨形四膜虫衰老过程中 DNA 含量的变化。根据 Beer-Lambert 定律, 以细胞核在不同生长期内的积分光密度的水平表示核内 DNA 含量的变化。该方法具有测量速度快, 重复性好, 操作简单, 结果可靠等优点。实验结果表明: 四膜虫在进入对数生长期时, DNA 含量逐渐达到高峰, 随着细胞逐渐老化, 细胞分裂次数及核内 DNA 含量逐步减少。

关键词 梨形四膜虫, 图像分析, DNA 含量, 衰老

在以往的实验中^[1], 多采用经典的电镜放射自显影法及液体闪烁计数法来研究细胞衰老过程中 DNA 修复合成的变化, 本文采用西德的图像仪 IBAS 系统对真核生物梨形四膜虫上海株 S₁ 克隆 (*Tetrahymena pyriformis* S₁ Clone) 不同生长期内细胞核 DNA 含量进行测定分析, 取得满意的结果, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

采用西德 KONTRON 公司图像分析仪最新技术 IBAS 系统对 Feulgen 特染的四膜虫细胞核内 DNA 含量进行分析测定。

1.2 原理及方法

Feulgen 染色是一种 DNA 经典染色方法^[2], 用 1mol/L 盐酸在 60℃ 条件处理细胞, DNA 分子中的部分键断开, 在五碳糖的一端形成醛基, 而胞内 RNA 则全部分解脱落。用 Schiff 试剂和醛基结合, 形成一种紫红色的产物, 四膜虫细胞内凡是有 DNA 的部位, 皆能呈紫红色, 且染色颜色的深浅与 DNA 浓度有关。根据 Beer-Lambert 定律: 被测量物质的含量与其积分光密度在一定条件下呈化学剂量

关系^[3], $M = \frac{S}{\epsilon} \cdot \sum_{i=1}^n E_i$ (M : 物质总量; S : 面积; ϵ : 克分子吸收系数; E_i : 测量点的光密度变化值)。因此, 用细胞核的积分光密度代表细胞核的 DNA 相对含量, 符合 Beer-Lambert 定律^[4,5]。

1.3 对象

四膜虫属原生生物门纤毛纲全毛类的单细胞生物^[6], 本实验采用梨形四膜虫复合种中的上海株 (S₁) 克隆, 由北京大学生物系赠送。

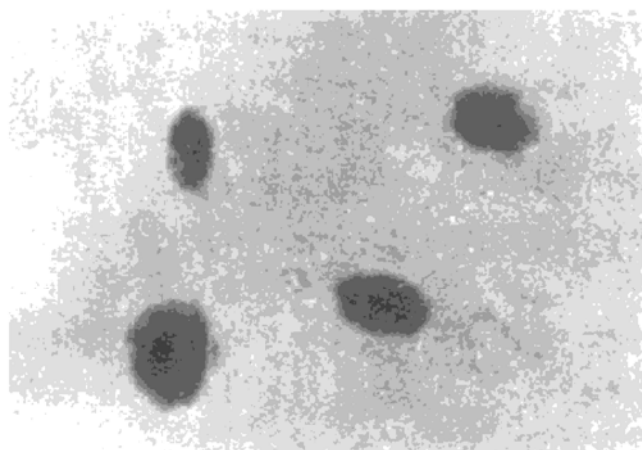
1.4 Feulgen 染色^[2]

四膜虫细胞经 Feulgen 染色法处理后, 在光学显微镜下: 核呈紫红色, 大、小核清楚, 胞浆不显色, 细胞轮廓清晰 (见图 1)。

1.5 图像仪测量

该分析仪能作扫描显微光密度测量, 进行多参数分析, 可以直接得到参数直方图和统计参数^[7]。本实验选择三个相关系数: 核平均面积 (A), 核平均光吸收 (A_M), 核积分光密度 (A_I) 用 560nm 绿光照明, 在 25× 物镜下进行测量。在测量前要先用计算定标, 空白灰度等级均值为 157.43 ± 18.52 。

(a)



(b)

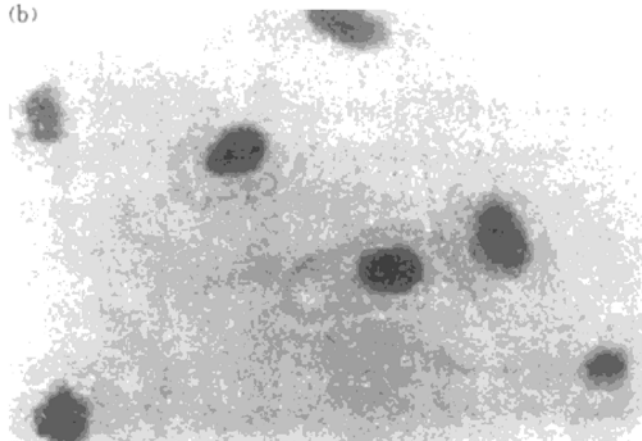


图1 四膜虫细胞经 Feulgen 特染后形态变化

(a) 第6天 (b) 第70天.

2 实验结果

2.1 DNA 含量测定

测量了四膜虫不同时期核平均面积、核平均光密度、及核积分光密度的变化,并用 A_i

代表 DNA 相对含量 (见表 1).

表1 四膜虫生长周期中 A , A_i 及 A_M 的变化

d (天数)	n	$A/\mu\text{m}^2$ $\bar{x} \pm s$	A_i $\bar{x} \pm s$	A_M $\bar{x} \pm s$
3	258	28.02 ± 9.23	16.76 ± 6.53	0.589 ± 0.044
6	262	40.46 ± 12.35	24.73 ± 8.55	0.605 ± 0.041
10	286	35.70 ± 11.71	20.49 ± 7.44	0.571 ± 0.055
20	223	29.11 ± 8.36	17.38 ± 5.47	0.594 ± 0.045
40	367	30.37 ± 9.65	15.65 ± 5.86	0.508 ± 0.043
70	241	26.28 ± 11.76	15.34 ± 7.61	0.572 ± 0.056
90	231	20.45 ± 8.38	12.20 ± 5.58	0.588 ± 0.045
110	541	17.45 ± 5.84	9.90 ± 3.81	0.560 ± 0.039

从表 1 可发现, 逐个测量阶段第 3, 6, 10, 20, 40, 70, 110d 之间 A , A_i 变化明显. 四膜虫 DNA 相对含量变化在生长早期 (0—10d), 中期 (10—40d), 晚期 (40—110d) 非常明显. 从培养第 6d 达到高峰, 此后逐渐下降, 第 110d 达最低点.

2.2 DNA 含量与虫口密度的关系分析

从整个生长期变化分析, 虫口密度高峰在第 10d 左右, 结果见表 2.

从图 2 不难发现, 四膜虫 DNA 含量与虫口密度变化密切相关, 两者呈明显正相关性 ($r = 0.88$, $P < 0.002$, 双侧), 在图 2 中变化趋势一致.

表2 四膜虫虫口密度在生长周期中变化

d (天数)	3	6	10	20	40	70	90	110
培养管数	12	12	12	12	12	12	12	12
虫口密度 ¹⁾	25.24	53.80	65.52	34.84	17.40	4.44	3.52	2.32
$\bar{x} \pm s$	± 5.82	± 6.38	± 13.95	± 6.01	± 4.19	± 1.53	± 1.02	± 0.77

¹⁾单位: 每 μl 中细胞个数.

3 讨 论

IBAS 系统具有灰度编辑软件及采用扫描积分方法的扫描显微分光光度计, 避免了闪光

误差和分布误差, 确保了测量结果的可靠性.

从实验结果分析, DNA 含量随增龄变化而逐渐减少, 且下降趋势稳定. 从整个生长期分析, 中、晚期下降明显, 这个结果与家蝇

衰老过程核酸含量变化趋势一致^[8]。但是否与四膜虫老化过程中 DNA 合成减少或 DNA 损伤修复功能减退有关, 还需要进一步研究。

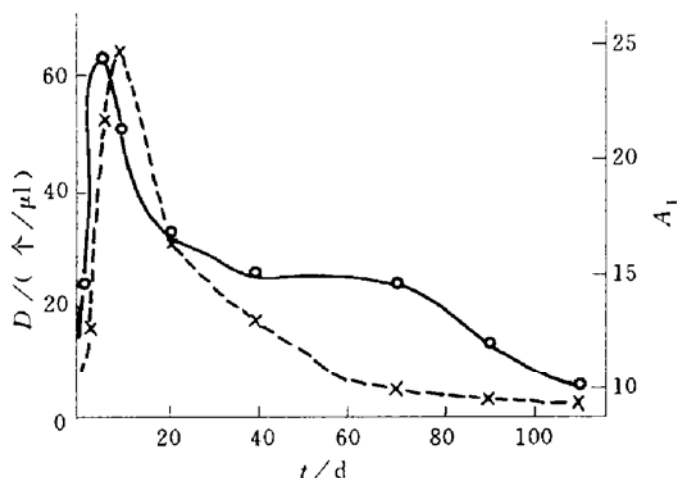


图2 四膜虫 DNA 含量与虫口密度在生长周期内的变化比较

横坐标为培养天数; 左边纵坐标 D 为虫口密度; 右边纵坐标为核积分光密度值, 代表 DNA 相对含量。

本实验中 DNA 含量与虫口密度在生长周期中呈正相关性, 而且 DNA 含量高峰在对数生长期, 比虫口密度高峰提前 2—4d. 表明: 只有当四膜虫细胞 DNA 复制等为活跃的细胞

繁殖阶段做好物质基础以后, 细胞繁殖才能进入对数生长期高峰阶段。同时, 随着细胞衰老, 虫口密度不断减少, 细胞分裂能力下降, DNA 含量也不断降低, 两者变化趋势基本一致, 说明了 DNA 含量变化与衰老有直接关系, 生物体衰老与遗传物质的变化有着密切联系。

致谢 感谢湖北医科大学实验中心电镜室的曾祥新技师, 梁浩麟主任对本研究工作的大力支持和帮助。

参 考 文 献

- 1 Ma H J, Nagata T. Cell Mol Biol, 1990; 36 (1): 73—84
- 2 Culling C F A 著, 孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册. 北京: 科学出版社, 1982 年; 242—248
- 3 胡匡祐. 细胞生物学杂志, 1984; 6 (3): 136—141
- 4 刘洪祥, 王兆一, 王凤荣. 中华物理医学杂志, 1981; 3 (2): 100—102
- 5 李素文, 霍满鹏, 成汝萱. 中华物理医学杂志, 1989; 11 (2): 104—107
- 6 Corliss J O. In: Elliot A M ed. Biology of Tetrahymena. Dowden Hutchinson and Ross Inc, 1973: 1—51
- 7 韦 正, 刘亚伦. 中华物理医学杂志, 1989; 11 (1): 29—33
- 8 张佩德, 梁靖威, 谭坚贞. 老年学杂志, 1987; 7 (3): 56—59

(上接第 267 页)

新方法也有一定的局限性, 即不能象同位素法那样在短时间内分析大量样品。为此, 我们进行技术改进, 创立了连续进样分析技术, 可以在原来分析一个样品的时间里同时分析多达十个样品, 在一定程度上解决了问题。我们多次用到这样的工作方式, 收到了较好的效果。图 2 是对反应酶量相同, 反应时间不同的多个样品的分析。

由于新方法的反应体积是 $10\mu\text{l}$, 同位素法的反应体积是 $50\mu\text{l}$, 同量的酶用新方法测定时酶浓度比同位素法高 5 倍, 导致新方法比同位素法测出的活力大约高一个数量级, 说明了新方法灵敏度更高。

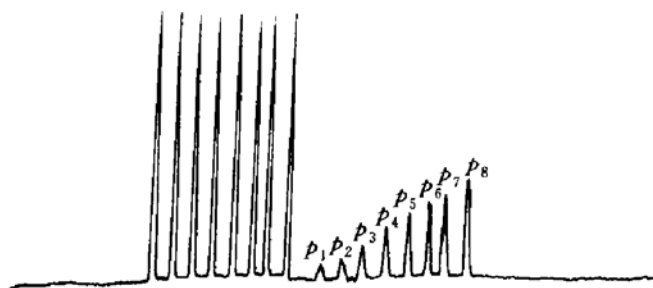


图2 连续进样图谱

S_1 — S_8 代表不同反应时间残留的底物, P_1 — P_8 代表不同反应时间的产物, 反应时间分别为 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20min.

毛细管电泳用于蛋白激酶活性测定尚未见报道, 且本方法对所有蛋白激酶的测活都适用, 期望得到更广泛的应用。

coefficient of variation (CVs) of two samples were 3.8% and 4.7%. Day-to-day coefficient of variation (CVs) was 7.0%. The correlation of immunoprecipitation method and electrophoretic procedure were consistent ($n=22$, $r=0.976$). Reference values for total LD and LD1 were 102.3 ± 16.4 U/L and 23.7 ± 4.4 U/L respectively. The ratio of LD1 to total LD was $23.1 \pm 3.9\%$. The advantages of immunoprecipitation method were: high specificity, good precision and linearity, easy operation. Immunoprecipitation method was very suitable for measuring LD1 and could adaptable to the automatic analyzer.

Key words isoenzyme 1 of lactate dehydrogenase (LD1), immunoprecipitation method, anti-M antibody

New Semi-dry Technique in SDS PAGE. Guo Yaojun, Wen Tao. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 265
Shorter running time, higher resolution, simpler operation without preparation of large amount of electrode buffer is the superior character of SDS PAGE semi-dry technique. It is more convenient with buffer soaked filter strips instead of electrode buffer with filter bridge or buffer gel strips.

Key words semi-dry technique, SDS PAGE, filter strips

A New Assay for Kinase Activity: The Determination of Protein Kinase Using Capillary Electrophoresis. Wan Qian, Chen Changzheng, Li Boliang, Xia Qichang. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 267
A new assay of protein kinase A using capil-

lary electrophoresis has been established. It is a universal and useful method for kinase activity. The method based on principle that substrate (kemptide) and product (phosphorylated kemptide) are easily separated by capillary electrophoresis and the enzyme activity can be calculated on the integrated area. A continuous sampling technique which can analyse more than 10 samples in one run has also been developed. The new method is easy to operate and its accuracy and sensitivity are higher than that of conventional isotopic method.

Key words protein kinase A activity, capillary electrophoresis, phosphorylation

The Variation of Content in *Tetrahymena pyriformis* During Ageing. Wang Bing, Liu Bian-sheng, Xing Yiyin. (*Hubei Geriatric Institute, Wuhan 430071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 268

Digital Image Analysis is a new DNA content measuring method in cell nucleus. During the senile process of *Tetrahymena pyriformis*, change of DNA content in nucleus could be measured by this method. According to law of Beer-Lambert, cell nucleus in different growth period showed change of nuclear DNA content using level of nuclear integral optical density. The method possess quick measuring speed, well repetition, simple operation and good results. The results showed: when *Tetrahymena pyriformis* began the logarithmic growth phase, the nuclear DNA content reached peak gradually. When cell ageing gradually, the times of cell division as well as DNA content would be gradually decreased.

Key words *Tetrahymena pyriformis*, DNA content, digital image analysis, ageing