DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.054
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
116 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)01-0116-02

单细胞凝胶电泳技术操作

Experience in method of single cell gel electrophoresis operation

梁培禾,靳风烁,贾思远,周紫垣 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提要:目的 探讨单细胞凝胶电泳技术影响因素,总结其实验方法。方法 以Singh等提出的碱性SCGE为基础,并加以改进。结果 获得了典型的彗星图像,实验效果良好。结论 SCGE简便易行,应用广泛,但应注意控制影响因素,以保证其结果的可靠。

单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星试验(Comet assay),可在单细胞水平灵敏、快速地检测DNA损伤。我们在研究急性肾衰肾小管上皮细胞DNA损伤过程中积累了一些经验,与大家交流。

1 资料与方法

肾小管细胞分离(略),SCGE步骤如下:①45 ℃,100 μl 1.0%正常熔点琼脂糖(NMA)PBS凝胶浇注于磨砂载玻片上,加盖玻片4 ℃,10 min固化;②37 ℃,细胞PBS悬液与低熔点琼脂糖(LMA)PBS凝胶混匀,移去盖玻片,75 μl滴于第1层NMA上,加盖玻片,同前固化(细胞:130 μl,LMA:0.6%);③同前铺第3层无细胞0.6% LMA,并固化;④移去盖玻片,浸入细胞裂解液4 ℃,2 h;⑤水平电泳槽,高pH电泳缓冲液浸泡20 min;⑥低温(< 15 ℃),300 mA,25 V,电泳20 min;⑦pH7.5,0.4 mol/L Tris浸洗,5 min×3次;⑧20 mg/L溴化乙啶(EB)染色15 min,荧光显微镜观测、摄影。

细胞裂解液及电泳缓冲液配制,见文献[1]。

2 结果与讨论

获得了典型、清晰的彗星图像,见图1,慧尾长度适中,细胞分布均匀,密度合理,杂质干扰少,准确反映了DNA损伤程度。

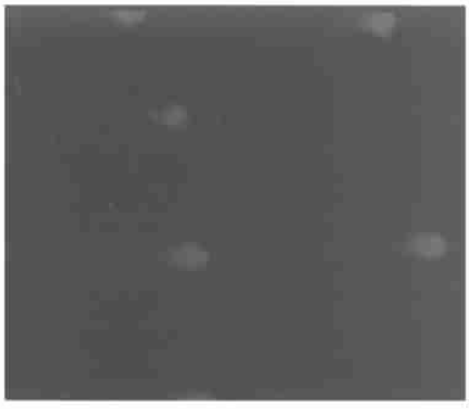


图1 典型的彗星图像

目前SCGE方法尚未完全标准化,应用最广的是Singh等[1]提出的碱性SCGE,实验中,应注意以下几点:

准备:所有器械泡酸,蒸馏水清洗;实验环境无灰尘,实验前洗手,避免杂质混入,见图2。准备微量恒温器、冰盒等,除铺胶外,其余步骤在低温下操作,防止DNA损伤的修复。

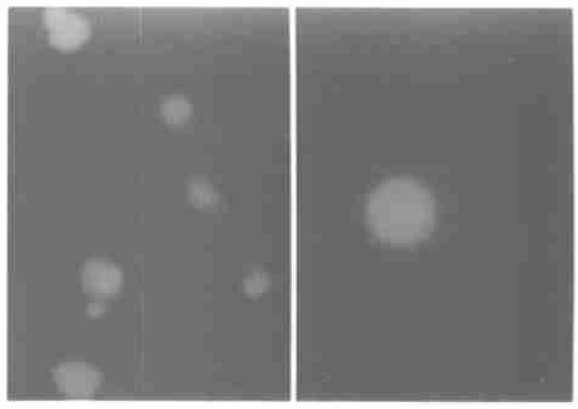


图2 杂质 注意右侧图像,较为"机械",失去了细胞特征

制备凝胶三明治:NMA适宜浓度0.5%~1%,过高或过低将造成凝固速度过快而不易铺平或粘着力低而脱落,铺胶前载玻片预热,有利于铺植平整。

LMA凝胶浓度直接关系到DNA迁移长度[1],0.6%较适宜。单片凝胶含细胞1×10为适合密度。第3层LMA可不铺。微量加样器吸头前端残留凝胶勿吹出,以防形成气泡。移去盖玻片时注意勿损伤胶膜。

碱化处理及电泳条件:SCGE分中性和碱性法两种,中性用于检测DNA双链断裂(DSBs),只限于研究射线和拟辐射化合物对DNA的损伤作用[2]。而碱化处理可检测SSBs、DSBs和碱性不稳定损伤。据报道许多处理因素造成的SSBs要比DSBs多5~2 000倍,因此碱性SCGE大大提高了检测灵敏度。碱处理时间延长可使DNA损伤表达增加,提高SCGE的灵敏性[2,3]。我们采用20 min,效果满意。

电泳时电压、电流及时间的长短会直接影响DNA迁移长度,造成假阳性或假阴性。文献[1~4]报道为18~50 V,200~300 mA,20~40 min。我们采用25 V,300 mA,20

基金项目:全军"九五"医药卫生重点课题资助项目(96L053)
作者简介:梁培禾(1972-),男,山西省平遥县人,医师,主要从事急性肾功能衰竭方面的研究。电话:(023)68757344
收稿日期:2000-01-12;修回日期:2000-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

min,效果良好。电泳进行中应持续监测,吸出或加入电泳液,调节液面高度,保持电压与电流的恒定。

常用染色剂为吖啶橙、EB、碘化丙啶等[2]。EB 多见,染色效果良好。

可在染色后 4 ℃避光潮湿条件下保存,数日后观察。但我们通过实践得出为防止荧光衰减,尽快阅片较好。阅片过程中,由于淬灭效应,荧光减弱很快,因此操作必须紧凑。

结果可直接在荧光显微镜下分析,或先摄影,再进行照片分析。但摄影、相片冲洗条件等较难控制统一,因此应尽量直接分析。

分析指标可分为两类:①人工指标,包括彗星发生率、DNA 损伤分级计数以及一些距离指标(头长、尾长等),易于测量,无需复杂仪器,但较粗略。②微机图像分析如 Komet 3.0 软件,可进行精细的荧光强度、尾矩、尾惯量等指标测定。由于无图像采集系统及相应软件,我们采用盲法人工分析,摄影后再对照片进行普通微机图像分析,吻合较好。

总之,SCGE 简便易行,易于推广,可用于大规模的筛查工作。但应严格控制各种影响因素,以确保结果的可靠。

关键词:单细胞凝胶电泳;DNA 损伤影响因素
中图法分类号:R446.6　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(2): 184—191.
[2] 何　惧,刘玉清. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展与应用[J]. 国外医学:卫生学分册, 1997, 24(2): 85—89.
[3] 马爱国,臧金林,刘四朝. 单细胞凝胶电泳技术影响因素的分析[J]. 中华预防医学杂志, 1999, 33(3): 165—165.
[4] 陈　安. 单细胞凝胶电泳法检测单细胞 DNA 损伤[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 1998, 19(4): 145—146.

(编辑　潘式文)

文章编号:1000-5404(2001)01-0117-02

技术方法

定量细胞 ELISA 检测培养细胞 ICAM-1 表达水平

Expression level of ICAM-1 on cultured cells measured quantitatively with cellular ELISA

张绪清,张　瑞,顾长海,王宇明　(第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038)

提　要:目的　探讨检测培养细胞细胞间粘附分子-1(ICAM-1)表达水平的细胞 ELISA。方法　用不同浓度 TNFα 刺激接种于 96 孔培养板中的 $HePG_2$ 细胞,以抗 ICAM-1 McAb 为第一抗体,用 ELISA 检测培养孔中的 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平。结果　对相同浓度 TNFα 诱导的 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平的 5 次测定值进行方差分析显示彼此间相差不显著($P>0.05$),批间变异系数均小于 5%,$HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平与 TNFα 浓度呈一定剂量依赖关系。结论　所建立的细胞 ELISA 的稳定性好,可用于对 $HePG_2$ 细胞 ICAM-1 表达水平进行定量分析。

对细胞表达蛋白进行定量分析,原先多采用 Western印迹法和流式细胞术。Western 印迹法实验过程复杂,不适用于检测大量标本。流式细胞术检测费用昂贵,且需特殊仪器。近年,国内外许多学者采用定量的细胞 ELISA 对单层培养细胞表达的细胞和表面膜蛋白进行定量分析。其具有简便、快速、灵敏度高等优点[1,2]。本研究拟在用细胞 ELISA 对体外单层培养细胞 ICAM-1 表达水平进行定量分析。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

$HePG_2$ 细胞,由我校免疫学实验室提供;鼠抗人 ICAM-1McAb 丹麦 DAKO 公司产品;Hepes、RPMI 1640 培养基为 SIGMA 公司产品;TNFα 北京邦定生物公司产品;羊抗鼠 IgG 标记 HRP 和 TMB 显色剂为北京中山公司产品。

1.2　方法

1.2.1　$HePG_2$ 细胞培养　　将 $HePG_2$ 细胞接种培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基(含谷氨酰胺 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 1% 青霉素, 1% 链霉素),37 ℃ 5% CO_2 培养,待其长满后,用 0.25% 胰蛋白酶消化、使其退出生长,然后加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基,调整细胞数 1×10^6/ml。取出 96 孔板,每孔中加入细胞悬液 100 μl(其中 2 孔不加细胞悬液,作空白孔),37 ℃ 5% CO_2 培养 24 h。

1.2.2　细胞因子刺激　　分别加入不同浓度的 TNFα 100 μl,刺激 24 h,每一浓度作 5 孔;加入 500 IU/μl 的 TNFα 100 μl,分别培养 48、24、12、8、4 和 0 h,每一时相点作 5 孔。

1.2.3　用细胞 ELISA 检测培养细胞 ICAM-1 表达水平　　参照 Kvale 等[1] 介绍的方法并稍作改进。①去培养上清,用 PBS 洗 2 次。②用 0.25% 戊二醛/PBS 固定 10 min,PBS 洗 3 次。③加入 3% H_2O_2/PBS 10 min× 2 次,PBS 洗 3 次。④加入正常羊血清封闭 10 min。⑤加入鼠抗人 ICAM-1 McAb(1∶300) 50 μl, 4 ℃过夜,0.05% 吐温-20/PBS 洗 5 min× 3 次。⑥加入羊抗鼠 IgG 标记的 HRP, 37 ℃温育 1 h, 0.05% 吐温-20/PBS 洗 5 min× 4 次。⑦加入 TMB 显色剂 A、B 液各 50 μl,室温显色 10 min,加入 1 mol/L HCl 50

作者简介:张绪清(1965—),男,湖北省鄂州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事病毒性肝炎发病机制与临床方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68754141

收稿日期:2000-04-07;修回日期:2000-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net