

DAPI 染色法在流式细胞术中检测 BHK-21 细胞周期的探讨

俞宗佑^{1,2}, 杨孝朴¹ (1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2. 中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃兰州 730046)

摘要 [目的] 为规模化细胞培养的检测奠定基础。[方法] 采用 DAPI 标记 BHK-21 细胞, 探索简便易行的 DNA 检测技术, 检测细胞周期中各期的 DNA 含量。[结果] DAPI 标记法是一种可靠的 DNA 检测方法, 且简单易行。[结论] 利用 DAPI 标记法能够准确进行细胞周期检测。

关键词 DAPI 染色法; 细胞周期; 流式细胞技术

中图分类号 S852.21 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)23-149-02

Discussion on the Detection of the Cell Cycle of BHK-21 Cells in Flow Cytometry by DAPI Staining

YU Zong-you^{1,2}, YANG Xiao-pu¹ (1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; 2. China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co. Ltd., Lanzhou, Gansu 730046)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for detecting the cells in mass culture. [Method] BHK-21 cells were marked by using 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining method to discuss a simple and feasible DNA detection technology. DNA content in each stage of cell cycle was detected. [Result] DAPI staining method was a simple, reliable and feasible DNA detecting method. [Conclusion] The cell cycle could be accurately detected by DAPI labeling method.

Key words DAPI; Cell cycle; Flow cytometry

细胞周期分析对反映一个细胞群体的增殖活性具有重要意义, 利用流式细胞术进行 DNA 含量测定是细胞周期分析的重要手段, 目前仍然是广泛使用的方法之一。应用细胞流式技术进行细胞周期检测, 其结果不仅受样品固有性、样品的处理方法及荧光染色的影响, 而且受分析方法的影响。目前, 用于检测细胞周期的染料种类较多, 其中碘化丙啶 (PI) 是常用染料, 但嵌入到双链 DNA 和 RNA 的碱基对与之结合, 无碱基特异性, 因此染色前必须用核糖核酸酶 A 处理细胞, 排除双链 RNA 的干扰^[1-2]。4,6-联脲-2-苯基吲哚 (DAPI) 是 DNA 特异性的荧光染料, 与 DNA 结合是非嵌入式的, 主要结合在 A-T 碱基区, 使用时无需用 RNaseA 处理细胞, 但由于配置紫外激光源的流式细胞仪非常昂贵, 大多数实验室都没有配备。因此, 利用 DAPI 标记 DNA 分析细胞周期的方法尚未成为常规检测方法被普遍采纳, 也没有简单的标准实验流程可供参考^[3-4]。笔者采用 DAPI 标记 BHK-21 细胞, 探索简便易行的 DNA 检测技术, 检测细胞周期中各期的 DNA 含量, 以及时预测规模化培养细胞培养细胞增殖活性的情况, 为规模化细胞培养的检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 NucleoCounter NC-3000 自动化全光谱定量细胞成像分析仪、DAPI 试剂盒, 均为 Chemometec 公司产品; 细胞计数仪, 为 INNOVATIS 产品; 悬浮培养细胞 BHK-21, 为中农威特生物科技股份有限公司驯化并保存。

1.2 样品的制备 将生长状态良好的 BHK-21 细胞进行传代批次培养。取生长状态良好的细胞, 以 4×10^5 个/ml 的密度接种于含 200 ml 培养基的细胞培养三角瓶中, 于 37 °C 条件下 150 r/min 培养。培养过程中, 分别在 24、48、60 h 对细

胞取样, 并进行细胞形态观察, 检测细胞浓度和细胞活力。将样品用 PBS 冲洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。用冰冻的 70% 无水乙醇固定, 置于 4 °C 条件下备用。

1.3 染色与上机检测 将处理好的细胞样品, 每份悬浮于 0.5 ml DAPI 染色液中, 37 °C 避光染色 5 min, 取适量染色后的细胞样加入到 NC-Slide A8 的检测室中, 将上样后的 NC-Slide A8 放置于 NC3000 主机的托盘中, 进行上机检测。

2 结果与分析

2.1 细胞形态 在显微镜下观察细胞形态发现, 大多数细胞散在分布, 单个细胞透亮, 边缘光滑, 形态长良好。

2.2 细胞生长浓度与活性 在起始浓度为 4×10^5 个/ml, 经过一段时间培养, 0~48 h 内细胞密度逐渐呈上升趋势, 48 h 后继续培养, 细胞浓度逐渐呈下降趋势 (图 1); 细胞活性先有所增加, 达到最大值后呈下降趋势, 直至细胞大部分死亡 (图 2)。

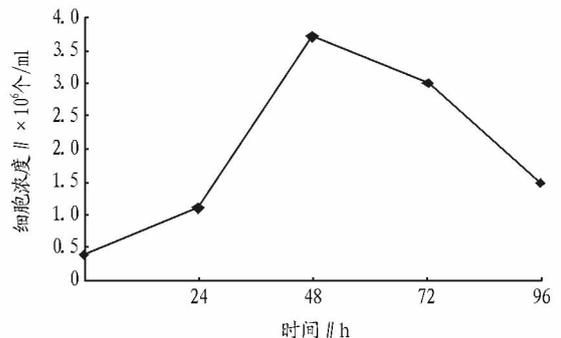


图 1 批次培养 BHK-21 细胞浓度的变化

2.3 细胞周期分析 将 DAPI 染色后的 BHK-21 细胞上机进行检测, 经 NC-3000 系统对细胞进行细胞周期分析, 结果表明, 48 h 以前 S 期和 G2/M 期的 DNA 含量总数呈上升趋势, 大部分细胞逐进入 DNA 合成期; 培养 48 h 后, S 期和 G2/M 期的 DNA 含量总数明显呈下降趋势 (图 3)。

基金项目 甘肃省科技计划项目 (1008FCCA006)。

作者简介 俞宗佑 (1984-), 男, 甘肃兰州人, 助理研究员, 硕士, 从事疫苗的研发与应用研究。

收稿日期 2015-06-09

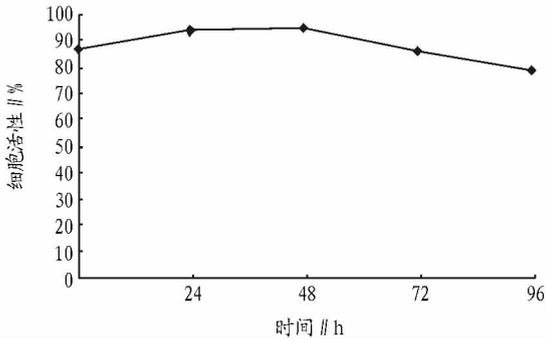
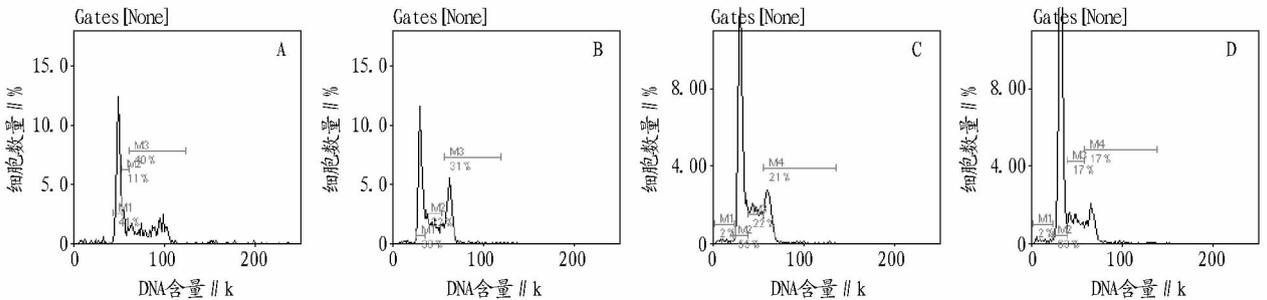


图2 批次培养 BHK-21 细胞活性的变化



注:A.0 h;B.24 h;C.48 h;D.72 h。

图3 BHK-21 细胞培养 0~72 h 细胞周期 DNA 含量的变化

滞于 G0/G1 期,此期细胞明显增多,细胞不能在增殖,表明随着培养时间的延长,细胞培养液中营养物质大量被消耗,同时细胞代谢产生大量副产物,这些因素都严重影响细胞的生长^[6-7]。因此,检测细胞周期可预测下一个阶段细胞生长趋势与增殖情况,为规模化细胞培养提供理论参考。

细胞周期染色方法很多,笔者探讨了 DAPI 标记 BHK-21 细胞,结果表明 DAPI 是一种可靠的 DNA 检测方法,并且其样本制备更简单、易行。这种染料可作为带紫外激光器的分选仪上检测 DNA 的最佳选择。虽然 PI 的 DNA 染色效果好,适用于普通流式细胞仪上检测(488 nm 激发),但由于其具有毒性,污染后不易清除且不能标记活体细胞等局限性,因此,不适用于在分选仪上检测^[8-9]。

笔者借助 NC-3000 自动化全光谱定量细胞成像分析仪所建立的 DAPI 染色法简单易行,不必加通透剂,也不分离核,是一种适用于多参数分析的检测细胞 DNA 含量的方法,而且实验流程更简单、快速,可作为具备紫外激光器的流式细胞仪上首选的 DNA 荧光染料。能够准确检测细胞周期,为规模化细胞培养过程中监控细胞生长状态提供一种良好

3 讨论

细胞浓度与细胞活力都是监测细胞质量好坏的重要指标^[5]。该试验细胞周期检测结果表明,在细胞培养到 48 h,细胞 S 期和 G2/M 期含量逐渐呈上升趋势,并达到最高值,同时这一培养时间内细胞密度也达到最大值,且细胞活力高达 95% 以上,二者的检测结果相一致。该试验结果表明细胞培养开始阶段,培养液中营养丰富,细胞在较低密度下生长,代谢活跃,大部分处在 G0/G1 期,为下一阶段 DNA 合成 S 期贮备足够营养物质和能量,随着培养时间的延长,细胞逐渐向 DNA 合成期过渡,完成 DNA 合成,最后进入 G2/M,细胞开始分裂增殖。该试验中细胞生长到 72 h,大部分细胞被阻

的检测方法。

参考文献

- [1] 刘锡娟,丁慧荣,张宏. 用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法检测 DNA 的流式细胞方法探讨[J]. 北京大学学报:医学版,2010,42(4):480-484.
- [2] 贾永蕊. 流式细胞术在 DNA 检测中的应用[J]. 中国医学装备,2010,7(4):4-6.
- [3] 闫虹. 流式细胞术的临床应用[J]. 医学检验与临床,2008,19(5):4-6.
- [4] CAMPLEJOHN R S, MACARTNERY J C, MORRIS R W, et al. Measurement of phase fractions in lymphoid tissue comparing fresh versus paraffin embedded tissue and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride versus propidium iodide staining[J]. Cytometry, 1989, 10(4):410-416.
- [5] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. Circ Res, 2004, 95(4):343-353.
- [6] KRISHAN A, DANDEKAR P D. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(8):1033-1036.
- [7] KAPUSCINSKI J. DAPI: a DNA-specific fluorescence probe[J]. Bio-tech Histochem, 1995, 70(5):220-223.
- [8] MCLINTIRE T L, GOLGDEY S H, BENSON N A, et al. Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin fixed lymphoid tissues[J]. Cytometry, 1987, 8(5):474-478.
- [9] FENG Y D, TAO D D, QIN J C, et al. A novel three-parameter flow cytometric analysis for cell cycle[J]. Chin Gem J Clinic Oncol, 2005, 4(2):76-82.
- [10] 刘锡娟,丁慧荣,张宏. 用 DAPI 和 Hoechst33342 染色法检测 DNA 的流式细胞方法探讨[J]. 北京大学学报:医学版,2010,42(4):480-484.
- [11] 贾永蕊. 流式细胞术在 DNA 检测中的应用[J]. 中国医学装备,2010,7(4):4-6.
- [12] 闫虹. 流式细胞术的临床应用[J]. 医学检验与临床,2008,19(5):4-6.
- [13] CAMPLEJOHN R S, MACARTNERY J C, MORRIS R W, et al. Measurement of phase fractions in lymphoid tissue comparing fresh versus paraffin embedded tissue and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride versus propidium iodide staining[J]. Cytometry, 1989, 10(4):410-416.
- [14] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. Circ Res, 2004, 95(4):343-353.
- [15] KRISHAN A, DANDEKAR P D. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(8):1033-1036.
- [16] KAPUSCINSKI J. DAPI: a DNA-specific fluorescence probe[J]. Bio-tech Histochem, 1995, 70(5):220-223.
- [17] MCLINTIRE T L, GOLGDEY S H, BENSON N A, et al. Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin fixed lymphoid tissues[J]. Cytometry, 1987, 8(5):474-478.
- [18] FENG Y D, TAO D D, QIN J C, et al. A novel three-parameter flow cytometric analysis for cell cycle[J]. Chin Gem J Clinic Oncol, 2005, 4(2):76-82.
- [19] WANG Y H, LEBLANC G A. Interactions of methyl farnesoate and related compounds with a crustacean retinoid X receptor[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 309(1):109-116.
- [20] GIBBS P, BRYAN G. Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1986, 66(4):767-777.
- [21] BRYAN G, GIBBS P, BURT G. A Comparison of the effectiveness of tributyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1988, 68(4):733-744.
- [22] HORIGUCHI T, KOJIMA M, HAMADA F, et al. Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations[J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(S1):13.

(上接第 142 页)