

不同周期 Sf9 细胞琥珀酸脱氢酶酶活的研究

张佑红,陈 龙,靖志强,郑 伟,陈 林,秦 琴

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:为了研究不同周期 Sf9 细胞线粒体琥珀酸脱氢酶酶活的差异,首先使用 TdR(胸腺嘧啶核苷)双阻断法将 Sf9 细胞同步化于 G1/S 期,恢复生长分别得到 S、G2/M、G1 期的细胞,然后利用 MTT 法检测不同细胞周期的 Sf9 细胞琥珀酸脱氢酶酶活,发现处于 G1 期的细胞酶活比 S、G2/M 期的细胞酶活大,跟踪细胞成长,在不同的时间点采样,以 MTT 法检测琥珀酸脱氢酶酶活,发现接种后 48 h 的 Sf9 细胞酶活最大,此时与其他时刻相比的 Sf9 细胞处于 G1、S 期所占的比例最大。

关键词:细胞周期;琥珀酸脱氢酶;MTT 法

中图分类号:Q554¹.3 **文献标识码:**A

0 引 言

MTT 法的基本原理是活细胞的线粒体琥珀酸脱氢酶能将染 MTT(四甲基偶氮唑盐)转变为不溶的紫色甲臞颗粒,后者的生成量与细胞数目和细胞活性呈正相关,用二甲亚砜(DMSO)溶解所生成的甲臞,通过酶标仪检测 OD 值变化,可间接反映细胞生长及增殖活性^[1-5]。由于该法稳定客观,没有放射性损伤和污染问题,所以常被用来推测活细胞的数目,了解药物抑制或杀伤肿瘤细胞的能力或推算病毒滴度^[6-9]。

在活细胞数量相等而细胞生长状态却不同的情况下 OD 值是否还会一样,即在细胞生长活力不同的情况下线粒体内琥珀酸脱氢酶的酶活是否相同。因此笔者设计了以下两个实验:1. 利用细胞周期同步化方法先将 Sf-9 细胞同步化于 G1/S 期,在恢复生长不同的时间段分别得到 S、G2/M、G1 期的细胞,然后使用 MTT 法测三个周期内细胞的 OD 值。2. 在一条细胞生长曲线上的潜伏期,指数生长期,平稳期,衰亡期分别采样,以 MTT 法测 OD 值来判断其酶活大小。同时,通过 FCM 检测每个样 G1、S、G2/M 的周期分布,以进一步研究细胞周期对琥珀酸脱氢酶活的影响。

1 实验部分

1.1 细胞

草地夜蛾细胞(Sf9)购于中国典型培养物保藏

中心。

1.2 试剂及仪器

Grace's 培养基、胎牛血清均购于 GIBCO 公司。胸腺嘧啶核苷为北京欣经科生物技术有限公司产品。Multiskan MK3 酶标仪由热电仪器有限公司生产。BECKMAN 公司 EPIC5 ALTRA II 型流式细胞仪。

1.3 细胞培养

Sf9 细胞以 Grace's 培养基(含体积分数为 10%胎牛血清)贴壁传代培养。待细胞生长良好时转入摇瓶培养(27℃,80 r/min)。接种浓度为 1.5×10^5 个/mL,细胞存活率>95%。

1.4 MTT 法测酶活

用体积分数为 10%胎牛血清的 Grace's 培养液将 Sf9 细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,调整设置接种细胞数目在 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/孔之间(例如 5.0×10^4 、 3.5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.5×10^4),并设培养液空白组。同时每孔加入 30 μ L (5 mg/mL)MTT。置 27℃培养箱振荡培养 4 h,平板离心机 2 000 r/min 离心 10 min 后弃上清。加 100 μ L 二甲基亚砜振荡 10 min,在酶标仪上 570 nm 处测 OD 值。

1.5 细胞周期同步化方法

采用胸腺嘧啶核苷双阻断法阻断细胞于 G1/S 期之间(Sf9 细胞大概需要 6 h 穿过 G1 期,6~7 h 跨过 S 期,6~7 h 走过 G2/M 期)^[10]。简要步骤如下:取处于对数生长期的 Sf9 细胞加入胸腺嘧

啉核苷(Thymidine)至其终浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 16 h, 1000 r/min 离心 10 min 后弃去培养液, 以 PBS 液清洗细胞后加入新鲜培养液培 10 h, 再次加入胸腺嘧啶核苷至其终浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 16 h, 弃去培养液, 以 PBS 液清洗细胞后加入新鲜培养液恢复生长。

1.6 流式细胞仪检测样品的制备及流式测试

所有样品均从摇瓶中吸取 0.8 mL 的细胞悬液, 离心弃上清, 先加入 BECKMAN 公司 PI 试剂盒中的 DNA PREP LPR 100 μL 于微型漩涡混合仪上混匀 10 s, 再加入 DNA PREP Stain 1 mL 同样置于微型漩涡混合仪上混匀 10 s, 然后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。上流式前从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内取出样品, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min。异于正常 Sf9 细胞大小的物质与粘黏的细胞被排除在“门”之外。每个样品至少计数 1×10^4 个细胞以上。对 DNA 直方图的分析采用 ModFit 软件。

2 结果与讨论

2.1 不同细胞周期 Sf9 细胞酶活的测定

图 1 表示出以 MTT 法检测不同细胞周期 Sf9 细胞的 OD 值。Sf9 细胞经过胸腺嘧啶核苷双阻断法同步化后, 经流式检测其同步化率为 91.2%。然后从 0 h 开始释放, 分别在释放后 1 h、7 h、15 h 从摇瓶内采样做 MTT。图 1 中三个期的直线方程分别如下。G1: $y=0.010\ 3\ x+0.017\ 8, R^2=0.998\ 5$; S: $y=0.008\ 4\ x+0.026\ 4, R^2=0.9934$; G2/M: $y=0.0064x+0.0211, R^2=0.992\ 4$ 。图 1 说明, 在相对细胞数量相等的情况下, 代表 G1 期直线的斜率>代表 S 期直线的斜率>代表 G2/M 期直线的斜率, 这一结果表明 G1 期的细胞酶活是最大的。

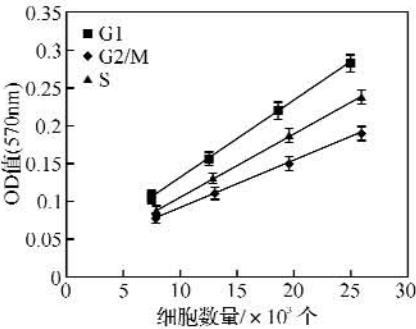


图 1 MTT 法测不同细胞周期 Sf9 细胞 OD 值
Fig. 1 OD value of Sf9 cells at different cell cycles using MTT

2.2 不同生长周期 Sf9 细胞酶活的测定

图 2 为 Sf9 细胞生长曲线, 从接种 0 h 开始, 每隔 24 h 采样进行细胞计数, 取三次计数的平均值。

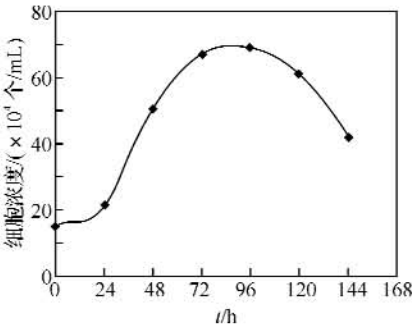


图 2 Sf9 细胞生长曲线
Fig. 2 The concentration of Sf9 cells in different growth phase

图 3 表示用 MTT 法测不同生长周期 Sf9 细胞的 OD 值。Sf9 细胞接种 24 h 后(图 2), 开始采样并以 MTT 法测 OD 值(此时细胞处于对数生长期初期), 以后每隔 24 h 采样做 MTT 直至细胞进入衰亡期。图 3 中代表各个时期的直线方程分别如下。24 h: $y=0.006\ 2x+0.007\ 4, R^2=0.998\ 2$; 48 h: $y=0.009\ 5x+0.012\ 1, R^2=0.997\ 3$; 72 h: $y=0.006\ 3x+0.026\ 2, R^2=0.999\ 6$; 96 h: $y=0.005\ 5x+0.013\ 4, R^2=0.994\ 7$ 。从图 3 上的直线以及直线方程可知接种后 48 h 时, 也就是细胞处于指数生长中期时的直线斜率最大, 即此时的细胞酶活是最大的。

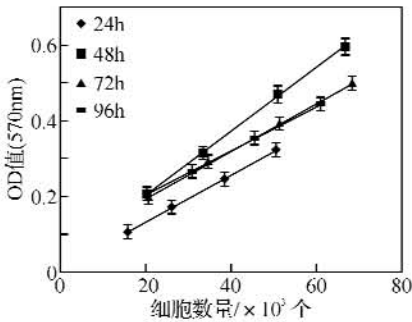


图 3 MTT 法测不同生长周期 Sf9 细胞 OD 值
Fig. 3 OD value of Sf9 cells at different hours of growth curve

2.3 Sf9 细胞周期分布的测定

自接种 24 h 开始每隔 24 h 采样, 进行流式的样品制备及流式测试与分析。具体的流式分析数据如表 1 所示。

表 1 Sf9 细胞周期分布

Table 1 Distribution of Sf9 cell cycles at different time of growth			
t/h	G1 期/%	S 期/%	G2/M 期/%
24	16.90	38.20	44.90
48	18.40	45.80	35.80
72	9.88	32.10	58.02
96	11.60	20.00	68.40

从表 1 可知, 在接种后 48 h 处的 Sf9 细胞处

在 G1 和 S 期所占的比例相对于其它时间点是最大的。

MTT 法被广泛应用到细胞生物学、生物医学等的诸多领域中,虽然该法具有操作简便、快速、准确、廉价及不使用同位素等优点,但重复性不高这一缺点也较为明显。即在实验过程中,人为操作或环境因素的稍稍改变均会对最后的结果造成较大影响。

因此,为了得到真实、可信的实验结果,笔者多次重复本实验并发现:在实验 2.1 中,所有的数据均显示出琥珀酸脱氢酶酶活(以时期表示)为 $G1 > S > G2/M$ 这一规律。而在实验 2.2 中,接种后 48 h 时的细胞酶活明显大于其他时间的细胞酶活,同时,通过 FCM 分析我们发现此时处于 G1 和 S 期的细胞相对其他时间处于 G1 和 S 期的细胞最多,这一现象正好和实验 2.3 的结论相互印证。

3 结 语

实验证明,G1 期的细胞琥珀酸脱氢酶酶活要大于 S 期的细胞酶活,S 期的细胞酶活又大于 G2/M 期的细胞酶活,相应的,位于接种后 48 h 的细胞酶活最大,而此时正处于指数生长期中生长最旺盛的时期,其处于 G1、S 期的细胞所占比例相对于其它时间处于 G1、S 期的细胞为最大。因此,证明了不同周期 Sf9 细胞与其琥珀酸脱氢酶酶活之间存在着紧密联系。

参考文献:

- [1] Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, et al. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 80: 133-138.
- [2] Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells[J]. *Colloids Surf B*, 2005, 45: 108-111.
- [3] Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolara R, et al. MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 195: 193-199.
- [4] Petty R D, Sutherland L A, Hunter E M, et al. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number [J]. *J Biolumin Chemilumin*, 1995, 10: 29-34.
- [5] Nakamura R, Saikawa Y, Kubota T, et al. Role of the MTT chemosensitivity test in the prognosis of gastric cancer patients after postoperative adjuvant chemotherapy [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26: 1433-1437.
- [6] Denise I B, Campagnoli R P. Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes [J]. *Avian Dis*, 1992, 36(4): 1022-1027.
- [7] Beatriz H K, Celis H. Effects of short-term zidovudine exposure on mitochondrial DNA content and succinate dehydrogenase activity of rat skeletal muscle cells [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2008, 268: 33-39.
- [8] Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation [J]. *Science*, 2003, 299: 700-704.
- [9] Gayle J P, Jeanne B L. BRCA1 foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin [J]. *J Cell Biol*, 2006, 175(5): 693-701.
- [10] Braunagel S C, Parr R, Belyavskiy M, et al. Autographa californica Nuclopolyhedrovirus Infection Results in Sf9 Cell Cycle Arrest at G2/M Phase [J]. *Virology*, 1998, 244: 195-211.

(下转第 63 页)