

## STUDY ON CLONAL CULTURE OF HUMAN NK CELLS

ZHANG Cai TIAN Zhi Gang

(Shandong Cancer Biotherapy Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

### ABSTRACT

The clonal culture condition of human NK cells was explored. Human NK cells were expanded from peripheral blood mononuclear cells by cultured with 1000u/ml IL-2 and then purified by complement dependent cytotoxicity(CDC) method to removing T cells. By limited dilution, single NK cell was cultured with allo-PBMC or auto-PBMC(feeder cells) in medium containing rhIL-2, PHA and lymphocyte conditioned medium (LCM). Then cloned cells were collected and identified. Our results indicated that: 4-16 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK clones(containing  $2.35 \times 10^4$  cells at most) can be obtained in per 96-well plate. The best cultural condition is : Mitomycin C(25 $\mu$ g/ml) as a feeder cell inhibitor, 0.5 or 1 NK cell cultured with feeder cells in medium containing rhIL-2 200u/ml, PHA 10 $\mu$ g/ml and 10% LCM.

**Key Words:** NK cell Clonal culture

## 衣藻细胞玻璃化超低温保存技术的研究\*

项黎新 邵健忠

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

细胞的玻璃化超低温保存是 80 年代中后期兴起的新技术, 由于其具有操作简捷、对细胞损伤小等优点而倍受关注。但目前有关该技术的研究和应用主要见诸于动物和高等植物<sup>[1-4]</sup>, 藻类中尚未见报道。近年来, 随着藻类在医药、化工和生物技术等领域研究和应用的不断深入, 藻类的种质保存显得十分迫切。但目前有关该领域的研究还较少, 多数实验室采用反复传代的保种方法费时费力, 且易造成遗传突变。本文以衣藻为材料, 初步建立其玻璃化超低温保存方法, 以期为藻类的种质保存研究积累资料。

### 材料和方法

#### 1. 衣藻及其培养方法

野生型莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*), 引自中国农业科学院生物技术中心。参照 Harris 等方法<sup>[5]</sup>, 将衣藻接种于 TAP 培养基, 25℃ 光照培养, 光

照强度 4000Lx。

#### 2. 衣藻的玻璃化超低温冻存

(1) 保护剂 参照 Sakai 等配方并作改进<sup>[6]</sup>, 即 TAP 培养基附加 30% (W/V) 甘油、15% (W/V) 乙二醇、15% (W/V) 二甲亚砷和 0.5mol/L 蔗糖溶液。

(2) 保护剂处理时间对衣藻活性的影响 取对数生长期衣藻 5ml, 经离心浓缩后加 0℃ 预冷的保护剂 1ml, 置冰浴中分别脱水处理 2.5、5、7.5 和 10 分钟后, 离心洗去保护剂, 测定衣藻细胞的存活率, 同时设不加保护剂处理组为对照。

(3) 玻璃化冻存前预培养 取对数生长期衣藻 5ml, 经离心浓缩后, 加入含 0.25mol/L 蔗糖的 TAP 培养基, 光照培养 1 天, 再加含 0.5 mol/L 蔗糖的 TAP 培养基, 继续光照培养 1 天。

(4) 玻璃化冻存 预培养的衣藻经离心浓缩后

本文 1999 年 11 月 4 日收到, 2000 年 3 月 3 日接受。

\* 国家自然科学基金资助项目(39970589 号)。

胡群同志参加部分工作, 王君晖博士、毛树坚教授和钱凯先教授给予大力帮助, 谨致谢忱。

加0℃预冷的保护剂1ml,置冰浴中分别脱水处理0.2、5、7.5、和10分钟后,分装于冷冻管内,每管0.5ml,直接投入液氮中冻存。

(5) 解冻和洗涤 经液氮贮存2天后的衣藻,在40℃水浴中快速解冻,然后用含1.2mol/L山梨醇或1.0mol/L蔗糖的TAP培养基,25℃洗涤10分钟。

### 3. 冻存后衣藻的恢复培养

(1) 直接光照培养 将解冻和洗涤后的衣藻接入含0.5 mol/L蔗糖的TAP培养基,光照培养1天后,接入TAP培养基,继续培养。

(2) 暗培养过渡后光照培养 将解冻和洗涤后的衣藻接入含0.5 mol/L蔗糖的TAP培养基,黑暗条件下培养1天后,接入TAP培养基,继续暗培养1天,再转入光照培养。

### 4. 恢复培养后衣藻的生长曲线测定

取恢复培养后正常生长的衣藻细胞,接入TAP培养基,定时测定细胞浓度,制备生长曲线图,并以未经冻存的衣藻作对照。

### 5. 衣藻细胞存活率测定

(1) TTC法(氯化三苯四氮唑还原法) 参照Towill等方法进行<sup>[7]</sup>。经解冻和洗涤的衣藻细胞,首

先置岛津UV-265分光光度仪上,用420nm波长测定细胞浓度( $OD_{420nm}$ ),然后离心沉淀,加入TTC反应液作用12小时,再用PBS清洗,加入95%酒精抽提6小时,离心取上清,用485nm波长测定光吸收值( $OD_{485nm}$ )。按 $OD_{485nm}/OD_{420nm}$ 计算单位细胞数的TTC反应值,将此值与未经保护剂处理或未经冻存的对照样品作比较,计算衣藻的相对存活率。

(2) 双色荧光染色法 参照黄纯农等方法进行<sup>[8,9]</sup>。将衣藻置Olympus VANOX万能显微镜下,先用相差镜统计细胞数量,然后用FDA-PI双色荧光染料染色,置落射荧光镜下,统计发绿色荧光的活细胞数或细胞核呈桔黄色的死细胞数,计算存活率。

## 结 果

### 1. 玻璃化超低温冷冻保护剂对衣藻细胞活性的影响

实验结果显示,玻璃化超低温冷冻保护剂对衣藻细胞有一定的毒性,其毒性随作用时间的延长而增强,较适作用时间为2.5-7.5分钟,否则细胞存活率较低(表1)。

表1 玻璃化超低温冷冻保护剂对衣藻细胞活性的影响

作用时间(min)	$OD_{420nm}^*$	$OD_{485nm}^*$	$OD_{485nm}/OD_{420nm}^*$	TTC存活率(%)**
0(对照) <sup>#</sup>	0.428	0.371	0.867	-
2.5	0.397	0.269	0.678	78.17±4.37
5	0.360	0.211	0.586	67.61±4.46
7.5	0.397	0.177	0.446	51.43±4.12
10	0.452	0.145	0.321	37.01±2.18

<sup>#</sup> 未经保护剂处理; \* 均数(X); \*\* 与对照相比较( $X \pm SD, n=5$ )。

表2 玻璃化超低温冷冻保存后衣藻细胞存活率的测定

组别 <sup>#</sup>	TTC还原法				双色荧光染色法		
	$OD_{420nm}^*$	$OD_{485nm}^*$	$OD_{485nm}/OD_{420nm}^*$	存活率(%)**	统计细胞数	活细胞数	存活率(%)
对照	0.428	0.371	0.867	-	220	216	98.18
0min	0.202	0.017	0.084	9.69±0.82	250	2	0.80
2.5min	0.208	0.026	0.125	14.42±1.44	250	21	8.40
5min	0.218	0.056	0.256	29.53±3.46	230	65	28.26
7.5min	0.182	0.037	0.203	23.41±2.34	230	50	21.74
10min	0.244	0.036	0.148	17.07±1.32	260	28	10.77

<sup>#</sup> 对照组未经保护剂脱水和冷冻处理,其余为脱水不同时间后冷冻的实验组; \* 均数(X); \*\* 与对照组相比较( $X \pm SD, n=5$ )。

## 2. 玻璃化超低温冻存后衣藻细胞的存活率测定及其恢复培养观察

(1) 存活率测定 衣藻细胞从液氮中取出后,分别用 TTC 法和双色荧光染色法进行存活率测定。两种方法所得结果均显示,衣藻细胞经玻璃化冻存后的存活率随保护剂脱水时间的不同而不同,脱水时间太短,由于保护剂渗入不足,存活率低。反之,脱水时间太长,由于保护剂毒性的增加,存活率也相应降低。由表 2 结果可知,衣藻细胞在保护剂中的脱水时间为 5 分钟时,其存活率较高。

(2) 恢复培养观察 实验结果显示,经玻璃化冻存后的衣藻细胞在含 0.5mol/L 蔗糖的 TAP 培养基中过渡后,转入 TAP 培养基,除脱水时间为 0 分钟,暗培养过渡的衣藻和脱水时间为 0、2.5、10 分钟,直接光照培养的衣藻细胞未恢复正常生长外,其余各组细胞约两周后陆续恢复正常生长。在恢复生长的各组细胞中,采用暗培养过渡的细胞,其存活率均高于直接光照培养的细胞,其中脱水时间为 5 分钟并采用暗培养过渡的细胞,其存活率最高,恢复生长较快(表 3)。

表 3 冻存后暗条件恢复培养与直接光照培养对衣藻存活率的影响

脱水时间 (min)	未冻存对照组	暗培养过渡组		直接光照培养组	
	OD <sub>485nm</sub> /OD <sub>420nm</sub> *	OD <sub>485nm</sub> /OD <sub>420nm</sub> *	TTC 存活率**	OD <sub>485nm</sub> /OD <sub>420nm</sub> *	TTC 存活率**
-	0.8668	-	-	-	-
0	-	0.0740	8.54±0.43	0.0608	7.01±0.38
2.5	-	0.1318	15.21±0.46	0.0514	5.93±0.31
5.0	-	0.2726	31.45±0.52	0.0703	8.11±0.57
7.5	-	0.1845	21.29±0.32	0.0624	7.20±0.48
10.0	-	0.0966	11.14±0.28	0.0538	6.21±0.51

\* 均数(X); \*\* 与对照组比较(X±SD, n=5)。

## 3. 恢复培养后衣藻细胞的生长曲线测定

恢复生长后培养的衣藻细胞,其生长曲线测定结果见图 1。结果表明,其生长规律与未冻存的衣藻细胞相一致。

的脱水步骤,且对环境的温度、湿度等也有很高的要求。因此,对藻类超低温保存技术仍需进一步探索和完善。

本文研究结果显示,玻璃化超低温冻存技术应用于藻类的种质保存是可行的。其中玻璃

## 讨 论

玻璃化超低温保存技术是将生物样品经玻璃化保护剂脱水后,直接投入液氮,使细胞内外在快速降温时进入一种均一的无定型形态,细胞内的水不转变成冰,而是形成过冷液体,并最终固化成玻璃态,这是一种对细胞冷冻损伤最小的状态<sup>[10]</sup>。由于玻璃化冻存法具有快捷、细胞存活率高等优点,目前已在部分动物和高等植物中进行了深入研究,但藻类细胞的玻璃化冻存技术尚未见报道。在藻类细胞的超低温冻存技术方面,1996 年以来, Hirata 等曾报道了藻酸钙包埋脱水法保存部分绿藻和蓝藻等的研究<sup>[11,12]</sup>,但该方法操作程序较为复杂,有严格

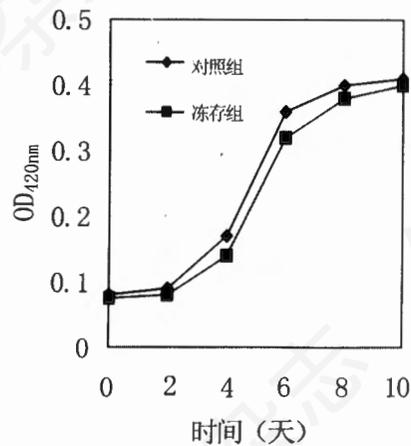


图 1 衣藻细胞的生长曲线测定

化超低温冷冻保护剂的选择和冻存前的预培养条件可以借鉴高等植物的方法<sup>[3,4]</sup>,衣藻在保护剂中的脱水时间应掌握在 5 分钟,时间太短,保护性成分渗入不足;太长则保护剂对细胞的化学损伤增加,从而影响存活率。此外,冻存后先经暗培养过渡,再转入光照培养能提高衣藻的存活率,其机理值得作进一步探讨。

### 摘 要

本研究以衣藻为材料,探讨其玻璃化超低温保存的条件和方法,结果表明,衣藻经含 0.25mol/L 蔗糖溶液的 TAP 培养基预培养一天后,在玻璃化冷冻保护剂中脱水 5 分钟,直接投入液氮,48 小时后快速化冻,去保护剂并用含 0.5mol/L 蔗糖溶液的 TAP 培养基暗培养一天,再转到 TAP 培养基暗培养一天,最后置光照条件下恢复培养,其存活率可达 31.45%,恢

复培养后衣藻细胞的生长规律与未冻存的衣藻相一致。

关键词:衣藻 玻璃化 超低温保存

### 参 考 文 献

- [ 1 ]Langis R. , et al. ,1989, *Cryo-letters* ,**10**:412 - 428.
- [ 2 ]Uragmi A. , et al. ,1989, *Plant Cell Rep.* ,**8**:418 - 421.
- [ 3 ]王君晖等,1996, *植物学报* ,**38**(9):730 - 734.
- [ 4 ]王君晖等,1996, *科学通报* ,**41**(22):2081 - 2084.
- [ 5 ]Harris E. ,1989, *A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, *Academic Press*.
- [ 6 ]Sakai A. , et al. ,1990, *Plant Cell Rep.* ,**9**:30 - 33.
- [ 7 ]Towill I. , et al. ,1992, *Plant Cell Rep.* ,**11**:175 - 178.
- [ 8 ]黄纯农等,1988, *细胞生物学杂志* ,**10**(3):133 - 135.
- [ 9 ]Huang C N. , et al. ,1986, *Protoplasma* ,**135**:80 - 87.
- [ 10 ]Rall W F. , et al. ,1985, *Nature* ,**313**:573 - 575.
- [ 11 ]Hirata K. , et al. ,1996, *Cryo-letters* ,**17**:321 - 328.
- [ 12 ]Vigneron T. , et al. ,1997, *Cryo-letters* ,**18**:93 - 98.

## CRYOPRESERVATION OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BY VITRIFICATION

XIANG Li Xin SHAO Jian Zhong

(College of Life Science, Zhejiang university, Hangzhou, 310012)

### ABSTRACT

A cryopreservation procedure was developed for *Chlamydomonas reinhardtii* by vitrification technique. The *Chlamydomonas reinhardtii* cells were pre-cultured in medium TAP supplemented with 0.25mol/L sucrose for one day, and dehydrated in vitrification anti-freeze protective material for 5 min, then directly immersed in liquid nitrogen. After 48 hours, thawing was performed in a water bath at 40°C for 2 min, and the cells were recovered darkly in medium TAP which contained 0.5mol/L sucrose and in medium TAP which was free of sucrose for one day respectively, and then recovered in light for about two weeks. Viability of the recovered cells was 31.45%. The growth role of the cryopreserved *Chlamydomonas reinhardtii* cells was consistent with that of uncryopreserved cells.

**Key words:** *Chlamydomonas reinhardtii* Vitrification Cryopreservation

**联合基因科技(集团)有限公司**是我国最早致力于大规模基因克隆、测序、基因功能研究和基因药物开发与生产的生物高新技术企业,是中国最大规模基因组研究、开发、应用企业。

到目前为止,获得了 12000 多条人类全长新基因,其中近 8000 条是国际公开数据库中不存在的新基因,全长新基因数量居世界第二位,建有包含 50 多万条 EST,47000 组 Unigene,15000 多条人类全长基因的基因数据库和克隆库,同时申请了多项基因药物发明专利,其中 800 余项已进入国际申请阶段,这些基因中包括肿瘤相关基因、肥胖基因受体相关基因、高血压血管紧张素相关基因及老年痴呆症相关基因等极具临床应用和药物开发前景的重要功能基因。

(中华基因网)