

经验交流

低温冰箱保存细胞的经验介绍

郭淑芳 陈文凯

(武汉, 湖北医学院病毒研究所 430071)

用作为培养细胞的保存方法, 国内外多用液氮保存^[1], 但有些实验室则采用低温冰箱保存。至于后者保存细胞的有效性(细胞存活效果), 由于细胞种类的不同, 则有不同结果。现将本单位采用低温冰箱保存细胞的有关经验及效果报道于后。

细胞有二倍体人胚肺细胞(HEL), 传代细胞系 Hep-2、Hela、MA 104(恒河猴 胚肾细胞传代株), 按常规将细胞用胰酶消化^[2], 生长液洗涤一次, 加冻存液, 并将细胞数用冻存液调整到 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 以 1—2 ml/瓶(小青霉素瓶)分装冻存。冻存液系含 10% 胎牛血清或 20% 小牛血清, 保护剂 10% DMSO 或 12% 甘油及适量抗菌素的 Ealeg's 培养液。冻存时将分装瓶直接放入 -70°C 冰箱内进行快速冻存; 或先置 4°C 冰箱 4 小时, -20°C 冰箱过夜, 再转入 -70°C 冰箱(缓慢冻存)^[3]。结果表明上述两种保护剂, 两种血清及两种冻存方式的有效性大致相同(表 1、2、3)。二倍体细胞 HEL 及传代细胞系的冻存效果及两者的比较见表 4。两者的存活均为可达到 12—21 个月, 复苏后继续生长, 传代细胞系数较原代细胞的复苏后生长速度快。根据本实验按常规对活细胞计数^[3], 活细胞数量越多, 复苏后生长越快。至于冻存的最大有效时限尚需进一步累积经验。

本文介绍了用低温冰箱保存细胞的经验: 保护液用 10% DMSO 或 12% 的甘油, 培养液为 Ealeg's 液, 辅助以 10% 胎牛血清或 20% 小牛血清及适量抗菌素。将由冻存液分装的细胞

表 1 两种保护剂对 HEL 冻存复苏的影响*

保护剂	浓度(%)	活细胞数(/ml)
DMSO	10	1.4×10^6
甘油	12	1.36×10^6

* 所用血清相同。

表 2 胎牛血清及小牛血清对 HEL 冻存复苏的影响*

牛血清	浓度(%)	活细胞数(/ml)
胎牛血清	10	1.33×10^6
小牛血清	20	1.4×10^6

* 所用保护剂相同。

表 3 冻存方式对细胞冻存复苏的影响*

冻存方式	活细胞数(/ml)
快速	1.4×10^6
缓慢	1.38×10^6

* 所用血清和保护剂相同。

表 4 二倍体细胞 HEL 与传代细胞冻存效果的比较*

细胞名称	冻存时间(月)	接种的活细胞数(/ml)	瓶底面积 $3 \times 6 \text{ cm}^2$
			长成单层的时间(天)
HEL	3	6.5×10^5	2
HEL	4	5×10^5	2—3
HEL	6	4×10^5	3—4
HEL	10	2.5×10^5	5—6
HEL	16	1.5×10^5	9
Hela	12	3×10^5	3
MA ₁₀₄	12	3×10^5	3
Hep-2	18	2.5×10^5	3
Hep-2	21	2×10^5	4

* 所用保护剂、血清及冻存方式相同。

($2 \times 10^6/\text{ml}$), 直接冻存于 -70°C 冰箱, 二倍体细胞保存时间至少可达 16 个月, 传代细胞至少可达 12 个月(MA₁₀₄)或 21 个月(Hep-2)。

参 考 文 献

[1] 鄂 征等, 1984 年组织培养技术, 第二版,

p. 116-118, 人民卫生出版社。

[2] 黄祯祥等, 1990 年, 医学病毒学基础及实验技术, 第一版, p. 135, 科学出版社。

[3] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978 年, 常见病毒病实验技术, 第一版, p. 72-77, 科学出版社。

琼脂糖胶中 DNA 片段的离心回收

俞 慧 吴亚兰 赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

从琼脂糖电泳中抽提单条限制性酶解的 DNA 片段, 往往是 DNA 重组克隆的关键步骤。目前常用的方法不外是电泳洗脱^[1], 低熔点胶抽提^[2]及酚冷冻萃取^[3]等几种。这些方法一般都要经过酚/氯仿抽提和沉淀浓缩等额外的纯化步骤, 从而导致 DNA 得率降低。

现介绍一种快速简便的一步法, 能有效地从琼脂糖胶带中分离所需 DNA 片段^[4]。其过程主要是: 取一只 Eppendorf 管, 用注射针头在底部穿一小孔, 在管内填上 2—3 mm 厚的硅化玻璃毛, 将该管套在另一只 Eppendorf 管上, 就组成了一个二连系统, 用高压蒸汽灭菌消毒。割下的 DNA 胶带就放入上层 Eppendorf 管内, 6000 rpm 离心 5—10 分钟, 所需 DNA 片段就随胶内水分一起被离心到下层 Eppendorf 管中, 凝胶则受玻璃毛的阻隔而不能下来。以这种方法所得到的 DNA 片段可不必经进一步纯化, 直接用于连接和同位素标记等^[4,5]。若溶液体积过大, 则可采用冰冻抽干来浓缩部分体积后再进行下一步反应。

我们分别用上述离心法和电泳法作了纯化入 DNA Hind III 酶解片段的 23 kb, 9.42 kb, 6.68 kb 三条带的比较。结果, 两者得率相差不多。而对 0.1 kb 至 3 kb 的片段, 离心法回收率可达 90% 以上^[4]。此外, 我们还取 pGEM-7Zf(-) 质粒 1 μg , 经 EcoRI 酶解。在琼脂糖胶上电泳分离后, 分别采用电泳法和离心法纯

化, 其回收情况也与上述结果相一致。然后再将上述两种方法纯化所得的片段分别经 T₄ DNA 连接酶连接后, 转化入原储于 -70°C 的 E. coli JM 105 宿主菌, 转化量相当于 0.1875 μg 初始质粒 DNA。由于感受态宿主菌制备时间太久及其他原因, 转化效率不高, 但用电泳法获得的转化率为 $3.54 \times 10^3/\mu\text{g}$ DNA (663 个菌落), 而离心法所得的转化率为 $2.48 \times 10^3/\mu\text{g}$ DNA (464 个菌落), 两者属同一数量级。由此可见, 离心法确实不失为一种有效易行的胶纯化方法。

参 考 文 献

[1] Perbal, B., 1984, In A Practical Guide to Molecular Cloning, pp. 218-220.

[2] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989, In Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[3] Sealey, P. G. and Southern, E. M., 1989, in Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, ed. by Rickwood, D. and Hames, B. D., pp. 39-76, IRL Press.

[4] D. M. Heery, F. Gannon and R. Powell, 1990, TIG., 6: 173.

[5] Mats L. Ericson, 1990, TIG., 6: 278.