

- [5] Kramer, R. H. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 1980—1983.
- [6] Mareel, M. et al., 1979, *Virch Arch. B.*, 30: 95—111.
- [7] Mareel, M. et al., 1989, *Clin. Expl. Metastasis*, 7: 283—300.
- [8] 高进等, 1982, 中国医学科学院学报, 4: 162—165.
- [9] Carr, I. et al., 1986, *Chin Expl. Metastasis*, 4: 129—132.

## 杂交瘤 116 株细胞无血清培养基的研制

李云宝 姚曾序

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

小鼠杂交瘤 116 株是分泌抗人小细胞肺癌单克隆抗体(IgG<sub>1</sub>)的细胞,于 1987 年本所细胞免疫组建株<sup>[1]</sup>。本文报道研制成功了适合这株细胞长期培养、传代的无血清培养基的配方,从而为从条件培养液中纯化这株杂交瘤所分泌的单抗,提供了方便。

### 材 料 和 方 法

**细胞培养** 常规培养液为基础培养基添加 10% 新生小牛血清, pH 7.0—7.2, 细胞培养瓶或 24 孔塑料板均置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 37°C ± 0.5°C 培养。每次接种细胞的活细胞率在 95% 以上。

**分泌抗体的检测** 用 ELISA 双抗体夹心法, 包括抗体和辣根过氧化物酶标记抗体均为纯化后的羊抗小鼠 IgG 抗血清。反应底物为四甲基联苯胺(上海医科大学化学教研室产制)。检测用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产)。

**无血清培养基成份** 铁传递蛋白、胰岛素、牛血清白蛋白、乙醇胺均 sigma 产品; 硒(分析纯, 本所细胞工程组赠予), 使用前配制成硒酸 10<sup>-4</sup> mol/L 母液。配制液使用超纯水(17 megohm-cm)。

### 结 果 和 讨 论

#### 一、两种基础培养基的比较

选用两种基础培养基, DMEM (sigma 产品) 和 DME/F<sub>12</sub>Ham (sigma 产品), 如不同浓度的小牛血清(cs)培养 116 株细胞。比较培养 72 小时的活细胞数和细胞生长倍数。

从表 1 可见, 116 细胞更适应在以 DMEM

表 1 116 株细胞在两种培养液中生长情况的比较

培养液	活细胞数 × 10 <sup>5</sup> /ml	细胞生长 倍数*
DMF/F <sub>12</sub> Ham + 5% cs	69.8 (67.5, 72)	3.5
DMEM + 5% cs	112.4 (110.7, 114)	5.6
DME/F <sub>12</sub> Ham + 2% cs	34.9 (34.5, 35.2)	1.8
DMEM + 1% cs	37.4 (37.8, 37)	1.9

活细胞数系两瓶活细胞的平均值。

\* 活细胞数除以接种细胞数。

为基础培养基的培养液中生长, 无论血清含量为 5% 或 2% 时, 均见如此情况。另外, 在血清为 1% 时, 细胞虽仍见生长, 但与 5% 血清组相比较, 生长倍数已显著降低, 表明培养液中的血清含量已达到或者接近维持细胞生长、增殖的阈值。

#### 二、促细胞生长因子的选择

选择常用于无血清培养液的添加成分硒酸、铁传递蛋白、胰岛素、乙醇胺和白蛋白<sup>[2-4]</sup>, 分别以不同剂量添加在上一实验的低血清培养液(DMEM + 1% cs)中, 观察细胞生长动态, 结果见表 2—表 6。

从表 2—6 所列结果可见, 在低血清培养液中添加一定量的硒酸, 铁传递蛋白和乙醇胺均有促进 116 细胞生长、增殖的作用, 有效剂量的范围也较大。其中 5 μmol/L 乙醇胺或 50 μg/ml 铁传递蛋白可使 72 小时培养的细胞数高于对照组一倍以上。另外在乙醇胺 10 μmol/L—40

刘敏瑛参加细胞培养工作。

表 2 不同剂量的硒酸对 116 株细胞生长的影响\*

剂量/ml \ 培养时间	—**	0.25 nmol/L	1.25 nmol/L	2.5 nmol/L	5 nmol/L	10 nmol/L
72 小时	71 (100)	117 (164.8)	98 (138.0)	97 (136.6)	102 (143.7)	47 (66.2)
96 小时	79 (100)	113 (143.0)	86 (108.9)	70 (88.6)	68 (86.1)	38 (48.1)

\* 在 DMEM+1%cs 培养液中传至第 6 代的细胞, 24 孔板培养, 每孔接种  $2 \times 10^5$  细胞/ml, 共 1 ml。每个剂量组接种 4 个孔, 按规定时间各取 2 个孔作活细胞计数, 取平均值。对照组不添加硒酸。表列各组数值  $\times 10^5$  为每 ml 活细胞总数, 括号内数值为以对照组活细胞数为 100 时, 各组的细胞生长比率。 \*\* 未加硒酸组。

表 3 不同剂量的铁传递蛋白对 116 株细胞生长的影响

剂量/ml \ 培养时间	—**	0.05 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	5 $\mu$ g	50 $\mu$ g/	100 $\mu$ g
72 小时	78 (100)	93 (119.2)	96 (123.1)	111 (142.3)	168 (215.4)	102 (130.8)
96 小时	95 (100)	75 (78.9)	90 (94.7)	109 (114.7)	123 (129.5)	102 (107.4)

培养和接种条件等均同表 2。

\*\* 未加铁传递蛋白组。

表 4 不同剂量的乙醇胺对 116 株细胞生长的影响

剂量/ml \ 培养时间	—**	1 $\mu$ mol/L	5 $\mu$ mol/L	10 $\mu$ mol/L	20 $\mu$ mol/L	40 $\mu$ mol/L
72 小时	33.8 (100)	63.1 (186.9)	75.3 (222.8)	52.9 (156.5)	52.4 (155.0)	48.8 (144.4)
96 小时	31.5 (100)	54.8 (174.0)	53.3 (169.2)	56.6 (179.7)	62.8 (199.4)	51.1 (162.2)

接种的细胞是在低血清培养液中传代培养的细胞, 其他条件等均同表 2。 \*\* 未加乙醇胺组。

表 5 不同剂量的胰岛素对 116 株细胞生长的影响

剂量/ml \ 培养时间	—**	0.1 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	2.5 $\mu$ g	5 $\mu$ g	10 $\mu$ g
72 小时	76.7 (100)	55.5 (72.4)	48.8 (63.6)	32.1 (41.9)	26.0 (33.9)	17.0 (22.2)

接种的细胞是在低血清培养液中传至第 4 代的细胞, 其他培养条件等均同表 2。

\*\* 未加胰岛素组。

表 6 不同剂量的白蛋白对 116 株细胞生长的影响

培养时间	剂量/ml	—**	0.1 mg	0.2 mg	0.3 mg	0.4 mg	0.5 mg
72 小时		45.3 (100)	41.1 (90.7)	45.1 (99.6)	50.3 (111.0)	40.5 (89.4)	35.9 (79.2)

接种和培养条件等均同表 4。

\*\* 未加白蛋白组。

剂量时,从培养 72 小时到 96 小时仍见细胞增殖,而其他各组均在 72 小时细胞生长达到峰值。白蛋白 0.3 mg/ml 剂量有微弱的促细胞生长作用,但在低剂量(0.1 mg/ml)和高剂量(0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml)时,均显示相反的影响。当分别添加胰岛素 5 个不同剂量(表 5),随剂量的增加对细胞生长的不利影响也逐步增强。虽然胰岛素是许多细胞株的无血清培养基所必需的添加成份,有刺激细胞生长的作用,但据 Chang 等人的报告<sup>[5]</sup>在无血清培养液中必须有铁传递蛋白至少 5 μg/ml 的存在,胰岛素才可以有促细胞生长的作用。本文 1%cs 中铁传递蛋白的含量,可能未达到这一水平。

### 三、116 株细胞无血清培养基配方的建立

依据前项实验结果,我们选择有明显促进 116 株细胞生长作用的因子,硒酸(S)、铁传递蛋白(T)和乙醇胺(E)及一定剂量(分别为: S, 0.25 nmol/L, T, 50 μg/ml, E, 5 μmol/L)作为混合添加因子(STE),仍以 DMEM 为基础培养基,再次逐步减少培养液中血清含量、最终达到完全去除血清,而细胞仍能增殖、传代,并保持分泌抗体的功能。

DMEM + STE 培养液中的血清含量为 0.5% 时的细胞生长动态和最高密度与 DMEM + 2% cs 组的相比较,前者完全相同,后者十分接近。但是血清含量进一步降低到 0.2%cs 时,细胞生长已明显迟缓,最高密度也显著降低(图 1),如果把 0.2%cs 代之以 0.3 mg/ml 白蛋白(A)时,细胞生长密度(72 小时)又上升到  $80 \times 10^4/\text{ml}$  水平,高于 DMEM + STE + 0.2%cs 组(图 2)。在 DMEM + STEA 无血清培养液中,

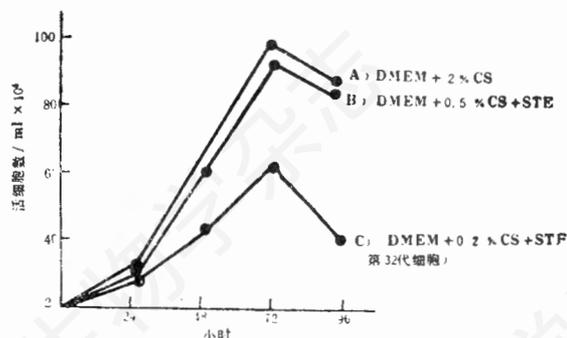


图 1 116 株细胞在三种不同培养液中的生长动态

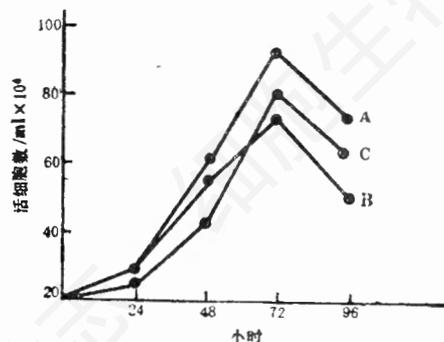


图 2 116 株细胞在无血清培养液和低血清培养液中生长动态的比较

- A) DMEM + STE + 0.5% CS (第 45 代细胞)
- B) DMEM + STE + 0.2% CS (第 34 代细胞)
- C) DMEM + STEA (第 12 代细胞)

116 株细胞可以长期生长和传代。

### 四、116 株细胞在无血清培养液和含血清培养液中抗体分泌的比较

ELISA 检测结果(图 3)表明,STE + 0.5% cs 组细胞的抗体分泌水平与含 5%cs 组基本相

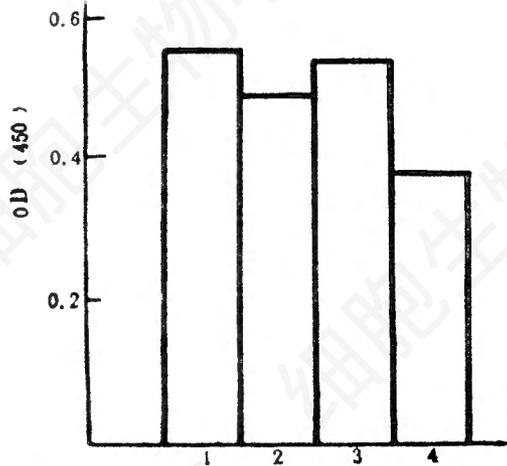


图3 116株细胞在无血清培液和含血清培液中分泌抗体相对量的比较

1. DMEM + 5% CS
2. DMEM + 2% CS
3. DMEM + STE + 0.5% CS (第45代细胞)
4. DMEM + STEA (第12代细胞)

同。无血清培液组(STEA)细胞分泌抗体的水平低于5%cs组的33%，可能与细胞生长密度有关。除个别报道外，很多杂交瘤细胞在无血清培液中培养，其细胞密度和抗体水平很难达到含血清培液所培养的。因此如何改进我们已建立的116株细胞无血清培基的方法，仍是一项待探索的工作。我们曾在STE + 0.2%cs培液中增添一定量的硫代甘油(thioglycerol)，可以增加116株细胞分泌抗体的水平，与不加硫代甘油组比较，两组OD值分别为0.46和0.23；因此在无血清培液中添加这种因子，

也有可能提高116株细胞分泌抗体的水平。最近本文作者之一和孙燮钧<sup>[6]</sup>，已研制成功一种包括116株细胞在内的、适合多种哺乳动物细胞株长期培养、传代的无蛋白培液CB 741-A，从而为从116株细胞条件培液中纯化高纯度单抗，提供了更加有利的条件。

### 摘 要

经逐步降低培液中血清含量，结合增添促细胞生长因子，已经建立了适宜116株杂交瘤细胞长期生长和传代的无血清培液配方。配方成分比较简单，蛋白含量为350 μg/ml。在无血清培液中培养的116株细胞，其抗体分泌水平低于用5%血清培液培养的约33%，其原因可能与细胞生长密度有关。改进培液配方或其他培养条件，如添加一定量的硫代甘油，有可能提高分泌抗体的水平。

### 参 考 文 献

- [1] 葛锡锐等, 1987, 实验生物学报, 20(2): 251—255.
- [2] Iscove, N. N. and Melchers, F., 1978, *J. Exp. Med.*, 147: 923—933.
- [3] Barnes, D. and Sato, G. 1980, *Anal. Chem.*, 102: 255—270.
- [4] Murakami, H., et al., 1982, *PNAS* 79: 1158—1162.
- [5] Chang, T. H. et al, 1980, *J. Immunol. Methods.*, 39: 369—375.
- [6] Sun, H. S. and Yao, T. H., 1990, Abstracts in FIRST APOCB CONGRESS, P. 165.

细胞生物学杂志 1991年 第13卷 第3期

国内统一刊号: CN 31—1478

编辑 细胞生物学杂志编辑委员会  
上海岳阳路320号

主编 曾弥白

出版 上海科学技术出版社

发行 上海市报刊发行处

订阅 全国各地邮局

印刷 中国科学院上海分院印刷所

刊号 4-296 1991年 9月 价 1.00