



# 细胞培养中乙二胺四乙酸二钠的使用方法

李 军

(武汉大学病毒系)

细胞培养在细胞生物学和病毒学的研究中占有重要的位置。细胞培养中把细胞分散成单个的细胞是整个培养过程中的重要一环。许多酶都可以用来分散细胞<sup>[1-2]</sup>，也有用胰蛋白酶和螯合剂混合使用或单独用螯合剂来分散细胞<sup>[3-5]</sup>。用螯合剂分散细胞报道很多，但用乙二胺四乙酸二钠作为分散剂来消化细胞报道甚少。

乙二胺四乙酸二钠 (Disodium Ethylenediamine Tetraacetate) 也称 Versenate disodium。分子量为： $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O = 372.25$ ，系白色结晶粉末，溶于水。与常用的螯合剂乙二胺四乙酸(简称 EDTA) 相比有不少优点，能溶于水，配制时较方便，低浓度时对细胞无毒性，消化细胞后可不必倒掉，简化了消化程序，经高温高压灭菌不被破坏，比胰蛋白酶用抽滤方法除菌要简便得多，配制好后可长期保存，使用时效力不减，不象胰蛋白酶保存时间长了会失效。

## 材 料 和 方 法

### 螯合剂

乙二胺四乙酸二钠(以下简称 EDTA 二钠)，分析纯，上海试剂一厂出品。配成所需要的浓度后，经 15 磅 15 分钟高温高压灭菌，4℃ 冰箱或室温保存备用。

### 细胞

非洲绿猴肾细胞 (MK) Vero 细胞系、婴地鼠肾

细胞 (BHK<sub>21</sub>)、人胚肺细胞株 (2BS)，三者均由武汉生物制品研究所提供，培养基均用 Eagle's 培养液加胰蛋白酶水解牛肉浸液。乳兔肾细胞 (RK)、鸡胚细胞 (CE)、地鼠胚细胞 (HE) 均由我们实验室按常规方法制备，均用 Hanks 液加 0.2% 水解乳蛋白和 0.1% 胰蛋白胨作培养液。

### 消化单层细胞

倾去培养瓶中原有的培养液，用 PBS 缓冲液洗一次，然后加 0.02% (0.2 毫克/毫升) 的 EDTA 二钠，25 毫升瓶 (11.44 平方厘米培养面) 加 0.2~0.5 毫升，100 毫升方瓶 (35.28 平方厘米培养面) 加 0.5—1.0 毫升，37℃ 消化 2—4 分钟，看到瓶壁细胞层上露出肉眼可见小孔时，用手摇动培养瓶，细胞脱离瓶壁被消化下来，这时加入培养液 (25 毫升瓶每瓶加 3 毫升，100 毫升瓶每瓶加 10 毫升) 用 10 毫升吸管进行冲打进一步分散细胞，然后置培养箱培养。

## 结 果 与 讨 论

### 1. EDTA 二钠消化单层细胞时的浓度

将 EDTA 二钠配成 2% 的浓度 (即 100 毫升 PBS 液中加入 EDTA 二钠粉末 2 克，也就是 20 毫克/毫升的浓度)，然后用 PBS 液稀释成 0.5% (5 毫克/毫升)、0.25% (2.5 毫克/毫升)、0.2% (2 毫克/毫升)、0.1% (1 毫克/毫升)、0.02% (0.2 毫克/毫升)、0.01% (0.1 毫克/毫升) 的浓度，分别对单层细胞进行消化。倾去培养瓶中原来的培养液，用 PBS 洗一次倒去。用以上 7 种浓度在 25 毫升长满单层细胞的培养瓶中分别加入 0.5 毫升 EDTA 二钠液。均在

[6] Bettega, D. et al., 1978, *Rad. Res.*, 77: 85.

[7] Bettega, D. et al., 1980, *Int. J. Rad. Biol.*, 37(1):1.

[8] Chaubey, R. C. et al., 1978, *Int. J. Rad. Biol.*, 33(5):507.

[9] 王天宇等, 1982, 南京医学院学报, 2(2): 18.

[10] 蒋亦寿等, 1980, 江苏医药, 2:1.

[11] 王天宇等, 1981, 南京医学院学报, 1(2): 14.

[12] 中国科学院数学研究所统计组编, 1973, 常用数理统计方法, 科学出版社, pp. 85, 116—118.

[13] 郭祖超, 1965, 医用数理统计方法, 人民卫生出版社, pp. 100.

37℃时消化2—4分钟,用手摇动瓶子,细胞脱瓶壁与EDTA二钠液混合在一起(EDTA二钠不倒去)。每瓶各加培养液2.5毫升。试验结果如下。

(1) 7种浓度的EDTA<sub>2Na</sub>液均能把细胞消化下来。这里所说的消化下来的标准,是指各种单层生长的细胞在消化剂(EDTA二钠)的作用下,细胞自动脱离瓶壁、经过手摇动、用吸管冲打三种方式细胞离开了原来附着生长的瓶壁。只是0.01%(0.1毫克/毫升)的浓度消化细胞时效果略差,有10%左右的细胞(经手摇动瓶子并用吸管冲打仍附着在原来的瓶壁上)没有消化下来。2%(20毫克/毫升)的浓度消化细胞时虽然能将细胞很快地消化下来(只要用手将瓶子移动一下,细胞很快地就脱离了原来附着的瓶壁),但对细胞有明显的毒性作用,其毒性作用表现在细胞受损伤太严重均不能贴壁,并且很快地被溶解了。这种毒性作用可能是2%的EDTA二钠在37℃时消化2—4分钟和0.33%的浓度与细胞接触2小时以上共同作用的结果。因为在实验中曾观察到,用2%的EDTA二钠消化细胞时间极短——半分钟以内,细胞是能够贴壁的,消化时间超过了半分钟,细胞贴壁和生长都差了。在加培养液后最终浓度在0.33%时对细胞肯定有毒性作用,因最终浓度在0.10%时就对细胞有毒性作用。

(2) 0.5%(5毫克/毫升)的浓度消化细胞时,细胞都能正常贴壁。每次在细胞长满单层后传代,传代时将培养液加入细胞消化下来的瓶中,充分混合均匀然后等体积分装到各瓶,这样各瓶的细胞浓度和数量是一样的。在长满单层的BHK<sub>21</sub>细胞传代时,1瓶传3瓶,传代后培育2小时90%细胞贴壁,5小时贴壁完。但生长分裂稍慢,3天才能铺满单层。而Vero(非洲绿猴肾细胞系)细胞1瓶传3瓶2天就能铺满单层。可见0.5%的浓度消化细胞时,对BHK<sub>21</sub>细胞等有轻微的影响,对Vero细胞没有影响。这提示我们0.5%的EDTA二钠是

消化细胞时的最高浓度界限(加培养液后的最终浓度都在0.083%以下时),消化细胞时的最高浓度不得超过0.5%,加培养液后的最终浓度不得高于0.083%。

(3) 0.25%(2.5毫克/毫升)至0.02%(0.2毫克/毫升)的5个浓度消化细胞时,不但能把细胞很好地消化下来,而且对细胞没有毒性,如原代鸡胚细胞传代后培育10分钟80%细胞贴壁,2小时完全贴壁,1瓶传3瓶2天可铺满单层。原代RK、HE细胞,长满单层的培养瓶1瓶传2瓶,传代后培育2小时贴壁完,3天铺满单层。二倍体细胞株如2BS细胞,则与原代RK细胞相类似。传代细胞系如MK、BHK<sub>21</sub>细胞,1瓶传3瓶5小时内贴壁完,2天铺满单层,有时1瓶传4瓶在3—4天内也能铺满单层。试验证明EDTA二钠的0.25%至0.02%浓度消化细胞后不倒去对细胞传代没有影响,0.02%的浓度既能将细胞很好地消化下来,又能做到节省药品,是消化细胞可选择的浓度。

## 2. 温 度

试验中采用0.2%(2毫克/毫升)的浓度,25毫升长满单层细胞的培养瓶,每瓶加EDTA二钠液0.5毫升,消化后加培养液2.5毫升。在20℃和37℃下分别对MK、RK、BHK<sub>21</sub>细胞进行消化,结果MK细胞在20℃时需12分钟才能将细胞消化下来,但在37℃时只需3分钟;RK细胞在20℃时需6分钟,在37℃时只需3分半钟;BHK<sub>21</sub>细胞在20℃时需5分钟,37℃时只需1分半钟。37℃时消化细胞的速度要快得多,说明37℃是消化细胞时的比较适宜温度。

## 3. pH 值

用8.8%的NaHCO<sub>3</sub>将2%的EDTA二钠液(pH值在6.0以下)调pH到6.5、7.0、7.5三个值,再将稀释液(PBS)的pH同样调到6.5、7.0、7.5。然后稀释,使三种pH值的EDTA二钠液最终浓度为0.2%(2毫克/毫升),在长满单层细胞的25毫升瓶中,各瓶分别加入

不同 pH 值的 EDTA 二钠液各 0.2 毫升(25 毫升瓶)消化细胞的时间是一样的。消化后加 2.5 毫升的培养液,并用灭过菌的 8.8% 的碳酸氢钠和 0.2% 的盐酸将每个瓶中的 pH 都调到 pH 7.0,然后放培养箱培育,细胞在贴壁、生长等方面对同种细胞来说,三种 pH 值消化的细胞无明显差别。这说明 EDTA 二钠 pH 的高低对消化细胞来说影响不大。

#### 4. EDTA 二钠与胰蛋白酶消化单层细胞的比较

用 0.25% (2.5 毫克/毫升)的胰蛋白酶和 0.25% (2.5 毫克/毫升)的 EDTA 二钠消化 BHK<sub>21</sub>、MK 细胞(用胰蛋白酶消化细胞的方法和消化下来的标准同 EDTA 二钠),在长满单层细胞的 25 毫升瓶中,各瓶分别加上述消化液 0.3 毫升,结果表明两种消化液的作用无明显差别。我们又将 0.25% 的胰蛋白酶、0.02% 的 EDTA 二钠与 0.25% 的胰蛋白酶混合液(1:1)、0.02% (0.2 毫克/毫升)的 EDTA 二钠三种进行比较,消化长满单层的 BHK<sub>21</sub>、MK 细胞,在 100 毫升方瓶中每瓶加 1 毫升,消化后每瓶加培养液 9 毫升。试验结果三种处理无明显差别,说明 0.02% 的 EDTA 二钠与胰蛋白酶以及 EDTA 二钠和胰蛋白酶的混合液在消化单层细胞时是有同样功效的。

#### 5. EDTA 二钠消化组织块试验

Rinaldini 发现螯合剂在 0.1—1.0% 的浓度比蛋白水解酶分解胚心和肝效率低得多<sup>[5]</sup>。我们用 0.25% 的 EDTA 二钠分散乳兔肾组织块,其效率比 0.25% 的胰蛋白酶也低得多,但比单纯用组织块不经任何消化液消化在玻璃瓶中培养要好。用胰蛋白酶消化的乳兔肾组织块在 2—3 天内细胞可铺满单层;用 EDTA 二钠消化的乳兔肾组织块需 10—15 天在组织块周围展现出单层细胞,铺满瓶培养面的 90%;而不经消化的组织块附着在瓶壁上培养,由组织块周围展现出单层细胞在 10—15 天才能铺瓶培养面的 1/3。试验表明 EDTA 二钠不能用于消化组织块。

#### 6. 0.02% 的 EDTA 二钠消化不同的单层细胞比较

用 0.02% (0.2 毫克/毫升)的浓度对多种细胞进行消化比较,结果证明同样都是有效的。我们用 BHK<sub>21</sub>、MK、CE、RK<sub>F<sub>2</sub></sub>(乳兔肾细胞第 2 代)、RK<sub>F<sub>20</sub></sub>(乳兔肾细胞第 20 代)、2BS、HE 等进行消化的结果,其效果无明显差别。只是不同细胞消化时间上有所差异(见表)。

表 0.02% 的 EDTA 二钠消化不同细胞时间的差别

细胞种类	BHK <sub>21</sub>	MK	CE	RKF <sub>2</sub>	RKF <sub>20</sub>	2BS	HE
消化时间(分, 37℃)	1 分半	3	1 分半	3 分半	4	3 分半	4

注:在长满单层的 25 毫升瓶中每瓶加消化液 0.5 毫升。

#### 小 结

用螯合剂——EDTA 二钠消化单层细胞是一种比较好的分散剂,消化细胞时使用的浓度最好是 0.02% (0.2 毫克/毫升),在 0.25% (2.5 毫克/毫升)以下的浓度时对细胞无毒性,可不必倒掉,同时比不倒掉会得到更好的消化效果,因为不倒掉消化得充分,细胞贴壁多,生长快。在 0.02% 的浓度下消化细胞时的用量为 25 毫升瓶(在 11.44 平方厘米面上长满单层细胞)中每瓶加 0.2—0.5 毫升,100 毫升方瓶(在 35.28 平方厘米面上长满单层细胞)中每瓶加 0.5—1.0 毫升为宜。消化细胞时温度控制在 37℃ 为最佳。EDTA 二钠液的 pH 调到 7.0 为宜。EDTA 二钠消化组织块中细胞效果差,所以在消化组织块时最好还用胰蛋白酶。

#### 参 考 文 献

- [1] 王德福、关崇芬, 1979 肿瘤防治研究, 2: 22.
- [2] 上海市肿瘤研究所细胞生理组编著, 1964 细胞营养与组织培养, 305—306 页, 上海科学技术出版社.

(下转第 34 页)

用不同浓度的 $\beta$ -PL处理病毒,然后对病毒的几种生物学活性的反应进行分析,我们的结果与他们的有相似之处,结果都表明病毒的感染力灭活最快,其次是融合活性,血凝活性较稳定。但我们与他们又各有出入, Neff 等用0.03%、0.06%和0.13% $\beta$ -PL处理病毒,融合活性仍保持完好;而 Wainbery 等用0.05% $\beta$ -PL处理,病毒消失融合活性,用0.013%者保留融合活性;我们在预备实验中用0.05% $\beta$ -PL处理病毒并在37°C处理120分钟,病毒的融合效力表现不稳定。有些样品融合效力保持原状,有些不同程度地下降,有些消失了融合活性;而用0.01% $\beta$ -PL处理者,融合活性保持良好。这说明不同样品的病毒融合活性对较高浓度的 $\beta$ -PL反应不稳定,而对较低浓度的 $\beta$ -PL反应较稳定。Brusik<sup>[1]</sup>曾就 $\beta$ -PL对遗传物质作用的特征进行评论,认为“ $\beta$ -PL是一种高度活跃的分子,它快速地与嗜核中心(nucleophilic centers)如蛋白之类物质起反应,特别与含硫氨基酸起反应,使核酸发生单股断裂,而不损害病毒的外壳”。这大概就是为什么病毒的感染力对 $\beta$ -PL特别敏感,而融合活性和血凝活性较稳定的原因,因为后两种活性只与病毒的外壳有联系,必须提出的是 $\beta$ -PL不损害病毒的外壳,只是对低浓度的 $\beta$ -PL而言,而较高浓度的 $\beta$ -PL对病毒外壳是有损害的。我们用0.01% $\beta$ -PL处理的病毒其融合活性没有变化,并能较长时间保存,而用0.05% $\beta$ -PL处理者融合活性降低,只能保存较短时间,这都说明病毒的外壳随着 $\beta$ -PL的浓度的增加,受损害也加剧。

Dean<sup>[8]</sup>曾用大白鼠的白血球进行实验,发现 $2.5 \times 10^{-4} M \beta$ -PL就有细胞毒作用,分

裂指数明显降低。Perry和Evans<sup>[2]</sup>的工作说明 $3 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-4} M \beta$ -PL对CHO细胞有显著的诱发SCE的作用。虽然不同动物的细胞对 $\beta$ -PL的反应会有不同,但从这些资料看来, $\beta$ -PL的毒性和诱变性还是相当高的,国外各实验室一般都采用0.05% $\beta$ -PL灭活病毒,浓度较高,为了使药物降解,制剂在37°C处理120分钟,而这样对病毒的融合效力影响较大,有些融合效力下降了,有些消失了融合活性。我们的实验证明,如果在37°C热处理时采用连续振荡法,可以加速药物的降解。0.05% $\beta$ -PL热处理60分钟,残留 $\beta$ -PL没有显著的诱变性和细胞毒性。实验还证明用0.01% $\beta$ -PL就足以灭活病毒,在37°C处理30分钟到60分钟其残留 $\beta$ -PL没有显著的细胞毒性和诱变性。但融合效力保持良好,并能较长时间保存。

#### 参 考 文 献

- [1] Harris H. and Watking J. F., 1965., *Nature(London)*, 205:640—646.
- [2] Okada. Y. and J. Tadokoro, 1962, *Exp. Cell Res.*, 26:108—118.
- [3] Giles R. E. and F. H. Ruddle, 1973, *In vitro*, 4:103—107.
- [4] 郑瑞珍、王素敏、赵淑慧, 1981, 动物学集刊, 81(1): 181—184.
- [5] Neff J. M. and F. H. Ender, 1968, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 12:260—267.
- [6] Wainbery M. A., R. N. Hjorth and C. How, 1971, *Applied Microbiol.*, 22:618—621.
- [7] Brusik J. D., 1977, *Muta. Research*, 39: 241—256.
- [8] Dean B. J., 1969, *Lab. Animal.* 3:157—174.
- [9] Perry P. and H. J. Evans, 1975, *Nature (London)*, 258:121—125.

(上接第45页)

- [3] 中国医学科学院流行病防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 365页, 科学出版社.
- [4] Robert J. Kuchler., 1977, *Biochemical methods in cell culture and virology.*, p.

14.

- [5] Raymond C. Parker, ph. D., 1964, *Methods of tissue culture*, p.131 Hoeber Medical Division Harper & Row, Publishers,