

介绍几个哺乳动物细胞株的培养 方法及其应用

邱信芳 薛京伦 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传学研究所)

T. T. Puck 成功地分离出单个体细胞在体外进行培养, 使长成一个无性繁殖系, 这已成为体细胞遗传学研究中的一个重要工具。生物特性的遗传学分析, 特别是高等生物——人的特性的遗传学分析, 过去通常必须用性细胞通过有性生殖来研究, 现在则可用体细胞在实验室中进行。

体细胞遗传学研究还引进了诱变和分离微生物营养缺陷型的方法, 分离出单个变异细胞的无性繁殖系, 建立了一系列营养突变缺陷型、抗药性和条件致死等的变异细胞株。这些细胞株, 都各带有一个或几个遗传标记, 并且能用一种简便的生物化学方法把这些变异株从大量生长的细胞背景中选择出来。这种标记性状对于进一步的遗传学研究如细胞杂交, 细胞间基因转移等工作也是必不可少的。因此突变型细胞株是体细胞遗传学的基本实验材料。今

将我们实验室已有的七株哺乳动物细胞的特性、培养方法及其应用作一简单介绍。

我们现有的七个细胞株 (CHO-K1, DON, V79, Wg 3-h, B82, A9/28DKS, 3T3), 其来源、标记性状和染色体组成情况均列于表1。其中仓鼠四株, 小鼠三株。具有遗传标记 HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), 次黄嘌呤——鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶) 缺失的有三株: 仓鼠 Wg3-h, CHO-K1 和小鼠 A9/28DKS 同时也是 APRT (Adenine phosphoribosyl transferase, 腺嘌呤转磷酸核糖基酶) 缺失的, CHO-K1 同时也是脯氨酸缺陷型的。具有 TK (Thymidine Kinase, 胸腺嘧啶核苷激酶) 缺失的有二株: 小鼠 B82 和 3T3。另外, V79 既是半乳

表1 七个细胞株的来源、特性和染色体组成。

编号	细胞株名	来源	标记性状*	染色体数目
FD-2	CHO-K1	中国仓鼠卵巢成纤维细胞	HGPRT ⁻ 脯氨酸缺陷型 (谷氨酸-8-半醛合成酶缺失)	20 ~ 19
FD-7	DON	中国仓鼠(雄)肺成纤维细胞		22
FD-8	V79	中国仓鼠(雄)肺成纤维细胞	半乳糖缺陷型 HGPRT 活性降低 抗8-杂氮嘌呤	21 ~ 23
FD-12	Wg 3-h	中国仓鼠成纤维细胞	HGPRT ⁻	21 ~ 23
FD-13	B82	小白鼠 L 成纤维细胞	TK ⁻	51 ~ 58
FD-3	A9/28 Dks	小白鼠 L 成纤维细胞	HGPRT ⁻ APRT ⁻	51 ~ 58
FD-11	3 T 3	小白鼠胚胎皮肤成纤维细胞	TK ⁻	76 (64 ~ 80)

* 各细胞株的营养缺陷型标记性状未全部列入; 这类标记性状系建株后, 在培养过程中由自发突变所产生: 例如 CHO-K1 细胞还伴有胱硫醚酶, 精氨(基)琥珀酸合成酶, 精氨(基)琥珀酸裂解酶等的缺失。

糖缺陷型, 又对 8-杂氮鸟嘌呤 (8-azaguanine) 有抗性, 还伴有 HGPRT 活性降低; DON 是正常的二倍体中国仓鼠细胞株。

仓鼠细胞株的染色体组成较稳定, 染色体数目变动范围在 19~23 之间 (仓鼠 $2n=22$)。小鼠的染色体组成情况变化较大, 有非整倍体, 大多是亚四倍体, 染色体形态有中央着丝粒, 亚中央着丝粒和端点着丝粒, 其染色体数目的变动范围在 51~53 之间, 平均为 55 (小鼠 $2n=40$); 小鼠 3T3 细胞的染色体数目更多, 变动范围为 64~80, 均系端点着丝粒染色体。一般来说, 培养物生长旺盛时, 二倍体细

胞占优势; 生长迟缓时, 常有较多的非整倍体细胞出现。

这些细胞株的培养方法, 基本上分为仓鼠和小鼠两类, 今将七个细胞株的培养液的配制方法列于表 2。我们用改良的 Eagle's 液 (表 3), 再加入 5% 水解乳蛋白; 血清的量虽然稍有差异, 但影响不大, 仓鼠细胞株从 5%~20%; 小鼠细胞株均为 20%。小鼠 3T3 细胞株培养液中再添加 L-谷氨酰胺 (0.292 克/1000 毫升)。仓鼠 V79 细胞株培养液中另加 1 mM 丙酮酸钠, 可以防止细胞因萎缩而脱壁。用 M199, RPMI1640 培养液代替改良的 Eagle's

表 2 七个细胞株的培养液配方

细胞株	培养配方 Eagle (%)	小牛血清 (%)	水解乳蛋白 (%)	丙酮酸钠 (mM)	L 谷氨酰胺 (0.292 克/升)	青、链霉素各 (100 单位/ml)	pH	注
CHO-k1	85	10	5			+	7.2	也可补充脯氨酸
DON	85	10	5			+	7.2	
V79	90	5	5	1		+	7.2	用半乳糖时 生长更好
Wg3-h	85	10	5			+	7.2	
B82	75	20	5		+	+	7.2	
A9/28	85	10	5		+	+	7.2	
3T3	75	20	5		+	+	7.2	

液, 效果都很好。我们认为, 各实验室可根据自己的条件采用各种不同的培养液, 完全可以达到要求; 一般来说, 成株的细胞培养条件是很易掌握的。我们用的培养瓶分 25 毫升和 100 毫升大小两种, 当用小方瓶时, 每瓶含培养液 3~4 毫升, 大方瓶每瓶含培养液 12~15 毫升。培养液中再加入青、链霉素各 100 单位/毫升。培养液用 5% 碳酸氢钠调 pH 至 7.2~7.4。

当细胞长成单层时, 即可传代。先将培养液全部倒去, 用 Hank's 液轻轻冲洗一次, 加入 2~3 毫升 (小方瓶) 0.25% 胰酶溶液, 在室温下消化 2~3 分钟 (夏季室温高时只需 1 分钟) 看到贴壁细胞层上露出针尖状小孔时, 倒去胰酶液, 继续在室温下静置片刻 (随气温高低掌握时间), 用手拍打玻瓶, 看到细胞松动

脱落时, 随即加入配制好的培养液 3 毫升, 用滴管冲打细胞团, 制成细胞悬液, 每只小方瓶接种 0.5 毫升细胞悬液, 再补足培养液至 3 毫升, 静止平放于 37℃ 温箱中, 在最初 2~3 小时内不要挪动, 以免影响细胞贴瓶。仓鼠细胞株的群体倍增期为 12~15 小时, 细胞生长旺盛, 一般传代后 48 小时细胞就长成单层, 又可再次传代。小鼠细胞株的群体倍增期为 24 小时, 传代后 72 小时左右, 细胞长成单层即可再次传代。控制细胞的接种量, 可以调整两次传代之间的时间。

染色体制备是当细胞传代培养 24 小时后, 观察到细胞铺满瓶壁的三分之二且有许多透亮的圆细胞 (透亮的圆细胞大多数为分裂细胞) 时, 加入秋水仙素溶液 (最终浓度为 0.2 微

表3 改良Eagle's培养液的成份

无机盐	mg/1000ml	氨基酸	
CaCl ₂	200	L 精氨酸	105
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	170	L 盐酸组氨酸	31
KCl	400	DL 赖氨酸	58
NaCl	6800	L 色氨酸	10
Na H ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	158	DL 苯丙氨酸	64
Na HCO ₃	1320	DL 苏氨酸	96
		L 亮氨酸	104
维生素		DL 缬氨酸	96
D 生物素	10	DL 异亮氨酸	52
氯化胆碱	2	DL 甲硫氨酸	30
叶酸	1	L 酪氨酸	36
菸酰胺	1	L 胱氨酸	36
D-泛酸钙	1	谷胺酰胺	300
盐酸吡哆醛	1	其他成分:	
核黄素	0.1	葡萄糖	1000
盐酸硫胺	1	酚 红	4
肌 醇	4	青、链霉素	各10万单位

克/毫升), 37℃处理4小时; 收获细胞时, 轻轻倒去培液, 加入0.25%胰酶液, 消化方法和传代时一样, 待细胞脱落后, 加入0.075M氯化钾低渗液, 37℃处理6~25分钟(低渗时间随室温高低有所变动, 在10℃以下时处理25分钟, 在35℃左右时只需6分钟)。低渗处理结束后立即加入新鲜固定液(甲醇:冰醋酸为3:1)0.5毫升, 打匀, 随即离心收集细胞(1000转/分, 离心5分钟), 倒去上清液, 加入新鲜的固定液3毫升, 打散细胞, 固定15分钟; 然后再离心、固定一次, 按常规气干法制片, 根据需要作分带或吉姆萨常规染色, 镜检。

体外培养的正常细胞有一定的寿命, 一般在50~100代之间, 因此需将细胞保存在液氮(-196℃)中, 这是冻存细胞的一种常规方法。我们将需要冻存的细胞, 按前述方法消化下来, 加入冻液1~1.5毫升(冻液按下法配制: Eagle's液75% [小鼠为65%] + 15%小牛血清 [小鼠应为25%] + 10%甘油 [或二甲基亚砷] + 青、链霉素各100单位/毫升, pH 7.0)冲打细胞, 制成细胞悬液, 注入2毫升

安瓿瓶中, 火焰封口, 置-40℃冰箱2小时或过夜; 然后在气态氮中预冻20分钟, 随即沉入液氮。安瓿瓶浸在液氮里就能长时间保存下去。如无液氮罐, 也可因陋就简, 用普通热水并代替, 但由于热水并中的液氮很易逸散, 所以隔天就要添加。细胞复甦时, 从液氮中取出安瓿瓶, 立即投入40℃水浴中, 动作要敏捷, 使细胞冻液在一分钟内融化。

由于液氮用量很大, 费用昂贵, 如一时不具备条件, 可先将安瓿瓶在液氮中冻存20分钟, 然后移入-40℃低温冰箱, 也可保存相当长的时间。

二

HGPRT 或 TK 缺失的细胞株, 可广泛用于细胞融合实验。如用这二种缺陷型作为融合亲本, 杂交后可以用 HAT 选择培养基把杂种细胞选择出来。我们实验室用仙台病毒促进细胞融合后, 并开始从异核细胞中选择杂种细胞, 将融合后细胞在生长培养基上培养24小时后, 换去生长培养基, 加入 HAT 选择培养基, HAT 培养基含有次黄嘌呤 (Hypoxanthine)

$1 \times 10^{-4} M$, 氨基嘌呤 (Aminopterin) $4 \times 10^{-7} M$, 胸腺嘧啶核苷 (Thymidine) $1.6 \times 10^{-5} M$ 的 M199 或 Eagle's 液中, 另加 10% 小牛血清及青、链霉素。(如用 Eagle's 液配制的 HAT 选择培养基, 则需补充适量的甘氨酸约 $3 \times 10^{-6} M$)。HAT 选择培养基中的氨基嘌呤 (A) 阻断细胞中从头合成核酸的代谢路线, 但正常细胞可以利用现成的次黄嘌呤 (H) 和胸腺嘧啶核苷 (T), 藉应急通路 (Salvage pathway) 而合成核酸 (图 1)。由于

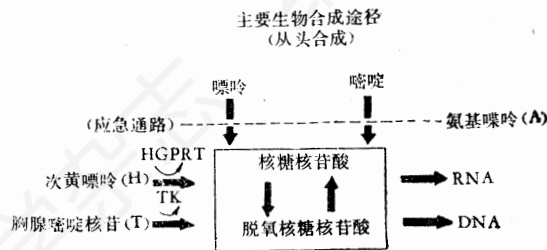


图1 核苷酸的生物合成途径

在HAT选择培养基上主要生物合成途径被氨基嘌呤封闭

突变型细胞都缺失应急通路中所需的两种酶HGPRT和TK, 因此无法利用现成的H和T, 在HAT选择培养基上就不能生长。融合后的细胞由于缺失的二个基因得到补偿, 杂种细胞能够产生HGPRT和TK二种酶, 因此能够利用H和T, 于是细胞就能正常生长(图2)

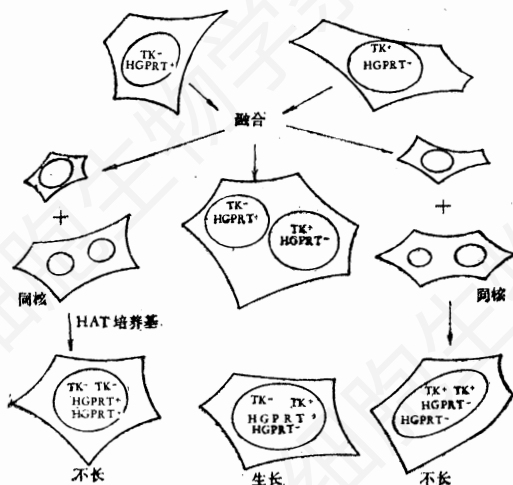


图2 用HAT选择培养基后, 只有异核形成的杂种细胞才能生长

从图中我们可以清楚地看到, 由于异核体细胞是来自两个亲本的杂种细胞, 所以能在HAT培养基上生长, 而用核体细胞虽然也包含了两个核或几个核, 但都是来自同一亲本, 所以和亲本细胞一样仍不能在HAT选择培养基上生长。因此可以利用HAT选择培养基, 把融合后的杂种细胞选择出来。以上工作还正在进行中。我们用仓鼠细胞×人体成纤维细胞, 小鼠细胞×人体成纤维细胞, 仓鼠细胞×小鼠细胞, 小鼠细胞×人体淋巴细胞等各种组合进行融合试验(图3、4)。图5是融合后的细胞生长情况。

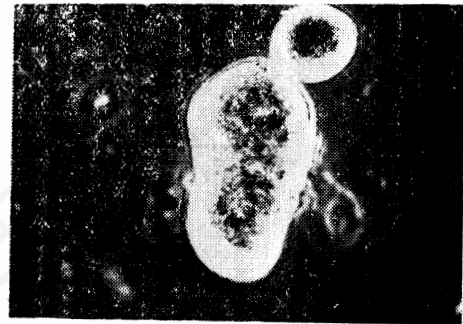


图3 小鼠成纤维细胞与人成纤维细胞融合(相差照片)

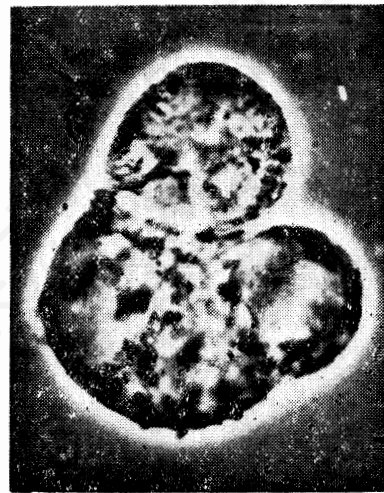


图4 仓鼠成纤维细胞与人成纤维细胞融合(相差照片)

如果杂种细胞的亲本是人体细胞和小鼠细胞, 那么传代4~5次后, 人的染色体就会逐步丢失, 而小鼠的整套染色体组仍完整无缺地保留着。用分带技术可以鉴定残存的人体染色体是那几条, 然后再用凝胶电泳法分析杂种细

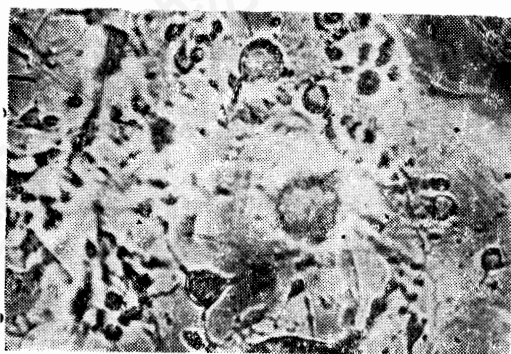


图5 融合后的细胞生长情况

胞中出现那些人体的酶,根据酶的有无同染色体或染色体片段的存在与否,就可把这种酶的基因定位在某一条染色体或某一条染色体的某

一区段上。目前已定位的基因数目已超过300个,单是X染色体上用体细胞杂交方法定位的基因就有21个之多。

哺乳动物细胞株还可作为检测化学物质致癌性或诱变性的材料。几十年来,都一直沿用动物致癌试验,化时长,收效慢,费用大,已远远不能适应目前工业发展和环境保护等的需要。我们用细胞株为材料,以姊妹染色单体互换(SCE)为指标,对于先经鼠伤寒沙门氏菌/微粒体系统(Ames法)测定为诱变或潜在致癌性阳性和阴性的几种化学物质作了进一步的测定,所得结果列于表4。从表中可以看出Ames法的结果与SCE的结果是可以相互印证的。

表4 Ames法与SCE法的比较

待检化学物质		观察 细胞数	每个细胞中SCE		t 测 验	Ames 检测诱变性
名 称	浓 度		平均数 $\pm$ 标准误	范 围		
对 照		80	6.86 $\pm$ 1.05	2 ~ 12		
NTG*	0.05	20	7.90 $\pm$ 0.43	5 ~ 12	P > 0.5	+
	0.1	20	6.00 $\pm$ 1.95	8 ~ 42	P < 0.01	
	1	20	27.05 $\pm$ 1.46	6 ~ 40	P < 0.01	
	5**	20	25.95 $\pm$ 3.03	12 ~ 58	P > 0.01	
炔 雌 醇	10**	20	11.90 $\pm$ 0.56	9 ~ 18	0.02 > P > 0.01	+
亚 胺 醒	0.2	20	57.75 $\pm$ 15.36	11 ~ 121	P < 0.01	+
焦亚硫酸钠	10	20	6.20 $\pm$ 0.44	4 ~ 8	P > 0.5	-
	100	20	7.15 $\pm$ 0.62	5 ~ 10	P > 0.5	
杀 虫 脉	10	20	6.65 $\pm$ 0.36	3 ~ 9	P > 0.5	-
	100	20	8.60 $\pm$ 0.38	6 ~ 13	0.5 > P > 0.4	

通过这些细胞株的诱变试验,还可研究真核细胞中突变作用的过程和突变的频率,以及可与已知的原核生物进行比较。

实验性的诱变作用,细胞融合和细胞间基因的转移,是近年来三项很有意义的技术性进展,大大促进了体细胞遗传学的快速发展。这

些工作都用了细胞株,这表明人和哺乳动物的各种细胞株是开展体细胞遗传学工作的必要工具。随着我国体细胞遗传学研究工作的不断深入,其应用也将越来越广。

* 本文承项维教授审阅,谨此致谢。