

一种简单的微量滴定法用于评价细胞培养用的血清*

姜述德

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明)

体外培养细胞成功与否常取决于所选用血清的质量。因不同批号的血清其质量也往往不同, 在用于培养细胞之前必须进行质量鉴定。血清质量的鉴定可采用定性法^[1]或定量法^[4,6]以及放射性核苷酸掺入法^[9]。这些方法需要高度精细的技术操作, 或者较昂贵的仪器设备, 不宜在一般实验室推广。本文报道一种新的微量滴定法用来评价胎牛血清促进细胞生长的活性。

材料和方法

1. 细胞

澳大利亚联邦血清实验室(CSL)冻存的细胞, 包括人胚肺二倍体细胞株 MRC-5 和 Vero 细胞以及原代猴肾细胞(PMK)(Cynomolgus)。用 0.25% 胰蛋白酶消化制备细胞悬液。

2. 培养液

所有试验都使用含有非必需氨基酸, 10% 胎牛血清和 20 mM HEPES (pH 7.5) 的最低必需成份 Eagle 液(MEM NE)。

3. 胎牛血清(FCS)

商品生产的不同批号的胎牛血清和一批对照血清相比较。该批对照血清能支持 MRC-5 细胞和人或其他动物多种细胞的生长。

4. 评价血清质量的方法

(a) 三次连续传代试验: 同一批 MRC-5 细胞以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞数接种到生长面积 25cm^2 的 T_{25} 塑料瓶中。培养液中含试验血清或对照血清, 每批血清使用两个 T_{25} 瓶。所有培养物平行培养于 37°C , 以 72 小时的间隔, 1:4 的分种率连续进行 3 次传代。每次都使用一个 ZB_1 型细胞计数器进行细胞计数。累积 3 次连续传代所获得的细胞群体二倍数, 计算出生长率。(生长率 = 试验血清的细胞群体二倍数/对照血清的细胞群体二倍数)。

(b) 细胞数增加试验: 采用 Pye 改进的方法(未发表资料)。该方法是以他以前报道过的方法^[4]为基

础的。接种细胞数是 $2 \times 10^3/\text{孔}$ (MRC-5 和 Vero), $10^5/\text{孔}$ (PMK)。每批血清使用 4 个孔, 37°C 培养 5—6 天后计数细胞, 计算出增长率和变异系数。

(c) 数量滴定试验: 把 $75\ \mu\text{l}$ 的培养液加到 96 孔平底微量滴定板上的每一孔中, 再把 $75\ \mu\text{l}$ 的 MRC-5 ($2 \times 10^5/\text{ml}$), Vero ($10^5/\text{ml}$) 或 PMK ($10^6/\text{ml}$) 细胞悬液加到滴定板的左面第一孔中, 充分混合后转移 $75\ \mu\text{l}$ 混合液到第二孔中。然后从左到右依次把细胞悬液进行一系列二倍稀释, 置 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱中培育 3—4 小时, 在此期间细胞附着到板孔上。其后倒去培养液并加入 $0.1\ \text{ml}$ 含 10% 试验血清或对照血清的新鲜培养液, 每批血清用两排孔。细胞于 37°C 培养 5—6 天, 然后除去培养液, 洗涤, 加 1 滴 5% 结晶紫乙醇液染色细胞 5 分钟, 倒去染液, 自来水冲洗, 待干后用肉眼或在显微镜下判断终点。以产生 50% 细胞覆盖面积的细胞悬液稀释度 \log_2 的负对数, 来表示该批号血清促进细胞生长活性的滴度。

结 果

1. 三种试验方法的比较

5 批试验血清和一批对照血清, 按三种方法所获结果相似(图 1)。

2. 微量滴定和细胞数增加试验的比较

MRC-5 细胞的试验结果表明, 以两种方法评价 FCS 的质量, 其结果相似(图 2)。Vero 细胞和 PMK 细胞的试验结果与 MRC-5 细胞相似。

3. 微量滴定试验的重复性

使用 MRC-5 细胞对 10 批 FCS (包括对照血清) 在不同日期进行了三次独立试验, 其结果列于表 1。由表 1 可见, 三次试验结果具有良好的重复性。

* 本试验是在澳大利亚联邦血清实验室进行的。在拟稿过程中曾得到 Mr A Hampson, Mr. D. Pye, Mrs. J. Stanly 和 Dr. I. Cheyne 的帮助, 特此致谢。

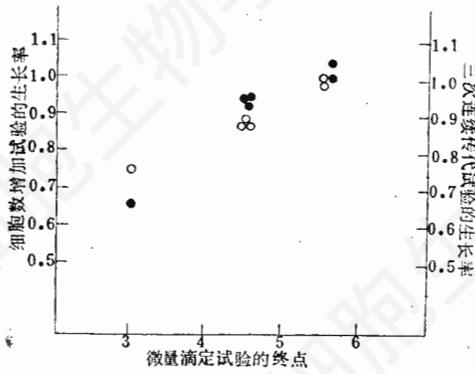


图1 三种试验方法的比较(MRC-5细胞)

● 微量滴定和细胞数增加试验
○ 微量滴定和三次连续传代试验
终点 = 细胞悬液稀释度 \log_2 的负对数
生长率 = 试验血清的细胞群体二倍数/对照血清的细胞群体二倍数

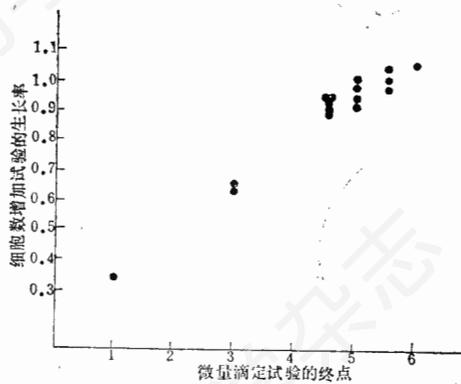


图2 两种试验方法的比较(16批血清, MRC-5细胞)

终点 = 细胞悬液稀释度 \log_2 的负对数
生长率 = 试验血清的细胞群体二倍数/对照血清的细胞群体二倍数

4. 44批FCS的质量鉴定

采用微量滴定法对44批FCS的促进细胞生长活性在MRC-5细胞上进行了质量鉴定, 结果见表2。表中对照血清的滴定终点是5.5。如果试验血清的终点 >5.5 , 则该血清的质量优于对照血清。如果试验血清的终点 ≤ 3 , 则该批号血清用于培养细胞不能得到满意的结果。

表1 微量滴定试验的重复性

试验血清	终点*		
	试验1	试验2	试验3
1	5.5	4.5	5
2	3	2.5	2.5
3	5	4	4.5
4	6	5	5.5
5	4.5	3	3.5
6	5	4.5	4.5
7	3	3	3
8	5	4.5	5
9	1	1	<1
10	5	4.5	4.5

* 细胞悬液稀释度 \log_2 的负对数

表2 44批FCS的质量鉴定

血清总批数	血清批数	终点*
	3	6
	21**	5.5
44	9	5
	8	4.5
	2	3
	1	1

* 细胞悬液稀释度 \log_2 的负对数

** 包括对照血清

讨论

本文介绍了一种新的评价FCS促进细胞生长活性的微量滴定法。将该法和三次连续传代法以及细胞数增加法进行比较, 结果表明, 三种方法所获结果相似, 均可用于鉴定FCS的质量。但是必须指出, 采用三次连续传代法时, 如果接种细胞密度 $>2 \times 10^4/cm^2$, 传代间隔时间长于72小时, 则用于评价某些质量差别不大的血清批数时, 就不能鉴别彼此间的质量差别(未发表的试验结果)。

本文描述的微量滴定试验, 细胞悬液是以二倍间隔(\log_2)进行稀释, 如果以1.5倍间隔进行稀释, 预期可以得到较为精确的结果。

在评价FCS质量所用的方法中, 植板率试验是评价FCS对非常低的细胞密度的促进生

长活性,三次连续传代试验是对高细胞密度,细胞数增加试验是对低细胞密度,而微量滴定试验既评价FCS对高细胞密度也评价对低细胞密度的促进生长活性。

用细胞数增加试验评价FCS对PMK细胞的促进生长活性时,由于PMK细胞悬液中含有许多细胞团块,难以进行精确的计数,因此需在接种细胞后的24小时,把附着的细胞消化下来计数,并把它作为接种细胞数。然而微量滴定试验可直接用PMK细胞悬液进行。

微量滴定试验的优点是:1. 技术操作简单。2. 不需使用电细胞计数器。3. 可用肉眼直接判断滴定终点。4. 特别适用于评价FCS对PMK细胞的促进生长活性。目前作者实验

室已应用微量滴定法常规地测定新生牛血清对恒河猴肾原代细胞和人胚肺二倍体细胞KMB17株的促进生长活性。

参 考 文 献

- [1] Pye, D. 1975, *J. Biol. Stand.* 3: 83—87.
- [2] Puck, T. T. et al. 1956, *J. Exp. Med.* 103: 272—238.
- [3] Goodheart, C. R. et al. 1973, *Appl. Microb.* 26: 525—528.
- [4] Pye, D. 1977, *J. Biol. Stand.* 5: 307—314.
- [5] Babkova, H. & Starek, M. 1979, *J. Biol. Stand.* 7: 275—284.
- [6] Dvorakova, M. & Starek, M. 1980, *J. Biol. Stand.* 8: 107—113.

植物姊妹染色单体区分染色的简易方法

余 其 兴

(武汉大学生物系)

姊妹染色单体区分染色(SCD)是七十年代中期发展起来的染色体处理技术,因为它涉及了细胞动力学、细胞周期、染色体半保留复制、染色体“单线说”以及染色体畸变等一系列的细胞生物学理论问题,此外还能用于分析姊妹染色单体互换(SCE)频率,来检测诱变因素和致癌物质,所以有关SCD的实验技术可作为细胞生物学实验课的更新内容。本文介绍植物SCD的一种简易方法,即以蚕豆根尖细胞为实验材料的BrdU-Feulgen法^[1]。据我们实践体会,采用此法开设实验课具有如下优点:(1)实验程序少,时间短,整个实验可在2.5—3小时内完成。(2)BrdU的掺入是在幼苗悬浮生长过程中进行的,故不需要进行细胞离体培养等烦琐的实验准备工作。(3)实验条件简易,凡已开设过“植物根尖孚尔根压片”实验课的教学单位,均能更新开设此项实验。

一、溶 液 配 制

(1) 500 μM BrdU 溶液:

称取BrdU粉剂15.4毫克,溶于100毫升双蒸水,装入棕色试剂瓶,包黑纸避光,置冰箱(4℃)保存,

(2) 0.05%秋水仙素溶液:

称取秋水仙素粉剂5毫克,溶于10毫升双蒸水。

(3) 3.5 NHCl 溶液:

取浓盐酸(比重1.18)288.8毫升,用蒸馏水稀释至1000毫升。

(4) 席夫(Schiff's)试剂:

配制方法与常规相同,但配比有所改变,即:碱性品红/水/1NHCl/偏重亚硫酸钠=0.5克/100毫升/30毫升/3克。

二、实 验 步 骤

(1) 将蚕豆种子埋入潮湿的锯木屑中萌发。待初生根长3—5厘米时,剪去根尖生长点和胚芽顶端,