

①

直接消化法分离单克隆贴壁细胞

赵迪诚, 龙志高, 郑多, 戴和平, 夏昆

(中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

[摘要] 目的 建立一种高效的贴壁细胞单克隆分离法。方法 将细胞悬液稀释成 4 个密度梯度后接种于分隔开的血纤维蛋白膜层的皿上生长, 克隆形成后吸 0.25% 的胰酶消化, 用移液器头直接挑取。结果 永生细胞系和正常二倍体细胞在 $10 \cdot \text{cm}^{-2}$ 、 $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 两种接种密度时可分离到较多的单克隆, 分离的单克隆永生细胞培养 1 个月左右, 细胞总数可达 10^6 个, 但分离的正常二倍体细胞需培养 1 个半月左右, 细胞总数才达 10^6 个。结论 细胞接种于被分隔成不同区域的血纤维蛋白膜层的皿上, 采用直接消化法可有效获得单细胞克隆, 接种密度以 $10 \cdot \text{cm}^{-2}$ 、 $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 两种为最佳。

[关键词] 单克隆分离; 血纤维蛋白膜层; 直接消化挑取法

[中图分类号] Q813.11 [文献标识码] A [文章编号] 1000-5625(2002)06-0553-03

Separation of adhering cell colonies with a direct digestion method

ZHAO Di-cheng, LONG Zhi-gao, ZHENG Duo, et al.

(National Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To establish a highly efficient method for the separation of adhering cell colonies. **Methods** Cell suspension was diluted gradiently to four different densities and then seeded on a cell culture plate covered with parted fibrinous membranes. After colonies appeared, they were digested directly with 0.25% trypsin and picked out with a pipette tip. **Results** At the density of $5 \sim 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, colonies could be separated most efficiently in both continuous and normal diploid cell line colonies. The cell number could reach 10^6 after one month of culture for a continuous cell line colony and one and a half month of culture for a normal diploid cell line colony. **Conclusion** With the direct digestion method, single cell colonies can be effectively separated from the plate covered with parted fibrinous membranes, when the cell was innitally seeded at the density of $5 \sim 10 \cdot \text{cm}^2$.

Key words: separation of cell colonies; fibrinous membrane; direct digestion method

[Bull Hunan Med Univ, 2002 27(6):0553-03]

各种生物体细胞都可进行体外克隆培养, 但细胞在体外培养时生长繁殖、生命力等均不如体内环境, 能够进行克隆培养的一般是一些永生化细胞。常规使用稀释铺板法筛选单克隆细胞存在以下问题: 费时较长, 筛选的单个细胞不能很好的分裂增生, 密度太小, 细胞容易死亡, 特别是对于不能无限增殖的细胞单克隆的筛选较困难^[1,2]。本实验接种一定细胞密度于分隔成不同小块的血纤维蛋白膜层的皿上, 形成单克隆后经 0.25% 的胰酶消化, 用 tip 直接挑取来分离单克隆, 建立了一种有效的贴壁细胞单克隆分离方法。

1 材料和方法

1.1 材料 凝血酶、牛血纤维蛋白原、柠檬酸钠为

Sigma 公司产品; 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、中国仓鼠卵巢细胞(chinese hamster ovary cell, CHO-K1)由本室提供; F12, RPMI1640 和胰酶为 Gibco 产品; 未灭活小牛血清为杭州四季青公司产品; 35 mm 皿、25 cm^2 培养瓶及六孔板为 Corning 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 和 CHO-K1 细胞生长曲线测定 取生长状况良好处于对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 分 8 组接种, 每组 3 瓶, HUVEC 每瓶接种 5×10^4

个细胞,CHO-K1 每瓶接种 2×10^4 个细胞,以后每天取一组细胞检测计数,取平均值,绘制生长曲线^{3-6]}。

1.2.2 血纤维蛋白膜层制备 ①取 $0.2 \mu\text{g}$ 凝血酶溶于 100 ml 克隆培养液中(F12 或者 RPMI1640),制成 A 液。②取 250 mg 牛血纤维蛋白原,800 mg NaCl 25 mg 柠檬酸钠溶于 1 000 ml 去离子二蒸水中,制成 B 液。③取 B 液 1ml 和 A 液 4 ml 放入培养皿内尽快混合,几分钟后即形成透明胶层^[2],在其上用无菌玻璃针分隔透明胶层成不同小块。

1.2.3 接种细胞 将细胞悬液稀释成 4 种密度梯度接种到经 1.2.2 方法处理的 35 mm 培养皿中。细胞接种密度分别为 $1 \times 10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10^2 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 。每种密度分 10 组,每一组来自同一瓶细胞,置同一培养条件培养。

1.2.4 消化挑取 培养不到一个生长周期观察细胞贴壁情况,记录分散较开的单个细胞,继续培养 15~20 个周期,记录单个细胞克隆形成情况,在显微镜下挑选分散和生长好的克隆,用移液器吸 0.25% 胰酶将细胞消化,转入到 35 mm 皿中或 25 cm^2 培养瓶中继续培养,扩增细胞量,冻存。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 统计分析软件包 10.0 版对不同接种密度下的克隆形成率进行卡方检验,在 $P < 0.01$ 水平比较差异是否具有显著性。

2 结 果

2.1 HUVEC 和 CHO-K1 细胞生长曲线 CHO-K1 的生长周期为 12~18 h, HUVEC 的生长周期为 24~30 h^[7](图 1)。

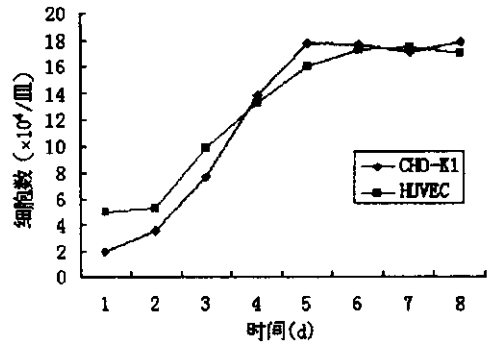


图 1 CHO 和 HUVEC 生长曲线

Fig.1 Growing curve of CHO-K1 and HUVEC

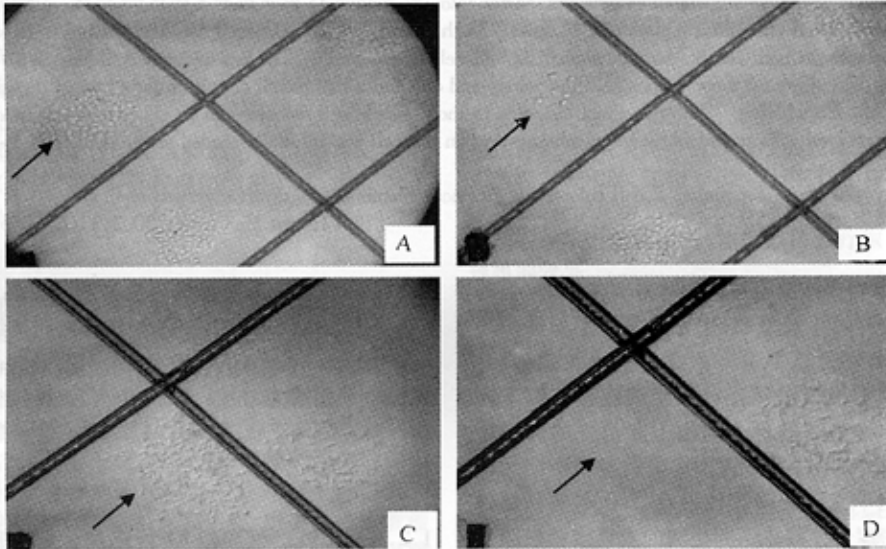


图 2 CHO-K1 及 HUVEC 单克隆细胞 a:分离前 CHO-K1 克隆 b:分离后 CHO-K1 克隆 c:分离前 HUVEC 克隆;d:分离后 HUVEC 克隆

Fig.2 a: preisolated colony of CHO-K1 b: postisolated colony of CHO-K1 c: preisolated colony of HUVEC d: postisolated colony of HUVEC

附表 不同细胞密度克隆形成率的比较

接种密度 (个·cm ⁻²)	CHO-K1 ^①				HUVEC ^②			
	10 ³	10 ²	10 ¹	5	10 ³	10 ²	10 ¹	5
克隆形成率(%)	0.1	1.0	10	50	0.1	1.0	30	80

①CHO-K1 四种接种密度之间比较, $P < 0.01$; ②HUVEC 四种接种密度之间比较, $P < 0.01$

2.2 CHO-K1 单克隆细胞分离 细胞接种密度为 $1 \times 10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10^2 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 时其克隆形成率见表 1。在 $1 \times 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 条件下可分离到单克隆细胞,接种培养 15 个生长周期用无菌 tip 吸 0.25% 胰酶消化(图 2),转入 25 cm^2 瓶中培养,1 个月左右单克隆细胞消化计数达 10^6 个。

2.3 HUVEC 单克隆分离 细胞接种密度为 $1 \times 10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10^2 \cdot \text{cm}^{-2}$, $1 \times 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,其克隆形成率见表 1。在 $1 \times 10 \cdot \text{cm}^{-2}$, $5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 条件下可分离到单克隆细胞,接种培养 25 个生长周期用无菌 tip 吸 0.25% 胰酶消化(图 2),转入 25 cm^2 瓶中培养,1 个半月左右单克隆细胞消化计数达 10^6 个。

3 讨 论

选取已建系的 CHO-K1 细胞和本室培养的 HUVEC 细胞作为实验用细胞,因为 CHO-K1 细胞为永生细胞其分裂增殖能力强,接种密度越稀,挑取到的单克隆数越多;而 HUVEC 细胞为正常二倍体细胞,其分裂增殖能力较差,接种合适的细胞密度,照样可分离到单克隆,但相同单位面积上分离到的单克隆数比 CHO-K1 要少,且克隆生长速度比 CHO-K1 要慢。本方法在制备单细胞悬液时一定要消化成单个细胞,单细胞悬液接种贴壁后一个生长周期内准确记录分散、细胞形态好、周围密度稀的单个细胞位置,待克隆团块经过 15 ~ 20 个生长周期时,便可在显微镜下用无菌 tip 取 0.25% 胰酶消化细胞克隆团块,在显微镜下直接观察消化过程,待细胞变成圆形时,用 tip 吸取,转入到 35 mm 皿或 25 cm^2 培养瓶中培养。

理论上各种培养细胞都可用来进行克隆培养,实际上,原代培养细胞和有限细胞系(二倍体细胞)比较困难,无限细胞系、转化细胞系和肿瘤细胞虽比较容易,但细胞的生长增殖除了取决于细胞特性、培养体系和培养条件外还需要有一定的细胞密度,单个细胞和密度极低的分散细胞很难存活和繁殖^[2]。

常规使用稀释铺板法,每孔接种单个细胞,细胞密度太低,不利于生长,对有限细胞来讲,更加困难;饲养层克隆法,需制备饲养细胞,步骤繁琐,其作为生长基质,用以培养某些难培养的细胞尚有应用价值,此法也考虑到细胞密度问题,琼脂克隆法中的琼

脂是一种简单的生长基质,可帮助细胞贴附生长,但琼脂中含有酸性硫酸多糖,对大多数细胞有一定的抑制性,胶原膜板或血纤维蛋白膜层克隆法的胶原膜或血纤维蛋白膜有利于原代培养细胞黏附,用其代替饲养细胞,可帮助单个细胞和密度极低的分散细胞黏附和贴壁、生长,但周围细胞容易向克隆团细胞处生长^[1]。本方法在吸取稀释铺板法、饲养层克隆法及胶原膜板或血纤维蛋白膜层克隆法的优点上,建立一种既考虑细胞密度,又能把同一培养体系中不同克隆来源的细胞分隔开。在 35 mm 皿上铺上血纤维蛋白膜,并在其上划分隔线,接种一定细胞密度于其中,这样细胞生长具有一定密度,较易存活和繁殖,血纤维蛋白膜有利于原始细胞和密度极低的分散细胞黏附和贴壁、生长,并且血纤维蛋白膜层上的分隔线可阻止周围细胞越过分隔线生长,从而有利于提高单克隆细胞分离的效率。

参考文献:

- [1] 薛庆善,主编. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001. 250 - 257.
- [2] 鄂征,主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社,1995.2.
- [3] 王立岩,佟晓红. 人脐静脉内皮细胞的体外培养、鉴定及形态观察[J]. 白求恩医科大学学报,2000,26(1):26 - 28.
- [4] 何红兵,仲剑平. 人脐静脉内皮细胞长期传代培养[J]. 第三军医大学学报,1990,10(4):312 - 315.
- [5] Jaffe EA, Nachman RL, Backer CG, et al. Culture of human endothelial Cells derived from umbilical cord veins: Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest,1973,52:2745 - 2756.
- [6] Maciag T, Hoover GA, Stemen MB, et al. Serial propagation of human endothelial cell in vitro[J]. J Cell Biol,1981,91:420 - 426.
- [7] 吴岩,祝彼得. 体外人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 的研究[J]. 四川解剖学杂志,2000,8(3):129 - 133.

(本文编辑 傅希文)