

一种杂交瘤细胞复苏装置的复苏效果

宁国伯 曹文飞* 翁志宏** 郭明珠

(第二军医大学 369 研究室, 上海)

在单抗^[1-4]的研制过程中, 为了获得满意的细胞株, 筛选细胞和冻存细胞的工作量甚大。特别是研究细胞分化抗原, 制备人的单抗及 T 细胞杂交瘤, 需要冻存的样品更多。用常规方法^[5]需要通过逐级扩大培养, 很费事。D.E. Wells^[6]利用 96 孔细胞培养板直接冻存, 证明是一种简便快速的方法, 但人们不能随意单孔或多孔复

苏, 故不利于样品的保存和选择。为此, 我们与有关单位协作, 设计制造了细胞复苏装置, 这样就可以根据需要, 有选择的复苏。我们把这种装置应用于绿脓杆菌单抗的制备中, 其效果良好, 达到了简便快速和微量的目的, 节省了人

* 长海医院免疫室。 ** 修理所。

目较多, 经 $0.1\mu\text{m}$ 等效步距扫描后, 得到 13 条

带纹, 其结果与显微照片相近 (图 6—8)。也得到了每条带纹的带宽、带的面积和积分光密度等的定量数据。

图 6 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带的显微照片 ($\times 1200$)

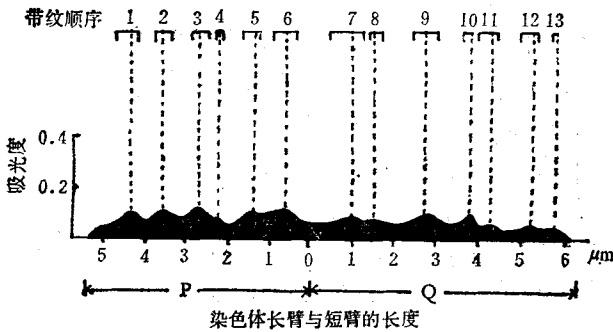


图 7 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带自动分析光吸收分布图

O——着丝粒位置 P——短臂 Q——长臂



图 8 人外周血细胞前中期 1 号染色体 G-带消光三维图

四、小 结

染色体分带的定量研究, 采用扫描显微分光光度计可以得到连续带纹的结构信息, 要获得较准确的结果, 必须很好地解决两个问题。一是扫描步距与测量光阑的配合, 二是滤光步距的正确选择。步距与光阑配合不当, 就会漏掉应有的信息, 为以后的分析造成误差^[6]。滤光步距选值太小, 将有噪声带出现, 选值过大又会滤掉真实的细小带纹。根据我们的经验, 选值以 $0.3-0.4\mu\text{m}$ 为宜。

参 考 文 献

- [1] Zimmer, H. G.: *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Vol. 14, 297, 1973.
- [2] Drots, M. E.: *Computer Programs in Biomedicine*, 8, 283, 1978.
- [3] Wayne, A. W. et al.: *J. Microsc.*, 124, 163, 1981.
- [4] Wall, W. J. et al.: *J. Microsc.*, 133, 335, 1984.
- [5] 陈瑞阳等: 《植物学报》, 21, 3, 1979.
- [6] 胡匡祐: 《细胞生物学杂志》, 6(3), 136, 1984.

[本文于 1985 年 9 月 9 日收到]

力、物力和时间。

方 法

一、设备

细胞复苏装置 由 96 孔细胞培养板、HCR-1 型点温加热器和塑料袋封口 部件 等三部分组成。

耐深低温塑料袋 有关性能见麦智广研究报告^[7]。

二、方法

1. 杂交瘤细胞的复苏方法 复苏时, 将点温加热器插到板孔内, 徐徐移动, 一旦冰块化完, 立刻把细胞悬液吸到培养基中, 洗二次, 进行克隆化培养, 其余样品迅速冻存。

2. 绿脓杆菌单抗的制备方法 用绿脓杆菌 ($3.5 \times 10^8/\text{ml}$, 65°C 灭活) 免疫 BALB/C 小鼠 3 次, 用 ELISA 法测定阳性抗体, 其它与常规方法相同。

3. 细胞复苏的温度与时间效应的测定方法 在细胞培养板板孔 (以下简称板孔) 内加入 0.1ml 冻存液, 在 -20°C 结冰后, 投入液氮罐中, 次日取出板子, 立刻测定板孔内的温度, 我们称之为起始温度 (T_1), 以后用点温加热器给冻存液加热, 一旦冰块化完, 立刻测定温度, 即化冰后的温度 (T_2), 并记录化冰过程 (即复苏过程) 所占用的时间。

结 果 与 讨 论

一、杂交瘤细胞复苏装置的复苏效果

为了观察杂交瘤细胞复苏装置的复苏效果, 我们将抗白色念珠杆菌的杂交瘤细胞株冻存于 96 孔细胞培养板中, 经过一定时间进行复苏, 并克隆化培养, 结果 (表 1) 表明, 该装置基

表 1 杂交瘤细胞复苏装置的复苏情况

细胞株	复苏孔数	每孔冻存细胞数(万)	产生克隆数
A ₂ C ₄	7	1.3	625
II-2	10	2.4	121
II-2	7	3.0	900
X-1	12	4.8	528

本上能达到复苏的目的。但每孔冻存的细胞数与它产生的克隆数相差较大, 我们认为, 这一方面取决于冻存细胞的存活率, 另一方面也取决于克隆化的培养系统, 尤其是小牛血清的质量。在我们的试验中, 使用的小牛血清批次不同, 平均克隆率只有 15% 左右, 因此, 要得到满意的结果, 必须要有较好的培养系统。

二、细胞复苏装置在建立抗绿脓杆菌杂交瘤细胞株中的应用

我们用绿脓杆菌免疫 BALB/C 小鼠后, 进行细胞融合, 结果有两孔能分泌抗体, 经克隆化培养后, 把板子冻存起来, 间隔一周进行复苏, 取其一孔或二孔进行再克隆化培养, 结果表明 (表 2), 基本都能克隆生长。经抽样检测, 原代孔为阳性者, 次代孔仍为阳性, 原代孔为阴性者, 次代孔仍为阴性。但是, 我们也观察到, 每个原代孔接种同样的板孔数, 经次代培养的克

表 2 抗绿脓杆菌杂交瘤复苏后的生长情况

试验号	接种孔数	生长孔数	分泌抗体
1	48	44	+
2	48	14	+
3	96	68	+
4	48	5	+
5	48	48	+

隆数并不一样, 比如, 有时多, 有时少。我们认为, 这与单个杂交瘤细胞的素质有关。由于它们分裂增殖的速度不同, 使原代孔中的细胞数不同, 所以, 次代培养的克隆数也不相同, 该结果提示我们在进行原代培养时, 在不超过对数生长期的情况下, 可增加培养时间, 使板孔内的细胞尽可能多一些, 在复苏时, 细胞数多一些, 选择机率更大。

三、复苏的温度—时间效应

在苏醒过程中, 复苏起始温度越低, 复苏时间就越长, 反之则短。我们把二者的相关性称之为温度—时间效应 (表 3)。如果用复苏时温度的变化 (即零减 T_1) 除以复苏时间 (t), 则在一定时间范围内, 几乎得到一个恒定值。它的物理意义说明, 在单位时间内, 冻存液的温度变化是恒定的。但超过一定时间范围, 随着起始温

表3 复苏的温度—时间效应

板孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
起始温度(T_1 , °C)	-48.2	-38.7	-29.9	-22.4	-21.8	-18.9	-18.1	-14.6	-12.9	-11.9
每孔化冰时间(t_i , 秒)	102	80	64	45.7	46.7	42.7	37.1	37.1	48.4	34.9
(零- T_1)/ t	0.47	0.48	0.47	0.49	0.47	0.44	0.49	0.39	0.27	0.34
化冰后温度(T_2 , °C)	4.4	6.2	6.4	5.8	6.8	7.6	8.7	7.8	11.4	11.8

度的升高,这种恒定关系越来越不稳定,一旦冰块化完,这种关系就不存在了。这在工作中有一定实际意义。比如,室温为14℃冻存液为0.1ml时,其恒定时间大约是20—25分钟,当室温在30℃左右,冻存液仍为0.1ml,其恒定时间只有数分钟。若冻存液为0.2ml,其时间范围可延长到10分钟以上。因此,只要我们正确处理这种关系,使样品保持冰冻状态,则不会影响冻存效果。此外,表3还列举了化冰后的温度(T_2)最高值还低于12℃。它提示我们,点温加热器的热效应,不会导致杂交瘤细胞死亡。

四、细胞复苏装置对杂交瘤细胞存活的影响

我们用点温加热器和自然复苏(37℃温箱中,即 Wells 的方法)进行比较。待两种方法一旦复苏完毕后,立即将细胞悬液吸入到预热的无血清培养基中,1000rpm 离心,洗两次,用台盼蓝染色,显微镜观察并计算存活率,其结果列于表4中。

从表4可知,用两种方法复苏,其活存率几乎一致。这进一步证明,点温加热器的热效应,对杂交瘤细胞的活力影响不大。但是,细胞经

表4 细胞复苏装置与37℃自然复苏的存活比较

实验批号	点温加热器复苏			自然复苏		
	细胞总数(万)	活细胞数(万)	存活率(%)	细胞总数(万)	活细胞数(万)	存活率(%)
1	210.0±45.0	87.1±8.9	41.5	168.0±44.3	59.5±18.0	35.4
2	208.7±30.1	101.5±10.5	48.6	149.3±14.6	74.5±10.3	49.9
平均	209.4±0.7	94.3±7.2	45.1	158.6±9.4	67.0±7.5	42.6

表中1,2批试验均为10次结果的平均值。

反复冻存和复苏,其它生物学活性是否有变化,还需进一步观察。

五、冻存次数对杂交瘤细胞生物特性的影响

为了观察冻存次数对杂交瘤细胞生物特性的影响,我们将杂交瘤A₇C₄等三个细胞系接种于板孔中,待生长到一定细胞数之后,冻存于液氮中,经过一定时间,进行单孔或多孔复苏,由

表5 冻存次数对杂交瘤细胞生物特性的影响

冻存次数	1	2	3	4	5
原代孔活细胞数	540	2459	1327	470	708
染色体数	93 (108—89)		95 (98—93)		90 (95—86)
腹水单抗产值 1/1000 (OD490)	2.11±0.54		2.72±0.14		2.41±0.38

表中各值均为三个数据的平均值
原代孔活细胞数=稀释度×克隆数

于复苏时所用的时间较短,未复苏的样品仍处于冰冻状态,这时将样品迅速冻存,待需要时再复苏,再冻存,如此反复多次。试验结果表明,反复冻存和复苏,对原代孔的活细胞数,染色体数及腹水单抗产值等参数没有明显影响(表5)。

本文承麦智广副教授指导和修改,耐深低温塑料袋由血细胞分离组惠赠,丁振海同志帮助制作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. et al.: *Nature*, **256**, 495, 1975.
- [2] Hanson, J. A. et al.: *Transplantation Proceeding*, **3**, 1133, 1981.
- [3] John, M. et al.: *Exp. Hematol.*, **11**, 332, 1983.
- [4] pallason, G. et al.: *Blut.*, **49**, 395, 1984.
- [5] 刘尔翔等:《杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用》(第一版),人民卫生出版社,北京,34页,1981.
- [6] wells D.E.: *J. Immunology Method*, **59**, 49, 1983.
- [7] 麦智广等:《第二军医大学学报》, **6**, 221, 1985.

[本文于1985年8月21日收到]