

- 4 李银妹. 激光能俘获粒子吗. 现代物理知识, 1991;(5): 30
- 5 韩正甫, 郭光灿. 粒子在单束激光势阱中的束缚力. 中国激光, 1992;19(7): 517

# 一种适合骨髓瘤、杂交瘤细胞生长的无血清培养基\*

邓辉南\*\* 刘秀梵

(江苏农学院, 扬州 225001)

## 提 要

在基础培养液 DME/F12(1:1) 中加入 10 μg/ml 转铁蛋白(T), 5 μg/ml 胰岛素(I), 10 μmol/L 乙醇胺(E), 10<sup>-9</sup>mol/L 亚硒酸钠(S) 及 1mg/ml 牛血清白蛋白(BSA) 等诸种添加剂成分而构成了本试验的无血清培养基, 定名为 LDSF。试验表明, LDSF 可取代常规培养基 DMEM (含 10—15% 胎牛血清), 用于骨髓瘤、杂交瘤细胞的长期传代培养, 支持杂交瘤细胞稳定、持续地分泌特异单克隆抗体 (McAb), 并可用于细胞融合、冻存和复苏。

**关键词** 无血清培养基, 杂交瘤细胞, 单克隆抗体, 添加剂

目前, 大多数动物细胞的体外培养都不同程度地依赖胎牛血清等天然成分。然而, 血清成分复杂, 价格昂贵, 含有 500 种不同的蛋白质, 总蛋白量高达 60—150mg/ml<sup>[1]</sup>。其中一些未知的成分可能会抑制细胞的生长<sup>[2]</sup>, 且存在支原体污染的问题, 给单克隆抗体及其它细胞分泌产物的大规模生产和提纯工作带来了困难; 同时复杂的成分、不同的批号也常干扰实验结果的分析。为此, 我们参照国内外一些实验室无血清培养的报道<sup>[3,13-15]</sup>, 选用国产试剂为主要添加剂, 进一步降低了无血清培养基的成本。实验表明, 我们研制的无血清培养基 LDSF 完全可以取代常规有血清培养基用于支持骨髓瘤、杂交瘤细胞的长期生长和传代。

物: 油酸为国产化学纯试剂。本试验使用了两种不同来源的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。一种购自西德 Serva 公司; 一种为国产试剂。b. 人转铁蛋白 (human transferrin), 本试验使用两种不同来源的转铁蛋白。一种是作者用利凡诺方法<sup>[4]</sup> (rivanol, 一种蛋白沉淀剂) 从正常人血清中 (扬州苏北人民医院惠赠) 提纯人转铁蛋白; 一种购自 Sigma 公司。这两种转铁蛋白均用四蒸水配制 1mg/ml 贮液。0.22 μm 滤膜过滤后, 4℃ 避光保存。c. 胰岛素, 本试验使用了两种不同来源的制剂。一种购自南京生物化学制药厂; 一种购自丹麦 NOVO 公司 (40U/ml, 1mg = 22U)。d. 其它试剂: 乙醇胺、亚硒酸钠、丙酮酸钠、β-巯基乙醇、维生素 C、氢化可的松等试剂均为国产分析纯试剂。

## 1 材料与方 法

### 1.1 无血清培养基 LDSF 的配制

1.1.1 基础培养基 DME/F12 购自 Sigma 公司; 配制参照 Tomoyuki 方法<sup>[3]</sup>。

1.1.2 各种添加剂 a. 油酸白蛋白结合

### 1.2 LDSF 中各种添加剂的成分及浓度

\* 国家“七五”攻关项目。

\*\* 中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080。

收稿日期: 1991-10-04 修回日期: 1991-11-24

牛血清白蛋白为 1mg/ml, 油酸为 4 $\mu$ g/ml, 人转铁蛋白为 10 $\mu$ g/ml, 胰岛素为 5 $\mu$ g/ml, 乙醇胺为 10 $\mu$ mol/L, 亚硒酸钠为 1 $\times$ 10<sup>-9</sup>mol/L, 0.01% 丙酮酸钠,  $\beta$ -巯基乙醇为 10 $\mu$ mol/L, 维生素 C 为 3 $\mu$ g/ml, 氢化可的松为 2ng/ml.

### 1.3 试验所用细胞株

SP2/0-Ag-14, SM-1-4, HH8-2, K99-409 等骨髓瘤、杂交瘤细胞株为江苏农学院家畜传染病教研组提供。D<sub>3</sub>-G<sub>6</sub> 为作者研制的小鼠抗辣根过氧化物酶 (HRP) 杂交瘤株。

### 1.4 细胞生长实验

**1.4.1 同位素标记法** 本试验采用 H<sup>3</sup>-胸腺嘧啶 (H<sup>3</sup>-TdR, 中国原子能科学研究院产品, 放射性浓度 1mCi/ml, 比活性 21Ci/mmol) 作为标记物。使用时用 DME/F12 基础液作 10 倍稀释。具体步骤如下:

三种不同的细胞用 LDSF, HT 及缺少了某种添加剂成分的无血清培养基配制成 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞/ml。分别加入 24 孔细胞培养板中, 除第一天的一块板在加入细胞悬液后立即加入 0.5 $\mu$ Ci/孔的 H<sup>3</sup>-TdR 外, 其余各天的板均从第二天开始逐日加入 H<sup>3</sup>-TdR, 继续培养一天。收集细胞, 加入 3% 冰醋酸, 1500r/min 离心 10min, 洗涤两次。将细胞沉淀物置于 80 $^{\circ}$ C 干燥箱中 1—2h, 待烘干后, 用 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05ml 和浓甲酸 0.15ml 置于 85 $^{\circ}$ C 水浴中消化样品至透明无色。冷却后, 加入闪烁液 5ml [由 PPO (2,5-二苯基噁唑) 5g, POPOP (1,4-双(5-苯基噁唑基-2)苯) 0.2g, 无水乙醇 200ml, 甲苯 800ml 配成]。用美国 Beckman 公司 LS1800 液体闪烁计数器计数掺入细胞的脉冲数 (cpm)。

#### 1.4.2 MTT 方法测定细胞生长曲线

MTT 是一种四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethyl-1-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], 淡黄色, 易溶于水。MTT 经活细胞线粒体中的脱氢酶作用后可氧化成蓝色结晶甲臞, 甲臞经异丙醇作用后溶解显色, 此法简易、准确且无同位素污染, 以此法代替 H<sup>3</sup>-TdR 掺入法可进行细胞代谢活性及增殖反应

的测定。

作者根据 Mosmann<sup>[6]</sup> 的报道做了某些改进, 步骤如下:

几种不同的细胞用 LDSF, HT 及各种缺少某种添加剂成分的无血清培养基配制成 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞/ml, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 $\mu$ l, 于 37 $^{\circ}$ C, 6% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 培养结束前 4h 加入 10 $\mu$ l MTT 试剂。培养结束后, 取出培养板, 在 4 $^{\circ}$ C 下 1500r/min 离心 7min, 弃去上清液, 立即加入 10% 盐酸-异丙醇, 100 $\mu$ l/孔, 充分吹吸混匀后, 于酶联阅读仪 (国营华东电子管厂, DG3022 型) 上, 570nm, 630nm, 滤光片测定, 求出 A(570—630) 的值。

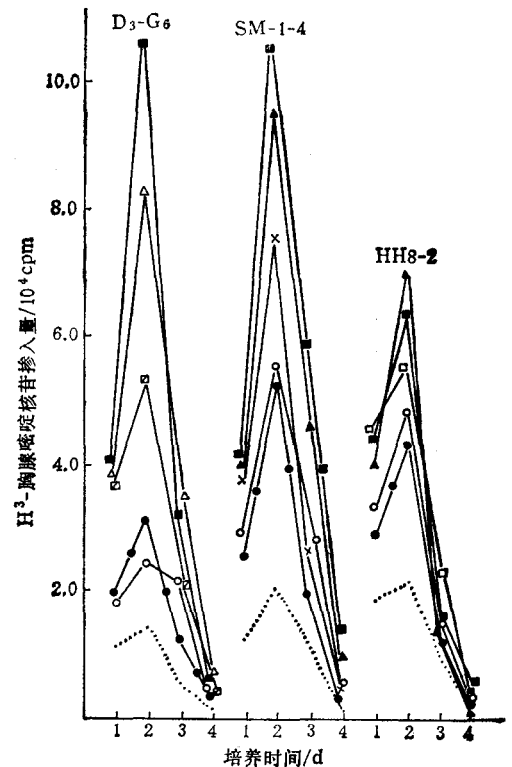


图1 骨髓瘤、杂交瘤细胞的生长曲线 (H<sup>3</sup>-胸腺嘧啶核苷掺入)

- : 缺少转铁蛋白
- : 缺少胰岛素
- .....: 缺少油酸-白蛋白复合物
- \*—\*: 缺少亚硒酸钠及乙醇胺
- ×—×: 缺少Vc及氢化可的松
- : 缺少 $\beta$ -巯基乙醇
- : 缺少Vc、氢化可的松、 $\beta$ -巯基乙醇和丙酮酸钠
- △—△: LDSF (含国产添加剂)
- ▲—▲: LDSF (含进口添加剂)
- : 含15%小牛血清的DMEM

## 2 结 果

### 2.1 无血清培养基 LDSF 中各种添加剂成分对细胞生长的影响

作者采用  $H^3$ -TdR 掺入, MTT 方法, 台盼蓝染色计数等方法测定了骨髓瘤、杂交瘤细胞在 LDSF, HT 及各种缺少了某种添加剂成分的无血清培养基中的增殖情况, 结果见图 1 和 2.

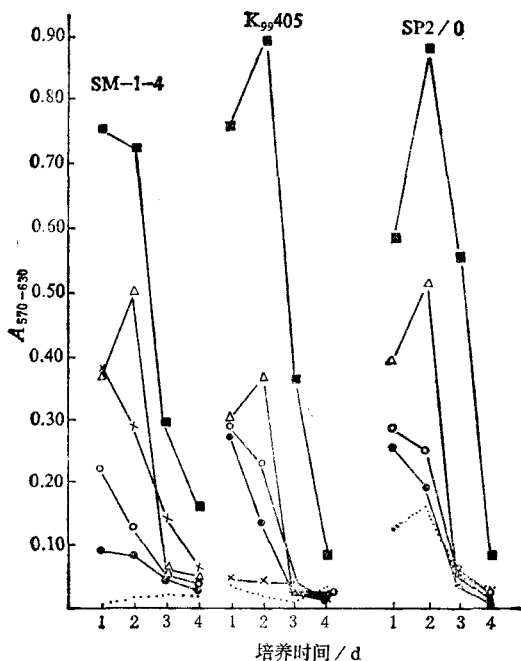


图 2 骨髓瘤、杂交瘤细胞生长曲线 (MTT 方法)  
(图中符号意义同图 1)

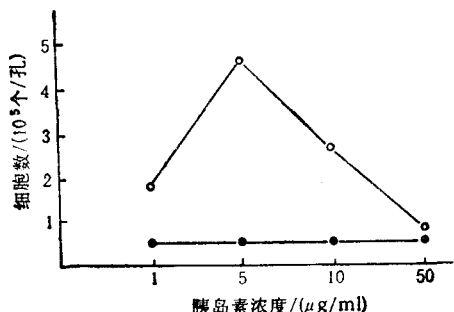


图 3 胰岛素对细胞生长的影响

○—○: 转铁蛋白浓度 5μg/ml ●—●: 不含转铁蛋白

### 2.2 转铁蛋白、胰岛素对细胞生长的影响及在 LDSF 中的最佳添加量 结果见图 3 和 4.

### 2.3 无血清条件下不同起始细胞浓度对细胞增殖速率的影响 结果见图 5.

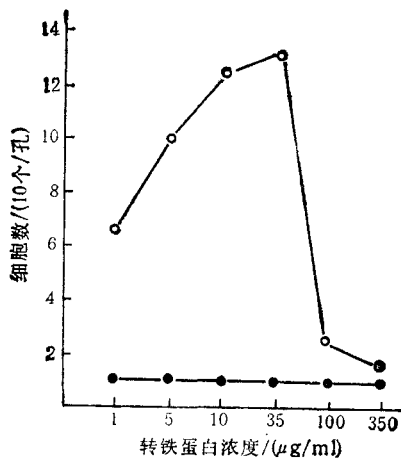


图 4 转铁蛋白对细胞生长的影响

○—○: 胰岛素浓度 5μg/ml ●—●: 不含胰岛素

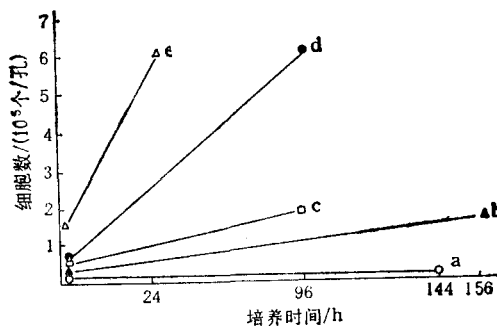


图 5 细胞株: 杂交瘤细胞 SM-1-4

○—○:  $1.4 \times 10^3$  cell/ml ▲—▲:  $1.3 \times 10^3$  cell/ml  
□—□:  $2.8 \times 10^3$  cell/ml ●—●:  $7 \times 10^3$  cell/ml  
△—△:  $1.4 \times 10^3$  cell/ml

### 2.4 骨髓瘤、杂交瘤细胞在 LDSF 中的长期传代培养及与 HT 培养基的比较

我们将原来生长在 HT 培养基中的骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag-14, 各种杂交瘤细胞 SM-1-4 等及在无血清条件下融合并克隆化筛选出的抗 HRP 杂交瘤株 D3-G6 等用 LDSF 进行了长期驯化培养, SP2/0 已传了 135 代, 405 天; HH8-2, K<sub>99</sub>409 已传了 20 代, 60 天; SM-1-4, D3-G6 已传了 50 代, 150 天. 长期培养后对若

干株杂交瘤细胞产生抗体的能力做了检测。SM-1-4 的 LDSF, HT 培养上清的荧光效价都是 1:1000, HH8-2 的 LDSF 培养上清的间接血凝效价达到 1:128, 与 HT 培养上清相一致。经细胞染色体测定,骨髓瘤 SP2/0 及杂交瘤 SM-1-4 的染色体条带平均数分别为 62, 85。以上结果表明 LDSF 能维持骨髓瘤、杂交瘤细胞长期正常生长;支持杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的能力与有血清培养基 HT 相比基本一致。

### 3 讨 论

根据不同的研究对象和目的,国内外研究者对若干种添加剂成分进行了筛选使用<sup>[7-9,11-12]</sup>。但在不同添加剂成分的取舍问题上存在分歧,究其原因,除基础培养液不同外,各研究者所用的不同细胞株代谢方面的差异也是一个因素。我们的研究结果(见图 1 和 2)表明:几种主要添加剂,白蛋白、油酸、转铁蛋白、胰岛素、亚硒酸钠、乙醇胺等都是细胞生长所必需的。缺少任何一种或两种添加剂成分都会严重影响细胞的增生代谢。其中油酸——白蛋白复合物的缺少对细胞生长的影响尤为严重。

在胰岛素、转铁蛋白的用量方面,国内外的研究者也报道不一,大多在 1—40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内变化<sup>[2,7,9]</sup>。我们采用在 LDSF 中减去胰岛素,转铁蛋白中的一种,而逐步增加另一种成分的方法确定出了二者的最佳添加浓度。细胞最初接种浓度为  $2 \times 10^5$  细胞/ml,经过两天的培养,我们发现,不含胰岛素及不含转铁蛋白的 LDSF 不能促进细胞的生长,而当胰岛素浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,转铁蛋白浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,细胞生长最快,从实际效果及成本考虑,我们选用胰岛素,转铁蛋白的最佳添加浓度分别为 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

维生素 C, 氢化可的松, 丙酮酸钠,  $\beta$ -巯基乙醇等刺激细胞增生的作用也是很明显的。

MTT 方法快速、简便,且无同位素的污染。我们将 MTT 法与  $\text{H}^3$ -TdR 掺入法进行了比较,发现二者反映的细胞生长情况基本相符(见

图 1 和 2), 都反映出油酸-白蛋白复合物促进细胞生长的重要性。用两种方法测定的结果也表明,无论是选用国产试剂还是进口试剂作用 LDSF 的添加剂,都能很好地支持细胞生长,可用来完全取代含血清培养基。

一些学者对在不同起始细胞浓度下,血清对杂交瘤细胞的影响进行了研究,他们认为细胞对血清的需求随着细胞浓度的升高而减少,这可能是因为细胞生长的群体依赖性,且高的细胞浓度能为细胞的生长提供一个适宜的环境<sup>[10]</sup>。我们的结果也表明 LDSF 支持骨髓瘤、杂交瘤细胞生长需要较高的细胞起始浓度,这也提示无血清培养基中缺乏血清中的某些成分,难以支持低浓度细胞的生长<sup>[10]</sup>。

我们在无血清条件下进行了细胞的融合及克隆化。经 LDSF 长期驯化的 SP2/0 细胞与 BALB/C 小鼠的脾细胞融合,在无血清条件下有较高的融合率和阳性率,分别为 87.95%, 16.28%(7/43);而未经 LDSF 驯化的 SP2/0 细胞用于融合,在无血清条件下融合率很低且未检出阳性。

我们利用试验也证实了无血清培养基用于细胞冻存和复苏的可行性。

本文的结果表明,在骨髓瘤和杂交瘤细胞的细胞融合和单克隆抗体产生的全过程中,无血清培养基都可用来替代常规的含血清培养基,为今后单克隆抗体的纯化及大规模生产创造了有利条件。

### 参 考 文 献

- 1 McHugh Y E, Walthall B J, Steimer K S. *Biozech*, 1983; 1: 72
- 2 Mark C G, John P T, Pao C C *et al*. Serum-free medium in Lybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983; 32: 1015
- 3 Kawamoto T, Sato J D, Anh Le *et al*. Development of a serum-free medium for growth of mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas. *Analytical Biochemisrry*, 1983; 130: 445
- 4 Curling J M. *Methods of plasma protein fractionation*. New York: Academic Press Inc, 1980: 36—46
- 5 江子卿等.一种适用于骨髓瘤细胞、淋巴细胞杂交瘤细胞生长的无血清培养基CBSF. *生物工程学报*, 1987;3(1): 38

- 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; **65**: 55
- 7 Shacter E. Serum-free medium for growth factor-dependent and independent plasmacytomas and hybridomas. *J Immunol Methods*, 1987; **99**: 259
- 8 Barnes D W, Sirbasku D A, Sato G H. Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells. New York: Alan R Liss Inc, 1984: 237
- 9 Tong H C, Zenon S, Hilary K. Production of monoclonal antibodies in serum-free medium. *J Immunol Methods*, 1980; **39**: 369
- 10 Takazawa Y, Tokashiki M. High-density culture of mouse-human hybridoma in serum-free defined medium. *Biotech Bioeng*, 1988; **31**: 168
- 11 Murakami H, Masui H, Gordon H S *et al*. Growth of hybridoma cells in serum-free medium: Ethanolamine is an essential component. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; **79**: 1158
- 12 Tharakan J P, Lucas A, Pao C C. Hybridoma growth and antibody secretion in serum-supplemented and low protein serum-free medium. *J Immunol Methods*, 1986; **94**: 225
- 13 Schneider Y J. Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum and protein-free culture medium. *J Immunol Methods*, 1989; **116**: 65
- 14 Honma Y, Kasukabe T, Okabe J *et al*: Replacement of serum by insulin, transferrin, albumin, phosphatidyl choline, cholesterol, and some trace elements in cultures of mouse myeloid leukemia cells sensitive to inducers of differentiation. *Experimental Cell Research*, 1979; **124**: 421
- 15 Mather J P, Sato G H. The use of hormone-supplemented serum-free medium in primary cultures. *Experimental Cell Research*, 1979; **124**: 215

## 压电技术对不同红细胞压积血液粘弹性的研究\*

周铁安 聂利华 姚守拙

(湖南大学化学化工系,长沙 410082)

### 提 要

利用高频压电石英晶体的粘弹性、质量、应力多种传感功能,首次用于不同 Hct 人体抗凝血的研究,测量了石英晶体电极上微量血样干燥固化过程的谐振频率  $f_s$  和机械阻尼电阻  $R_q$ 。随干燥固化进行,  $f_s$  开始降低经极小值后突增转慢变化;  $R_q$  则很快增加达极值后迅降而趋稳定。  $f_s$ ,  $R_q$  开始突变的时间、峰值大小均随 Hct 增而降。初步探讨了压电响应与血液粘弹性及血块力学性能之间的关系和这种技术的应用潜力。

**关键词** 压电石英晶体,红细胞压积,粘弹性

压电石英晶体是一种性能优异的传感器,已成功地用于大气和溶液中微量化学成分的测定<sup>[1]</sup>、电化学<sup>[2]</sup>、免疫分析<sup>[3]</sup>、液晶相变研究<sup>[4]</sup>等领域。上述应用主要利用石英晶体对其表面敷层质量的高敏感性能,故常称作石英晶体微天平(QCM)。此外,尚发现石英晶体对敷层的粘弹性<sup>[5]</sup>和应力<sup>[6]</sup>及液体密度和粘度<sup>[7]</sup>等力学量有响应,但一般均作为质量敏感的不利因素而加以避免。本文采用在晶体电极上点滴微量人体抗凝血样的方法,考察了载有不同红细胞压

积(Hct)血样的石英晶体的谐振频率,与机械阻尼响应随时间的变化规律。探讨了压电响应与血液、血块粘弹性等特性之间的关系。初步结果表明这种技术灵敏、需血量极微,可望发展成为一种新型的血液力学性能测试手段。

### 1 材料和方法

#### 1.1 血样的采取与分离

\* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-10-12 修回日期: 1991-12-16