

• 实验技术与方法 •

一种快速高效的人类淋巴瘤母细胞建株方法^①

戴和平 夏家辉 潘 乾 龙志高 李麓芸

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

A Rapid and High-effective Method for Establishing Human Lymphoblastoid Cell Lines

Dai Heping Xia Jiahui Pan Qian Long Zhigao Li Luyun

(The State Key Laboratory of Medical Genetics of China, Hunan Med. Univ., Changsha 410078)

遗传多样性及其资源保存的研究, 是全球性生物多样性研究的重要组成部分。人类突变细胞的保存, 不但是研究人类生物学特征的资源, 也是在细胞和分子水平上开展遗传病基础研究的材料。本文应用浓缩的 EBV (Epstein-Barr Virus) 液转化外周血 B 淋巴细胞, 同时加入环孢霉素 (Cyclosporine) 抑制 T 淋巴细胞⁽³⁾, 整个建株过程不需 CO₂ 孵育箱, 建株成功时间在 20 天左右, 且成功率达 95—100%, 为人类突变细胞的收集、永久保存及其在基因定位、基因克隆等方面的应用创造了条件。

1 材 料 和 方 法

1.1 试剂的制备

1.1.1 200mmol/L 的谷氨酰胺 (Glutamine) 的配制 称取 5.864g 谷氨酰胺 (分子量 146.15), 用双蒸水配制成 200ml, 高压灭菌, 每 100ml 培养基中加 0.5ml, 即最终浓度为 1mmol/L。

1.1.2 淋巴细胞分离液 (lymphocyte isolation, 产地: Pharmacia) 分装成 4ml/瓶(避光), 用前在 37℃ 水浴中加温。

1.1.3 培养基 1640: 血清 (3:1), 内含谷氨酰胺, 用 8%NaHCO₃ 调 pH 至 7.2±。

1.1.4 环孢霉素 (cyclosporine, 产地: SANDOZ PHARMA LTD, Basle, Switzerland) 5ml (250mg) / 瓶, 配制: 母液为 50mg/ml, 取母液 20μl, 加 1640 至 5ml, 即为 0.2μg/μl, 使用时取 10μl 加至 1ml 培养基中, 最终浓度 2μg/ml。

1.1.5 EBV 制备 培养 B95—8 marmoset 逐步增加培养液至 250ml, 最后一次换液后的 6—7 天开始分离 EBV, 即 3 000rpm 离心 15', 将上清液转至另一离心管中, 4℃ 下 10 000rpm 离心

①本文为国家自然科学基金资助项目。

2.5 小时, 弃去 99% 的上清液, 留下 2.5ml, 将 EBV 沉淀物混匀, 再用 10ml 的离心管 3 000rpm 离心 15', 将上清液用 0.45 μ m 的细菌漏斗过滤后分装成 100 μ l/管, -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.1.6 二甲基亚砜 [Dimethyl Sulfoxide, (CH₃)₂SO, 分子量 78.13], 进口分装。

1.2 建株

取外周血 1—2ml, 肝素抗凝 (室温存放 0—24h), 将全血与 2ml 1640 (pH7.2 \pm) 在离心管中混合, 将上述混合血沿管壁慢速注入到含有 1—2ml 淋巴细胞分离液的离心管中, 静置 30', 1 500rpm 离心 15', 离心后可见分为 4 层, 然后用尖吸管吸取白细胞层 (即第二层), 注入离心管, 取 5ml 的 1640 (pH7.2 \pm), 注入含有白细胞的离心管中, 轻轻混匀, 进行第一次洗涤, 1500rpm 离心 15', 吸去上清液, 加 5ml 1640 进行第二次洗涤, 离心 1 500rpm 15', 吸去上清液, 将白细胞接种于含有 1ml 1640 培养基的试管中, 然后加入环孢霉素 (2 μ g/ml) 和 100 μ l 的 EBV 液混匀, 以每分钟 40 次的速度, 置水浴摇床 (37 $^{\circ}$ C) 摇 3 小时, 1 500rpm 离心 15', 吸去上清液, 将细胞接种于含有 1ml 培养基 (1640: 胎牛血清 3: 1) 的试管中, 然后加环孢霉素 (2 μ g/ml) 轻轻混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱。7 天左右开始观察, 视细胞转化和聚集状况及培养液 pH 的改变, 进行半量换液, 并维持环孢霉素的浓度。待转化的淋巴细胞明显增多, 并且指弹见细胞成团, 同时在显微镜下观察可见大量贴壁的呈聚集生长的细胞团, 此时, 可转入 25ml 的小方瓶中 (转瓶时间在 10—12 天之间), 同时加 1—2ml 培养基, 置普通温箱继续培养。转瓶后 3 天观察一次, 视生长状况和 pH 的改变决定是否换液, 待细胞繁殖 4—5 代, 细胞悬液达 50—60ml 时, 在完成染色体核型分析后进行细胞冻存。

1.3 染色体标本制备

从培养的淋巴细胞株中取 5ml 细胞液注入小圆瓶中, 然后加培养基 5ml, 培养 48 小时左右, 加入秋水仙素 (0.4 μ g/ml), 继续培养 2 小时后, 按我室常规进行细胞学处理、制片、GTG 显带及核型分析⁽¹⁾。

1.4 细胞冻存与复苏

细胞株在冻存的前一天必须进行换液及补充新的培养基, 换液 24 小时左右, 将细胞液中聚集细胞摇散, 倒入离心管中 1 200rpm 离心 10', 吸去上清液, 将离心管的沉降细胞吸入到含 10% 二甲基亚砜的培养基中, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 4 小时 \rightarrow -30 $^{\circ}$ C 冰箱 2 小时 \rightarrow -70 $^{\circ}$ C 冰箱 2 小时 \rightarrow 最后置 -135 $^{\circ}$ C 冰箱或液氮中保存。复苏时很快将冻存管放入 40 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌, 争取在 1 分钟之内解冻完, 立即将细胞液吸入到 5ml 1640 培养液中, 1 500rpm 离心 10', 吸去上清液, 加入培养基。

2 结果与讨论

2.1 用上述方法共建株 40 人份, 所有标本都在静置培养 6—7 天时, 其试管底部沉降细胞的周围可见生长晕, 半量换液后轻轻指弹, 10—12 天转瓶, 转瓶后在显微镜下可观察到胞质突出、形态各异、聚集成团的细胞株 (图 1), 以后 3—5 天传代一次, 一般传代 4—5 次后细胞悬液可达到 60ml \pm , 即可冻存。

2.2 我们对一例来自正常供者的细胞株在建株后的 48 天 (即 9 代) 进行了细胞冻存, 冻存 72 天后进行复苏, 复苏后 3 天即可进行传代, 在复苏后的第 4 代 (总 13 代) 进行了染色体众数和核型分析, 未见异常, 并用于 YAC 文库的构建 (图 2)。

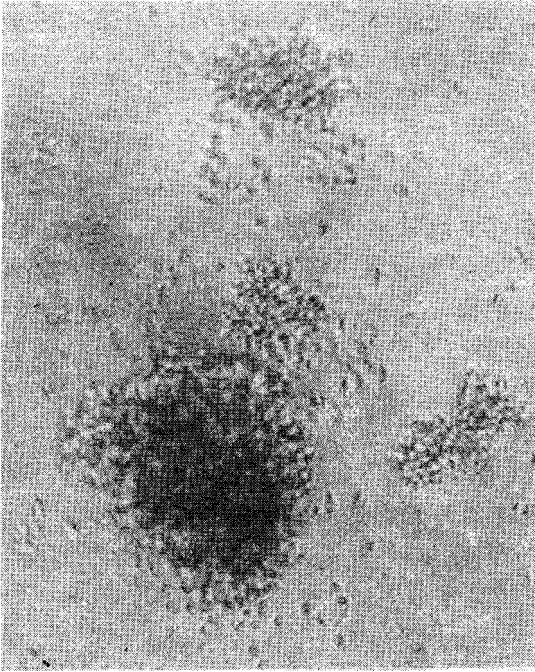


图1 胞质突出、形态各异、聚集成团旺盛生长的细胞株

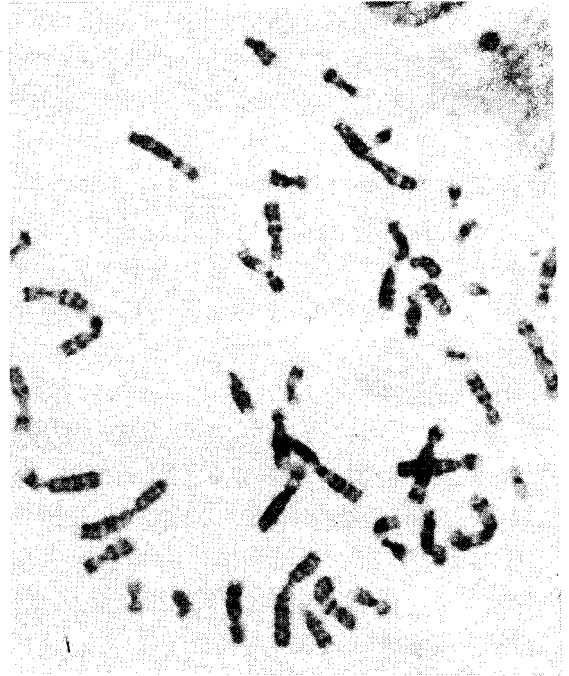


图2 EB 病毒转化淋巴细胞株染色体

2.3 EBV 在体外可选择性地转化 B 淋巴细胞，但同时引起曾感染过 EB 病毒者 T 淋巴细胞的应答反应，而攻击同一培养物中已被 EBV 感染的 B 淋巴细胞，致使转化的 B 淋巴细胞死亡。环孢霉素是一种能在 G_0 到 G_1 期之间选择性地抑制 T 淋巴细胞 RNA 聚合酶 II 的免疫抑制剂⁽²⁾，所以，必须与 EBV 同时加入才能有效地阻止 T 淋巴细胞对 EBV 的应答反应，防止已转化的 B 淋巴细胞因受到 T 淋巴细胞的攻击而退化。本文采用浓缩的 EBV、并同时加入环孢霉素的方法无疑是建株高效的基础。我们曾在同一个供血者、同一次血标本的建株中采用不同的细胞接种密度 (150 万 / ml 和 300 万 / ml)，其结果，150 万 / ml 建株成功，而 300 万 / ml 建株失败，其原因可能是由于白细胞接种密度太大，相对 T 淋巴细胞亦多，环孢霉素加量一样，就有可能使部分 T 淋巴细胞逃脱环孢霉素的抑制，以致攻击已转化的 B 淋巴细胞导致其死亡。因此，在建株中一般采用 1—2ml 血分离的白细胞即可，接种细胞数不应超过 200 万 / ml，必要时可将环孢霉素的量增加至 $6\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

参 考 文 献

- (1) 夏家辉, 李麓芸, 1989. 染色体病, 北京: 科学出版社, 15.
 (2) Brack C, *et al*, 1984. *Exp. Cell Res*, 151: 314—321.
 (3) Neitzel H, 1986. *Hum. Genet.*, 73: 320—326.

本文于 1993 年 5 月 3 日收到。