

液氮保存鱼类细胞的效果

左文功

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

摘 要 鱼类细胞株(系)的保存问题, 是鱼病、遗传育种和生物技术等实验室的一件重要工作, 本文报告了液氮冻存鱼类细胞的二种方法。(1) 倒去要保存细胞的培养液, 加入预冷的冰冻保护液, 用自制的小橡皮头将细胞从瓶壁上推刮下来, 吹打分散、计数, 然后分装到安瓿内, 封口后普通冰箱放置 2 小时, 再转到 -20°C 低温冰箱放置 2 小时, 最后转到液氮罐内, 在气态位置放半小时后沉入液氮中。(2) 第二种方法与第一种方法的主要不同点是要保存的细胞不是用橡皮推刮下来, 而是用胰酶-EDTA 混合消化液消化下来, 其余步骤均相同。通过 10 多年保存淡水鱼类细胞的实践, 作者认为用上述两种方法都是可行的, 而且最长已有保存 10 年的历史。本文还对保存细胞的有关问题进行了讨论。

关键词 液氮, 鱼类, 细胞, 冷冻保存

鱼类细胞株(系)的保存问题, 是鱼病、遗传育种和生物技术等实验室的一件重要工作。作者等(1986)^[1]曾报告了我们实验室为了方便研究工作, 短期保存鱼类细胞的温度为 20°C , 在这个条件下恒温箱内放置的各代细胞, 数个月仍可传代。但是为了减轻工作量、防止细胞变异和污染丢失, 应用液氮长期保存细胞, 亦是必须做的工作。

我国鱼类细胞培养研究已有 10 多年历史, 但是迄今为止尚未见关于液氮冻结保存鱼类细胞效果的系统报告。细胞保存效果除液氮本身的作用外, 与冻结的前期处理, 冻结和复苏方法亦是紧密相关的, 作者结合应用曾做过多项试验, 细胞保存的年代亦比较长, 现将作者认为比较满意的方法报告于后。

材 料 与 方 法

(一)细胞

本文报告的保存细胞为作者等建立的草鱼肾组织细胞系 CIK 和草鱼肝组织细胞株 L8824。

(二)冰冻保护液

在含 10% 小牛血清的 EagleMEM (日本制药株式会社生产) 中添加 10% 的分析纯甘油, 即为保护液。

(三)冻存方法

(1) 倒去要保存细胞的培养液, 加入预冷的冰冻保护液, 用自制的小橡皮头将细胞从

瓶壁上推刮下来,吹打分散,计数,然后分装到安瓿内,封口后普通冰箱放置2小时,再转到 -20°C 低温冰箱放置2小时,最后转到液氮罐内,在气态位置放置半小时后沉入液氮中。

(2)第二种方法与第一种方法的主要不同点是要保存的细胞不是用橡皮头推刮下来,而是用胰酶-EDTA混合消化液消化下来,其余步骤均相同。要注意的是消化时间不能太长,避免细胞丢失,当认为消化时间应终止时,迅速倒去消化液,若认为消化时间不够,倒去消化液后还可放置片刻,这时尚有未倒尽的余液,消化尚可继续进行,直到消化充分,再加入预冷的保护液,然后吹打分散,计数。

上述两种方法在加保护液时,都要事先按比例算好,宁少勿多,因为细胞浓度太大可以加点保护液,这样操作比细胞浓度不够,再离心浓缩细胞的手续,简便多了。

(四)复苏方法

从液氮中取出安瓿瓶,迅速放入 $37-40^{\circ}\text{C}$ 温水中融化,然后用微型离心沉淀器(3500转/分)离心15分钟,细胞沉下来后带入无菌室,吸出保护液,加入培养液,将沉下来的细胞慢慢吹打分散后再吸出,转入培养瓶培养,3-5天后换一次新鲜培养液,直到长成单层传代。

结 果 与 讨 论

(一)液氮保存鱼类细胞效果

实例一:草鱼肾组织细胞系CIK第96代细胞,按上述第一种方法冻存,保存细胞数每毫升约含100万个。1984年4月4日放入液氮。

1985年3月25日复苏一瓶,3月28日换新鲜培养液,4月5日原瓶传代,长势很好。

1987年10月20日再复苏一瓶,10月24日换新鲜培养液,10月25日长势很好,10月27日长成单层。

1993年12月24日又复苏一瓶,12月28日换新鲜培养液,12月29日细胞长势较好,1994年1月12日传代(1传2),次日长满单层,1月21日第二次传代(1传2),次日亦长满单层。

实例二:草鱼肝组织细胞株L8824第12代细胞,按上述第二种方法冻存,保存时细胞数每毫升约含117万个。1990年1月18日放入液氮。

1993年10月22日复苏一瓶,10月26日有细胞生长,换新鲜培养液,11月8日观察仍有细胞生长,但进展不快。12月6日观察,细胞已长满单层。12月13日传代(1传2),12月15日老瓶已长满,新瓶长势亦好。

实例三:草鱼肾组织细胞系CIK第81代细胞,冻存方法基本上按第二种进行,略有不同的是,开始在普通冰箱放4.5小时,以后转入 -20°C 低温冰箱放置2小时,由于大多数安瓿瓶内细胞冰冻保护液尚未结冰,又转入另一低温冰箱续放置1小时,然后放入液氮气态部份约10分钟,再沉入液氮中。保存时细胞数每毫升约含115万个。1983年11月15日放入液氮。

1984年2月16日复苏二瓶(二个安瓿瓶合一瓶培养),2月19日换新鲜培养液,开

始长势不好,到3月3日才有所好转,换液,3月6日有几处细胞已长成片,3月15日又换液,4月17日长势较好,可以传代。

1993年11月2日再复苏一瓶,11月6日换新鲜培养液,开始长势不好,到12月27日有几处细胞已长成片,28日换液,29日长势较好,1994年1月12日又换液,21日传代(1传2),22日老瓶已长成单层,新瓶长势亦好。

通过10多年保存淡水鱼类细胞的实践,作者认为用上述两种保存细胞方法都是可行的,而且最长已有保存10年的历史。

(二)讨论

1. 冻存细胞时,细胞进入液氮前应掌握缓慢冷冻,出液氮罐时要快速融化^[2,3],这是冻存细胞时应该知道的常识,不是讨论的范畴,不过在本文提一提还是有必要的。
2. 有个别作者提出胰蛋白酶消化的细胞不宜作冰冻保存,作者很注意这个观点。本文介绍的两种冻存方法,一种就是胰酶-EDTA消化法,一种就不是消化法。经过几年的实践,作者采用胰酶-EDTA消化的细胞,经冰冻保存4年、5年、甚至10年,仍然可以达到复苏传代的目的。但是相比之下,作者认为不用消化法,而用橡皮头推下来的细胞,经冰冻保存成活率较高,复苏后很快长成单层,实例一的三次复苏生长情况就是证明。
3. 保存的细胞应是生长旺盛,已长成单层的细胞。冻存前1~2天,单层细胞不需要更换新鲜培养液,复苏后同样可以达到很好效果。
4. 冻存的细胞要想成功地复苏,保存时的细胞浓度亦相当重要,一般认为要达到每毫升含200~500万个细胞^[2,4],能达到这个量当然很好,但工作量较大,作者认为每毫升细胞数能达到100万个以上就可以了。
5. 在细胞复苏过程中,细胞生长未达到传代要求时,千万不要急于求成,应经常观察,隔数天换培养液一次,让细胞长成单层或接近单层方可传代,若1传2勉强,可进行原瓶传代。
6. 在细胞冻存的前期处理和复苏过程中,应尽量减少操作程序,如细胞离心等,这样可减少工作量和细胞污染的机会。我们上述的操作程序是比较简便可行的方法。
7. 从实例三可以看出,保存的细胞虽然保存时间已有10年,但是复苏后长成单层的时间较长,分析原因,一方面可能是用消化法的关系,另一方面可能是未能严格按保存方法各步骤放置的时间进行而造成。
8. 液氮罐亦容易损坏,应经常注意,及早发现,避免前功尽弃。

参 考 文 献

- [1] 左文功等,1986.草鱼肾组织细胞系CIK的建立及其生物学特性.水产学报,10(1):11-17.
- [2] G·D·华斯莱编,何申等译,1982.动物组织培养技术,250-255.科学出版社.
- [3] 中国医学科学院流行病学防治研究所编,1978.常见病毒实验技术,76-77.科学出版社.
- [4] 戴华生等编著.1983.新实验病毒学,141.中国学术出版社.

EFFECT OF FISH CELL STORAGE IN LIQUID NITROGEN

Zuo Wengong

(Changjiang River Fishery Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shashi 434000)

ABSTRACT The present paper reports the two methods for fish cell storage in liquid nitrogen: 1) the dispersion of the cells with 0.1% trypsin in EDTA.PBS solution, and 2) the scraping of the cells off flask walls and their direct dispersion in Eagle MEM plus 10% glycerin. Both methods prove effective for cell storage in practice. Up till now, the cells that have been stored for 10 years can still be subcultured. Besides, some questions on cell storage are also discussed.

KEYWORDS Liquid nitrogen, Fish cell, Frozen preservation