

细胞生长促进试验筛选新生牛血清

高丽美 陈俊斐 颜建国 冯敏 许玲敏 忻亚娟 陈念良 庄成

【摘要】目的 建立适合人二倍体细胞培养血清的筛选方法。**方法** 通过测定细胞倍增时间和进行细胞生长促进试验对 15 批次的新生牛血清作了筛选, 并将筛选出的 11 批次血清用于大规模细胞培养, 观察细胞的生长维持情况。**结果** 发现细胞倍增时间与相对增长率无明显相关性 ($P > 0.05$)。在大规模细胞培养中, 相对增长率 97% 以上的血清更适合二倍体细胞生长。**结论** 细胞生长促进试验比细胞倍增时间测定更能客观地反映血清促人二倍体细胞的生长能力。细胞生长促进试验可能是较佳的, 筛选适合人二倍体细胞培养的血清的方法

关键词: 新生牛血清; 细胞倍增时间; 细胞生长促进试验; 人二倍体细胞

中图分类号: R33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-0931 (2008) 08-0012-02

Screening of Newborn Calf Serum by the Method of Cell Growth Promotion Assay

GAO li-mei, CHEN Jun-fei, YAN Jian-guo, et al. (Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, Zhejiang, 310013, China.)

【Abstract】Objective To establish a screening method of serum suitable for culture of human diploid cells. **Methods** Two methods of determination of cell doubling time and cell growth promotion assay were used to screen the newborn calf serum (NCS). A total of 11 in 15 different batches of NCS were selected and used for larger scale cell culture so as to observe the cell growth status. **Results** There was no significant correlation between the cell doubling time and relative growth rate ($P > 0.05$). The NCS which the relative growth rate of cells cultured in was above 75% was more suitable for the growth of human diploid cells in larger scale culture. **Conclusion** The method of Cell growth promotion assay is better than the one of determination of cell doubling time in reflecting the growth ability of human diploid cells in the serum. Cell growth promotion assay is a more suitable method for screening NCS used for human diploid cells culture.

【Key words】 Newborn calf serum; Cell doubling time; Cell growth promotion assay; Human diploid cell

在细胞培养中, 新生牛血清 (NBCS) 具有极其重要的作用, 但由于血清是一种很复杂的混合物, 往往会因小牛产地、出生后采血时间等不同, 造成其批次间质量的差异^[1], 所以众多应用新生牛血清进行生产的企业, 会通过各种筛选方法, 选择适合本企业细胞培养的、质量稳定的血清。本实验拟通过对细胞倍增时间测定, 生长促进试验两种筛选方法进行比较, 以建立适合人二倍体细胞培养的最佳血清的筛选方法。

材料与方 法

1 新生牛血清 15 批次筛选新生牛血清分别由杭州四季青生物工程材料有限公司, 郑州佰安生物工程有限公司, 兰州民海生物工程有限公司提供。对照新生牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司提供。

2 人胚肺二倍体细胞 人胚肺二倍体细胞 (KMB17) 由本

所细胞室提供。

3 细胞培养液 由本所配液室提供。

4 细胞倍增时间测定^[2]

4.1 人胚肺二倍体细胞 (KMB17), 代数 23 代, 经胰蛋白酶消化, 加入含 10% 筛选血清细胞培养液, 细胞计数, 按 1×10^4 / ml 的细胞浓度接种于 24 孔板, 每批血清接种 8 孔, 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养, 每天计数 1 孔细胞, 连续观察 1 周。

4.2 细胞倍增时间的测定, 取细胞峰值前一天计得数 (Y)、接种细胞数 (X) 及生长时间 (T) 计算倍增时间, 倍增时间 = T/A $A = \log_2 Y/X$ 。

5 细胞生长促进试验^[3]

5.1 人胚肺二倍体细胞 (KMB17), 代数 23 代, 经胰蛋白酶消化, 加入无血清的细胞培养液, 将细胞浓度调至 2×10^5 , 取 9.5ml 注入 25cm² 塑料瓶, 再加入 0.5ml 待筛选或对照血清, 配制成 5% 血清浓度的生长液, 每批血清培养 3 瓶, 37℃ 培养。

5.2 7d 后, 细胞经胰蛋白酶消化, 将每批血清的 3 瓶细胞

作者单位: 浙江省医学科学院, 浙江杭州 310013

混合计数, 再按 5.1 方法传代。

5.3 连续传 3 次, 每次传代时细胞先用无钙镁 Hank's 液洗 2 遍, 以消除前次血清的影响。最后一次传代 7d 后, 计算相对生长率 (RGR), $RGR\% = \text{每瓶筛选血清平均细胞数} / \text{每瓶对照血清平均细胞} \times 100\%$ 。

5.4 大规模细胞培养^[4], 细胞长成致密单层, 用胰酶消化, 按 1: 3 比例传代; 传到一定数量后维持, 定期更换维持液。每天通过显微镜观察细胞生长维持情况。

结 果

采用细胞倍增时间测定和生长促进试验两种方法筛选 15 批次的新生牛血清, 选用 SPSS 统计软件, 发现细胞倍增时间与相对生长率无明显相关性 ($P > 0.05$)。

将筛选出的细胞倍增时间在 22h 以内的 11 批次血清用于大规模细胞培养。细胞分裂时呈梭形或星形, 胞质向外伸出多个长短不一的突起^[5], 细胞透明, 一个视野见少量

死细胞的定为细胞生长 + + + ; 细胞维持时呈长梭形, 折光性强, 一个视野见少量死细胞, 无细胞卷脱的定为细胞维持 + + + , 结果相对生长率 97% 以上的血清细胞生长维持为 + + + , 6 号、13 号血清细胞倍增时间虽短, 但细胞生长维持为 + + , 见表 1。

讨 论

血清是细胞培养中重要的原材料, 对培养起着关键的核心作用。应用血清培养二倍体细胞进行生产的企业, 常规按《中国生物制品主要原辅材料质控标准》2000 版规定, 通过细胞生长曲线、倍增时间等来筛选血清。但在大规模细胞培养中, 有时会发生血清促细胞生长能力与筛选时不一致, 影响细胞培养, 从而影响到生物制品的质量。

生长促进试验通过减少血清的浓度, 每 7d 传代一次, 连续传代三次的方式, 这样可以真实地检测出每批血清支持细胞增殖的能力, 而不受预先使用的残余培养基的影响, 减少实验误差^[6]。本实验结果也说明细胞生长促进试验比细胞倍增时间测定更能客观地反映血清促人二倍体细胞的生长能力, 是筛选适合人二倍体细胞培养的血清的较佳方法。

参 考 文 献

- [1] 马忠仁, 冯玉萍, 李倬, 等. 反复冻融新生牛血清对促细胞生长效应的影响 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32 (11): 32~33.
- [2] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品主要原辅材料质控标准 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 57.
- [3] GIBCO. Product Catalogue and Reference Guide. 1995~1996. 5~3.
- [4] [英] R. J. 弗雷谢尼. 动物细胞培养基本技术指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2006. 496~507.
- [5] 程宝鸾. 动物细胞培养技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. 75~80.
- [6] 刘雄伯, 林焯唐, 梁克理, 等. 细胞连续传代培养试验评价新生牛血清促进细胞生长活性的研究 [J]. 生物学杂志, 1990, 37 (5): 13~15.

(收稿日期: 2007-12-03)

表 1 两种方法筛选新生牛血清结果

血清编号	细胞倍增时间 (h)	相对生长率 (%)	细胞生长	细胞维持
1	24 68	91.4	ND	ND
2	22 15	92.3	ND	ND
3	23 77	94.5	ND	ND
4	20 36	97.6	+++	+++
5	18 95	108.3	+++	+++
6	19 76	93.2	++	++
7	18 34	105.0	+++	+++
8	21 19	97.0	+++	+++
9	18 53	113.0	+++	+++
10	19 67	106.5	+++	+++
11	26 24	82.6	ND	ND
12	20 41	99.5	+++	+++
13	20 09	93.0	++	++
14	21 74	94.5	++	++
15	20 26	98.0	+++	+++

(上接第 11 页)

expression and bile acid production [J]. Lipids, 2005, 40: 455~462.
[6] Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, et al. Compartmental modeling to quantify alpha linolenic acid conversion after longer term intake of multiple

tracelboluses [J]. Lipids, 2005, 40: 1474~1483.

[7] Taouis, Mohammed. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle [J]. Am J Physiol, 2002, 282: E664~671.

(收稿日期: 2007-10-17)