doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2020.10.09

六种哺乳动物细胞系染色体制片条件优化研究

王 磊, 杨承槐, 刘 莹*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2020 - 06 - 22 [文献标识码]A [文章编号]1002 - 1280 (2020) 10 - 0063 - 06 [中图分类号]Q81

[摘 要] 为提高胞核学检验的检查效率,采用 6 种具有种属代表性的常用传代细胞系对影响检验的关键步骤(染色体制片条件)进行优化,并对这六种传代细胞系的染色体数目进行了统计。实验以 CHO、BHK - 21、ST、OA3.Ts、MDBK、RK - 13 六种疫苗生产中常用的传代细胞系作为材料,对影响染色体制片效果几个主要条件(秋水仙素浓度、KCl 浓度及低渗处理时间)进行了优化,并对这六种细胞染色体数目分布进行了检查。结果发现,在细胞用 25 cm^2 细胞培养瓶 1∶2 比例传代 24 ~ 48 h 时,秋水仙素浓度为 1 μg/mL,处理 60 min 后处在中期分裂相的细胞最多,视野中染色体长度适中;用 0.4% KCl 溶液低渗处理 40 min,细胞中染色体在载玻片上形态最佳,分散度最好。优化后的染色体制片条件,可适用于多种细胞的染色体制片,结果重复性好,染色体形态和分散度均满足胞核学检验要求,可为胞核学检验的流程标准化制定提供有益参考。

[关键词] 胞核学检验;染色体制片;条件优化;传代细胞系

Optimization of Chromosome Production Conditions for Six Mammalian Cell Lines

WANG Lei, YANG Cheng - Huai, LIU Ying*

(*China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*)

Corresponding author: *LIU Ying*, *E - mail*: *liuying*8943@163.*com*

Abstract: In order to improve the efficiency of karyotype analysis, different chromosome conditions were compared to optimize this key step affecting whole process by employing six common cell lines, and the number of chromosomes in these six cell lines was counted. Six mammalian cell lines CHO, BHK - 21, ST, OA3.Ts, MDBK and RK - 13 were used to explore the optimized terms such as colchicine concentration, KCl solution concentration and low osmotic treatment time, which play major roles in chromosome slicing. The distribution of chromosomes was also observed. The results showed that the number of metaphase cells reached up to the most and chromosome lengths were moderate when cells were sub - cultured in 25 cm^2 cell culture flask at a ratio of

基金项目: 国家微生物资源平台(NIMR - 5);中国兽医药品监察所所级课题(201808)

作者简介: 王 磊,助理研究员,从事细胞株鉴定、质控和保藏管理工作。

通讯作者: 刘 莹。E - mail:liuying8943@163.com

1∶2 for 24 ~ 48 hours, with being treated by colchicine for 60 min at the concentration of 1 μg/mL. Chromosome morphology and the diapersity both presented the best when treated with 0.4% KCl solution for 40 minutes. With a good repeatability, the optimized conditions of chromosome slicing preparation could be applied to many kinds of cells, of which chromosome morphology and dispersion meet the requirements of karyotype analysis. This study provides a useful reference for the procedure standardization of the karyotype analysis.

Key words: karyotype analysis; chromosome preparation; condition optimization; cell lines

与哺乳动物原代细胞相比,传代细胞系在生物制品研发、生产过程中具有突出的优势[1],已有多种传代细胞系成功应用于生物制品生产、检验的各个环节[2]。传代细胞系自身的特性(诸如染色体特性、致瘤性等)与生物制品的安全性息息相关。因此,国内无论是人用还是兽用生物制品法典都明确要求特定的传代细胞系或二倍体细胞作为疫苗生产用基质前,必须对特定代次进行胞核学检验[3-4]。细胞染色体制片是胞核学检验中的重要环节,影响因素较多,对环境和操作的要求较高,任何一个条件控制不好都会导致细胞染色体分散度差、长度不适于观察计数、结果重复性不好,进而影响到后续的检验结果[5-6]。

国家兽医微生物菌种保藏中心(国家兽医微生物资源平台)保藏的仓鼠肾细胞(BHK-21)、中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)、猪睾丸细胞系(ST)、羊睾丸细胞系(OA3.Ts)、牛肾细胞系(MDBK)、兔肾细胞系(RK-13)既具有种属代表性又是生物制品研发和生产中的常用生产基质[7-8]。本研究参考人类羊水细胞以及多种原代细胞的染色体制备方法,对以上 6 种哺乳动物细胞系的染色体制片条件进行优化研究,旨在对鼠源、猪源、羊源、牛源、兔源传代细胞系的染色体制片提供有益借鉴和参考。

1 材料方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 细胞系 BHK-21 细胞第 55 代,批号 20170719;CHO(代次不明),批号 20160721;ST 细胞第 125 代,批号 20170621;OA3.Ts 细胞第 29 代,批号 20160806;MDBK 细胞第 9 代,批号 20170623;RK-13 细胞第 24 代,批号 20181130;均来自国家兽医微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试剂及培养基 秋水仙素(沃凯,批号 20171202)配制成 100 μg/mL 溶液、固定液(甲醇(沪试,批号 20170821):乙酸(国药集团,批号 20161010)=3∶1)、KCl(Vetec,批号 wxbc4662v)配制成 0.4%(g/V)溶液和 0.075 mol/mL 溶液、DMEM(Gibco,批号 8119416)、胎牛血清(PAN,批号ST170802)、0.25% EDTA-胰蛋白酶(Gibco,批号 1953147)、0.01 mol/L PBS 缓冲溶液(实验室配制)、吉姆萨染液(Solarbio,批号 20161124)。

1.1.3 主要仪器 Leica 核型分析系统(型号 CyoVision capture station)、Hettich 离心机(型号 320R)、Thermo CO_2 培养箱(型号 Heracell 240i)、Nikon倒置显微镜(型号 TS100)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养条件 分别将冻存管中的 CHO、BHK-21、ST、OA3.Ts、MDBK、RK-13 六种细胞在 37 ℃水浴中融化后,各加入含 10 mL DMEM 培养基(10%胎牛血清)的 25 cm^2 细胞培养瓶中,放置在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2.2 染色体制片 待 6 种细胞均长成良好单层时,以 1∶2 比例传代至相应瓶数。随后分别按照以下方法进行制片条件的优化(表 1)。

传代后培养 24 h 时滴加秋水仙素(终浓度分别为 1 μg/mL、4 μg/mL、7.5 μg/mL)处理 1 h。随后吸净培养液,加 1 mL 胰酶消化中和后,充分吹散细胞。1 200 r/min 离心,8 min 收集细胞沉淀。细胞沉淀中加入 8 mL KCl 低渗液(浓度分别为 0.4%和 0.075 mol/mL),将细胞沉淀团块吹散后室温处理不同时间(20 min、40 min、60 min);然后加入 3 mL固定液,混匀,1 200 r/min 离心 8 min,弃掉上清液。重复滴加固定液、离心处理两次后,重悬

于 2 mL的固定液中。将固定处理好的细胞滴在 -20 ℃预冷的干净玻片上,干燥后,用 Giemsa 染色液浸泡 8 min,用纯化水轻柔冲洗干净。对分散较好的单个细胞的染色体视野用 CytoVision System (Applied Imaging)软件进行图像拍摄并统计染色体数目,共统计 50 个以上细胞的染色体条数。

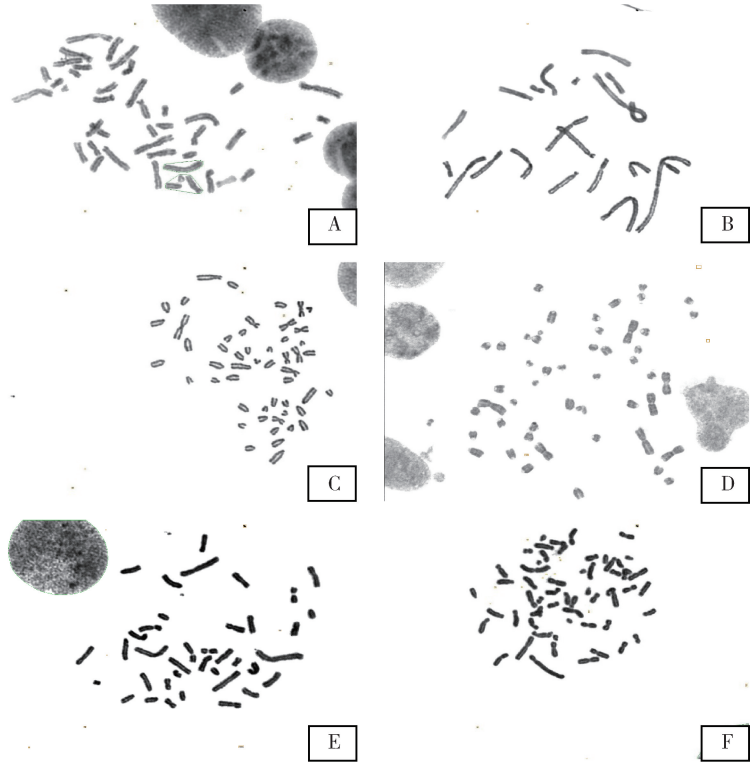
表 1　染色体制片优化条件选择

Tab 1　Selection of optimal conditions for chromosome production

细胞名称	秋水仙素浓度/(μg·mL^{-1})	KCl 浓度	低渗时间/min	所需培养细胞瓶数(T25 瓶)
MDBK	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18
OA3. Ts	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18
BHK - 21	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18
CHO	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18
ST	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18
RK - 13	1、4、7.5	0.4%(g/V)、0.075 mol/mL	20、40、60	18

2　结果与分析

本实验通过对不同细胞在不同秋水仙素浓度、低渗液浓度、低渗液处理时间的条件摸索发现,以上六种细胞系用 25 cm^{2}细胞培养瓶传代后培养 24 ~ 48 h,1 μg/mL 的秋水仙素处理 60 min,处在中期分裂相的细胞最多,视野中染色体长度适中,用 0.4% KCl 溶液低渗处理 40 min,细胞中染色体在载玻片上形态最佳,分散度最好(图 1)。



A:BHK - 21 细胞;B:CHO 细胞;C:MDBK 细胞;　D:OA3. Ts 细胞;E:ST 细胞;F:RK - 13 细胞

A:BHK - 21 cell; B:CHO cell; C: MDBK cell; D:OA3. Ts cell; E:ST cell; F:RK - 13 cell

图 1　条件优化后的六种传代细胞系染色体制片效果(100 倍油镜观察)

Fig 1　Chromosome slicing effect of optimized six cell lines (100 - fold oil microscopic observation)

镜下观察六种传代细胞的染色体的形态和结构,高倍镜下挑选 50 个以上染色体轮廓清晰分散良好的处于中期细胞,精确计数每个细胞的染色体数,通过统计确定六种细胞众数结果(表 2)。

表 2　六种细胞染色体条数统计结果

Tab 2　Mode number of chromosomes of six cell lines

统计项目	MDBK	OA3. Ts	BHK – 21	CHO	ST	RK – 13
染色体数目范围	49 – 53	42 – 61	36 – 45	18 – 24	33 – 40	56 – 62
众数	52	50	42	20	38	58
众数占细胞总数比例/%	43.9	36.3	30.6	64	67.1	54

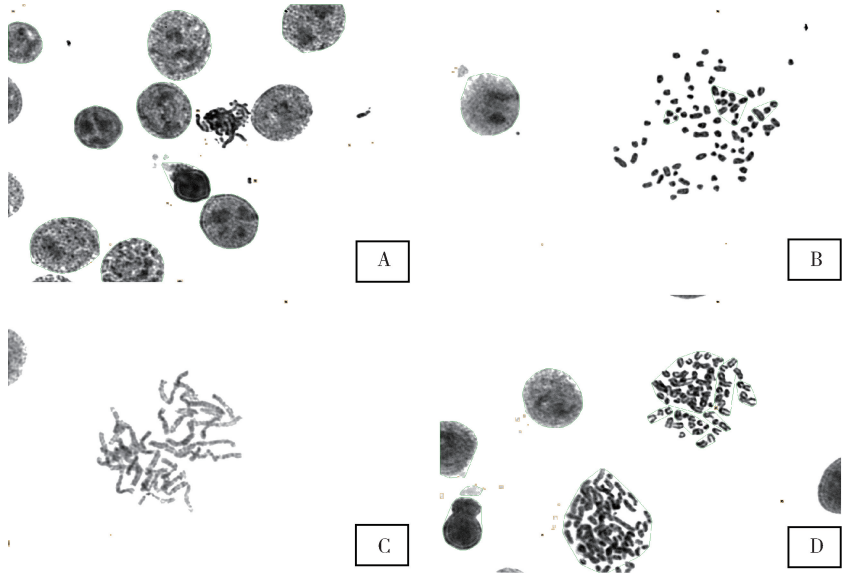
3　讨论与结论

由于细胞染色体的核型作为一种特异性的细胞遗传信息很好地表现出自身的种质特性[1],因此胞核学检验通过染色体核型检查可以清楚地反映细胞系的遗传背景和传代的稳定性(传代过程中的染色体是否发生畸变或者缺失等情况)[9]。研究发现:ST 细胞众数与猪源原代细胞染色体众数(2n = 38)一致,占细胞总数的 67.1%,说明该细胞系染色体分布频率在正常二倍体细胞附近;其他五种细胞的众数与其对应原代细胞相比,均有不同程度的偏差,并且染色体的数量分布也较为离散。张德礼等认为细胞的致瘤性与否和细胞系染色体的变异情况直接相关,细胞系染色体的众数与原代细胞相比偏离的越高、染色体数目范围越宽,出现致瘤性的几率就越大[10-12]。

细胞染色体制片质量的好坏会直接影响胞核学检验的准确性和检验效率[13]。秋水仙素的处理对染色体的形态和处于中期分裂相的数量起到了关键作用。秋水仙素具有细胞毒性,会抑制细胞生长,促进细胞凋亡,导致染色体分裂抑制,形态变异[14]。本研究参考相关文献[5,7],结合细胞染色体制备经验,对秋水仙素的浓度进行了优化,发现使用终浓度为 1 μg/mL 的秋水仙素处理后,细胞染色体臂长适中并且形态最佳;秋水仙素的浓度过高或时间较长,染色体会呈“点”状(图 2B),导致后续 G 带显色分析时带型无法分辨;秋水仙素浓度过低或处理时间过短,染色体会因为长度过长而纠缠在一起(图 2C),也影响后续的结果分析。秋水仙素处理细胞的时机亦会影响到染色体的形态以及长度。秋水仙素处理的时机应尽量选择在细胞系传代后 24 ~ 48 h,细胞生长 90% 至刚刚长满细胞瓶时。错误的处理时间可能会导致处于中期分裂相的细胞过少,或者滴片后细胞染色体的分散度不好呈“菊花”状(图 2A)。

滴片后染色体的分散程度常与低渗液的处理是否合适有关。常见的低渗溶液包括 KCl 溶液、柠檬酸钠溶液或者氯化钠溶液[15-16]。0.075 mol/mL 的 KCl 溶液作用 20 ~ 60 min 多用于传代细胞系和羊水细胞的低渗处理[13,17]。为了尝试在低渗过程中使细胞膨胀更加充分,在滴片后得到最佳的染色体分散效果,本研究增加了 1 组浓度更低的低渗液(0.4% KCl)处理。结果表明,待检细胞用 0.4% KCl 溶液在 37 ℃水浴中处理 40 min 时的低渗效果最佳,细胞滴片后染色体分散适中,破碎释放染色体的细胞视野较多。而采用浓度过低的低渗液或者处理时间过长会导致细胞在滴片前就提前破碎,滴片后视野背景中会出现大量游离的染色体。采用浓度过高的低渗液或者低渗液处理时间过短会造成等渗的效果,在滴片后没有细胞破碎释放出染色体(图 2D),得不到理想的染色体中期分裂相视野。

除以上涉及的影响因素外,细胞的培养状态、传代比例甚至是滴片时的温湿度条件和载玻片的质量亦会对制片效果产生很重要的影响。胞核学检验是一个很经典的实验方法,如何将染色体制片的过程标准化,满足多种属细胞检验需求,是今后下一步的努力方向。



A. 染色体呈“菊花状”(ST 细胞);B. 染色体呈“点状”(OA3. Ts 细胞);C. 染色体长度过长(MDBK 细胞);D. 染色体分散度差(OA3. Ts 细胞)

A. The chromosome is “chrysanthemum like” (ST cell); B. The chromosome is “punctate” (OA3. Ts 细胞);

C. Chromosome length is too long(MDBK cell); D. Poor chromosome dispersion(OA3. Ts cell)

图 2　染色体制片过程中的常见问题

Fig 2　Common problems in chromosome production

参考文献:

[1] 栾海萍, 杨素霞, 陈红岩. MDBK 细胞传代中染色体畸变发生的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(6): 30 – 32.
Luan H P, Yang S X, Chen H Y. The study on MDBK cells which were passaged in chromosomal aberration [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredit, 2015, 23(6): 30 – 32.

[2] 丁国杰, 白同臣, 姜 力, 等. 猪 ST 细胞染色体制备及核型分析[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(4): 32 – 34.
Ding G J, Bai T C, Jiang L, *et al*. Swine ST Cell chromosomal preparation and karyotype analysis [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2008, 42(4): 32 – 34.

[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二 O 一五年版三部[S]. 2015: 附录 32 – 33.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People’s Republic of China(2015) [S]. 2015: appendix 32 – 33.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二 O 一五年版三部[S]. 2015: 附录 19 – 25.
Commission of Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China(2015) [S]. 2015:appendix 19 – 25.

[5] 毕志香, 李鹏成, 揭鸿英, 等. DF – 1 细胞染色体制备及核型分析[J]. 中国家禽, 2014, 36(17): 44 – 46.
Bi Z X, Li P C, Jie H Y, *et al*. Study on the storage life and tumorigenicity identification of DF – 1 cell [J]. China Poultry, 2014, 36 (17): 44 – 46.

[6] 付智财, 王家敏, 令世鑫, 等. BHK – 21 细胞库的建立及其生物学特性鉴定[J]. 山西农业科学, 2013, 41(8): 808 – 812.
Fu Z C, Wang J M, Ling S X, *et al*. Establishment and its characteristics identification of BHK – 21 cells bank [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2013, 41(8): 808 – 812.

[7] Montomoli E, Khadang B, Piccirella S, *et al*. Cell culture – derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(5): 587 – 594.

[8] WHO. WHO technical report series. annex 1: requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrated for the production of biologicals [R]. 1998: 878.

[9] 汪伟伟, 张文玲, 王晓菲, 等. 两种制备鸡肝癌细胞染色体方法的比较[J]. 解放军医学院学报, 2018, 39(4): 335 – 339.
Wang W W, Zhang W L, Wang X F, *et al*. Comparison of two methods for chromosome preparation from LMH cells[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2018, 39(4): 335 – 339.

[10] 张德礼, 李六金, 白晓鸿, 等. Vero – 2 和 MA – 104 细胞系染色体组型分析与致癌 – 致瘤性研究 – 在犬五联疫苗制备中替代 BHK – 21 细胞系细胞株的筛选和检定[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(6): 16 – 20.

Zhang D L, Li L J, Bai X H, *et al*. Karyotype analysis and research on carcinogenesis or tumorigenicity of Vero - 2 and MA - 104 cell lines - screening and identification of cell line to replace BHK - 21 in the preparation of vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1999, 29(6): 16 - 20.

[11] 张德礼, 李六金, 夏耕田, 等. 犬肾细胞系的染色体组型分析与致癌/致瘤性的实验研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 562 - 570.

Zhang D L, Li L J, Xia G T, *et al*. Experimental research on carcinogenesis or tumorigenicity of MDCK canine kidney cell (CKC) lines & analysis of their chromosome karyotypes[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(5): 562 - 570.

[12] 张德礼, 李六金, 刘尚高, 等. 动物细胞系的染色体组型分析和致癌/ 致瘤性[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(4): 348 - 352.

Zhang D L, Li L J, Liu S G, *et al*. Karyotype analysis and research on carcinogenicity/tumorigenicity of animal cell lines [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1999, 19(4): 348 - 352.

[13] 钱兴丽, 宋彩花, 任芳芳, 等. 人用疫苗生产用工作细胞库 Vero 细胞的鉴别[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(10): 1022 - 1027.

Qian X L, Song H, Ren F F, *et al*. Authentication of working cell bank for production of vaccines for human use[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2017, 30(10): 1022 - 1027.

[14] 李若溪. 人体外周血淋巴细胞培养及染色体核型分析[J]. 黑龙江科学, 2019, 16(10): 34 - 35.

Li R X. Human peripheral blood lymphocyte culture and karyotype analysis[J]. Heilongjiang Science, 2019, 16(10): 34 - 35.

[15] 宋彩花, 任芳芳, 刘 杰, 等. 人用疫苗生产用人二倍体细胞株 KM B17 的鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(10): 1135 - 1141.

Song C H, Ren F F, Liu J, *et al*. Identification of human diploid cell KMB17 strain for production of vaccines for human use[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(10): 1135 - 1141.

[16] 张 宇, 俞 露, 郑全莉, 等. 重组人生长激素 Fc 融合蛋白工程细胞染色体核型分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(3): 286 - 288.

Zhang Y, Yu L, Zheng Q L, *et al*. Karyotype analysis of engineered cells with recombinant human growth hormone Fc fusion protein[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(3): 286 - 288.

[17] 郑 静, 卓 越, 刘艳妮. 羊水细胞原位培养及核型制备方法的改进[J]. 医学研究生学报, 2019, 32(3): 282 - 285.

Zheng J, Zhuo Y, Liu Y N. Improvement research on amniotic fluid cell in situ culture and karyotype preparation methods[J]. J Med Postgra, 2019, 32(3): 282 - 285.

(编 辑:李文平)