

低血清培养的 BHK21 细胞染色体遗传稳定性分析

陈苗苗, 董金杰, 杜平 (中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃兰州 730046)

摘要 [目的]对一种商业化的低血清培养基适应 BHK21 细胞进行传代培养,并分析该细胞染色体的变异稳定性,以判定其质量。[方法]采用直接法制备 4 个代次 BHK21 细胞的染色体标本,用常规 Giemsa 染色,在 1 000 倍光学显微镜下计数中期分裂相染色体数目,并进行核型分析。[结果]BHK21 为亚二倍体或亚四倍体细胞系,亚二倍体总数为 42,亚四倍体细胞总数为 72~74,该细胞系染色体的畸变率在各代次所占比例为 0~2%,均较低。[结论]该细胞系的遗传学特性相对稳定,各代次间无本质差异,可候选为制苗用细胞。

关键词 低血清;BHK21;染色体;遗传稳定性

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)23-097-02

Chromosome Genetic Stability Analysis of BHK21 Cells with Low Serum Culture

CHEN Miao-miao, DONG Jin-jie, DU Ping (China Agricultural VET. BIO. Science and Technology Co., Ltd., Lanzhou, Gansu 730046)

Abstract [Objective] To analyze a commercialization low serum medium, which was suitable for subculture of BHK21 cells, to analyze the variation stability of the cell chromosome to determine its quality. [Method] Direct method was used to prepare chromosome specimens of 4 four generations BHK21 cells. Conventional Giemsa staining was adopted. The number of metaphase mitotic chromosomes was counted by 1 000 times of optical microscope, so as to find the rate of chromosome mutation, and to carry out karyotype analysis. [Result] BHK21 was a sub diploid or tetraploid cell line. The hypodiploid mode was 42, hypotetraploid cell mode was 72-74. The chromosome aberration rate of the cell line was 0-2%, which was lower than that of the generation. [Conclusion] The genetic characteristics of the cell line are relatively stable, there is no essential difference between the generations, and it can be used as a candidate for the production of cells.

Key words Low-serum; BHK21; Chromosome; Genetic stability

BHK21 细胞对口蹄疫病毒敏感,且又是口蹄疫病毒很好的宿主细胞,在口蹄疫疫苗生产中,均使用 BHK21 细胞对口蹄疫病毒进行繁殖。无论是传统的转瓶工艺还是悬浮培养工艺,都以贴壁的 BHK21 细胞为驯化对象,由权威机构 ATCC 保存的 BHK21 细胞,此传代细胞遗传上具有一定的变异性。为了保证口蹄疫病毒生产的高效性,保证宿主细胞的遗传稳定性则是重中之重。目前检测细胞变异系数的有效方法是核型分析,这是细胞遗传学及细胞生物学的核心技术之一。该技术可用于研究细胞和组织及个体的特异性鉴定、遗传变异和种属进化关系。

目前,医院常采用外周血、骨髓、羊水制备染色体诊断染色体上的疾病^[1-2]。关于传代细胞的核型分析技术研究很少。传代细胞具有驯化成熟、人为控制性强的特点,在实际科研、检验、疫苗生产以及生物制品研发等领域被广泛应用。笔者以低血清培养基适应的 BHK21 细胞进行传代培养,染色体标本制备参考翁炳焯等^[3]提出的考评标准,其中,可分析分裂相的要求为数目明确、全部染色体集中但不重叠、染色体伸展适度、着丝粒清晰、染色清晰^[4],取 4 个代次 400 个中期分裂相的染色体进行分析,判定该细胞系的畸变率,以此为依据筛选优良的细胞株。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 主要试剂。秋水仙素;卡诺氏固定液,甲醇:冰醋酸=3:1;吉姆萨染色液;25 g/L 胰蛋白;胎牛血清;KCl。

1.1.2 细胞 BHK21。细胞 BHK21 购自中国兽药监察所,由

中农威特生物科技股份有限公司质量保证部保存,按常规组织培养法进行培养和传代。

1.1.3 培养基。MEM 细胞培养基为 GIBCO 公司产品, MEM SLM 低血清细胞培养基为北京清大天一生物技术有限公司产品,新生牛血清为兰州民海生物技术公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。将复苏的 BHK21 细胞在 T75 培养瓶中适应低血清培养基培养 32 代,其中, F1~F8 代为传统 201 培养液+10%血清培养的 BHK21 细胞, F9~F16 代为商业化低血清培养基+5%血清培养的 BHK21 细胞, F17~F25 代为商业化低血清培养基+4%血清培养的 BHK21 细胞, F26~F32 代为商业化低血清培养基+3%血清培养的 BHK21 细胞。

1.2.2 染色体标本制备。参照《四种动物传代细胞染色体遗传变异率分析》中染色体标本制备的方法。将 5 代、10 代、20 代、30 代作为细胞染色体分析的代次,于细胞终止培养前 5~6 h,在细胞培养物中加入适量的秋水仙素溶液,使秋水仙素的终浓度为 0.01 μg/mL 培养液,以便阻止细胞有丝分裂至中期,至培养结束时,倾弃培养液加入适量 25 g/L 胰蛋白酶消化液对细胞单层进行消化,收集细胞,再加入预热至 37℃ 的 75 mmol/L KCl 溶液 5~6 mL,室温下低渗 30 min,离心倾弃上清液;然后加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)5 mL 固定 30 min 后,800~1 000 r/min 离心 10 min,重复固定 1 次,置于 4℃ 过夜,次日离心倾弃上清液,沉淀加 1 mL 新配制的固定液制成细胞悬浮液,在冰水浸泡的干净玻片上滴加细胞悬浮液 3~4 滴,室温下晾干,即制成培养细胞有丝分裂中期的染色体玻片标本。

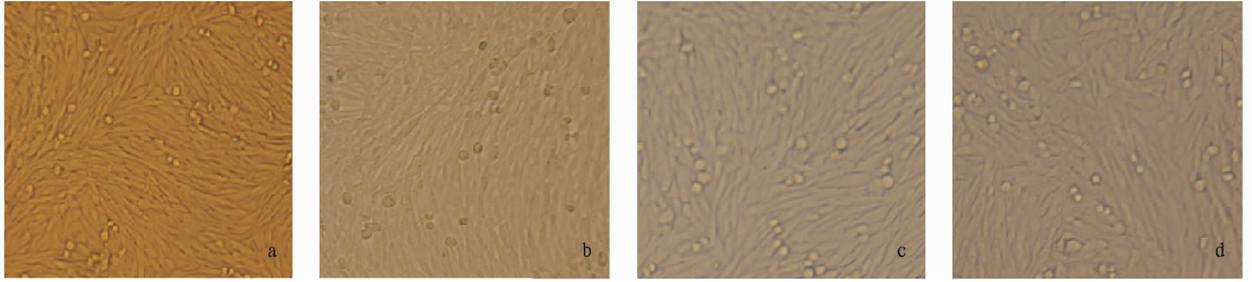
1.2.3 染色体的 Giemsa 染色^[5]。染色体玻片标本于室温下放置 7 d,或 37℃ 干燥 2~4 h 后,即可进行染色体的 Giemsa 染色,用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液配成 100 g/L 的 Giemsa

基金项目 国家高新技术研究发展计划项目(“863”计划 2011AA10A211)。

作者简介 陈苗苗(1980-),女,四川广元人,助理研究员,硕士,从事生物制品研发工作。

收稿日期 2016-07-06

染色液,滴在染色体玻片标本上,染色 30 min,蒸馏水冲洗干净,晾干。



注:a. F4 在 201 培养液 + 10% 血清中的细胞形态;b. F9 在 MEM SLM + 5% 血清中的细胞形态;c. F18 在 MEM SLM + 4% 血清中的细胞形态;d. F27 在 MEM SLM + 3% 血清中的细胞形态。

Note: a. Cell morphology of F4 (201 culture liquid + 10% serum); b. Cell morphology of F9 (MEM SLM + 5% serum); c. Cell morphology of F18 (MEM SLM + 4% serum); d. Cell morphology of F27 (MEM SLM + 3% serum).

图 1 驯化稳定 4 个代次 BHK21 细胞 48 h 培养形态

Fig. 1 Cultivation morphology of four generations of BHK21 cells at 48 h after stable domestication

1.2.4 染色体的观察与分析。每个代次选择 100 个中期分裂相细胞,在油镜(10×100)下计数染色体数目,并观察记录畸变染色体,计算出染色体的畸变率,每种血清含量培养的细胞选择 1 个分裂良好的中期分裂相拍摄显微照片,并进行核型分析。

2 结果与分析

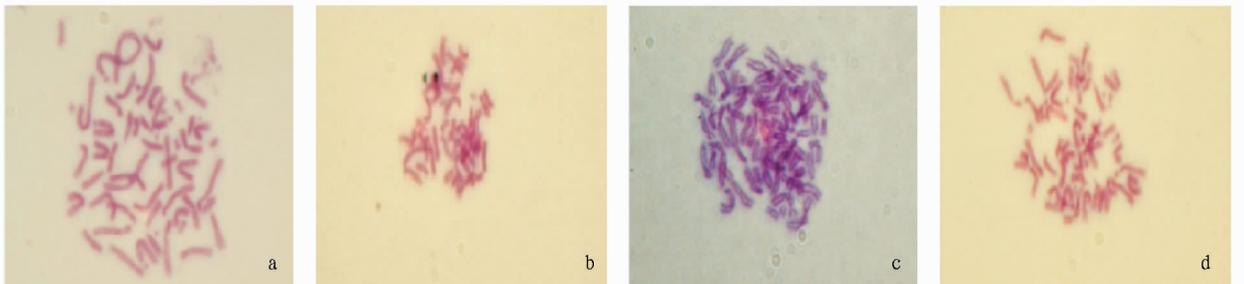
细胞驯化过程中,每个代次 BHK21 细胞长势稳定,形态良好(图 1)。BHK21 是源于幼仓鼠肾的一种传代细胞系^[6-7]。共计数了 BHK21 细胞系的 5 代、10 代、20 代和 30 代 400 个中期分裂相的染色体,染色体数目分布见表 1。由表 1 可知,BHK21 属于亚二倍体和亚四倍体系,5 代、10 代和 30 代主要是亚二倍体细胞系,其中,亚二倍体细胞染色体数目 32~67,所占比例分别为 76%、80% 和 79%,亚四倍体细胞染色体数目为 68~87,所占比例分别为 23%、20% 和 20%。20 代主要是亚四倍体细胞,染色体数目为 68~87,所占比例为 68%。染色体的畸变率在各代次所占比例为 0~2%,染色体畸变率很低。因此,该细胞经驯化,用低血清培养基培养后,不同的血清用量,各代次之间无本质差异,遗传学特性相对稳定,故可候选为制苗用细胞。4 个代次细胞

中期分裂相见图 2。

表 1 4 个代次染色体数目分布

Table 1 Distribution of four generations of chromosome number

细胞代次 Cell generation	染色体数目范围 Range of chromosome number//个	各范围所占细胞数 Cell population in each range//个	所占比率 Percentage %	畸变率 Deformation rate//%
5	32~50	52	52	0
	51~67	24	24	0
	68~87	23	23	0
	109	1	1	1
10	32~50	60	60	0
	51~67	20	20	0
	68~87	20	20	0
20	32~50	12	12	0
	51~67	8	8	0
	68~87	68	68	0
30	112~114	2	2	2
	32~50	61	61	0
	51~67	18	18	0
	68~87	20	20	0
	121	1	1	1



注:a. F5 代(201 培养液 + 10% 血清)细胞中期分裂相;b. F10 代(MEM SLM + 5% 血清)细胞中期分裂相;c. F20 代(MEM SLM + 4% 血清)细胞中期分裂相;d. F30(MEM SLM + 3% 血清)细胞中期分裂相。

Note: a. Metaphase division phase of F5 (201 culture liquid + 10% serum); b. Metaphase division phase of F10 (MEM SLM + 5% serum); c. Metaphase division phase of F20 (MEM SLM + 4% serum); d. Metaphase division phase of F30 (MEM SLM + 3% serum).

图 2 4 个代次细胞中期分裂相

Fig. 2 Metaphase division phases of four generations

效促使林地承包人树立林地经营的可持续发展理念,从而合理利用林地资源,同时提高其保护森林环境的积极性,以达到林地承包经营与森林环境保护的协调发展。

3.3 规范林地承包经营权的流转条件 随着市场经济的日益发展,林地承包经营权的流转日益普遍,在此种情况下,明晰林地承包经营权流转过程中的限制条件,以便更好地对林地承包经营权流转进行监管,显得尤为迫切和重要。首先,关于如何判断转让方是否具有稳定的非农职业或者有稳定的收入来源,现有的法律没有给出明确的判断标准,符合以下条件之一时,承包方有权转让林地承包经营权:①迁入外地生活或者从事生产经营;②转向其他行业;③不再具有劳动能力或不能直接从事生产劳动^[8]。其次,关于受让方是否只限于本集体经济组织成员这一问题,持肯定说的学者认为,林地承包经营权的本质是集体的土地承包给集体成员经营,因此受让方只能是本集体经济组织成员。该研究认为应采否定说,因为本集体经济组织成员内部过于狭隘,不利于资源的优化配置,不利于实现转让方收益的最大化,因此受让方的范围应包括所有从事农业生产经营的农户、林业企业及其他组织^[9]。再次,关于发包方的同意权问题,笔者认为应将其限制在形式审查限度内较为合适,即只有法定的拒绝理由存在时,发包方才可以在林地承包经营权转让过程中行使拒绝权。具体理由包括:①违反平等协商、自愿、有偿原则强迫或者阻碍承包方进行土地承包经营权流转;②改变土地所有权的性质和土地的农业用途;③流转的期限超过承包期的剩余期限;④受让方不具有农业经营能力;⑤侵害了集体经济组织成员的优先权;⑥发包方无稳定的非农职业也无稳定的收入来源的。最后,关于林地承包经营权继承制度的完

善,为了使林地不被进一步细分,在继承林地承包经营权时不得将一个承包经营权分割为若干个,当有多个继承人时,可协商由一人继续承包经营,而对其他继承者予以一定的经济补偿,或者是由多个继承人等同承包经营,从而降低林地被分割的机率,维护林地的法律效益和生态效益。

4 结语

林地的生态价值在当下中国的集体林权改革中具有重要的地位。因此,从环境保护的角度对我国林地承包经营权相关法律问题进行分析 and 解读,通过完善发包主体的森林生态环境保护职责,从程序上保障承包方的经营自主权,从实质上落实其收益权,加强监管并不断规范林地承包经营权的流转条件,才能使林地经济效益和生态效益达到双赢的状态。然而,在林地承包经营权行使过程中,各方行为及各种流转方式都可能对林地资源的合理利用及森林环境的保护产生影响,如何在这个过程中协调各方利益,使林地承包经营权与森林环境保护协调发展依然任重而道远。

参考文献

- [1] 叶知年,林怡仙.论我国林权流转制度之完善[J].西南科技大学学报(哲学社会科学版),2010,27(1):7-11.
- [2] 梁慧星,陈华彬.物权法[M].北京:法律出版社,2003:10-11.
- [3] 刘宏明.浅析林地承包经营权的性质[J].国土绿化,2006(10):21.
- [4] 王利明.物权法专题研究:下[M].长春:吉林人民出版社,2002:927.
- [5] 王利明.物权法研究:下[M].北京:中国人民大学出版社,2007:42-75.
- [6] 张红霄.我国集体林权制度改革的法律解析[J].林业经济,2008(9):18-22.
- [7] 房绍坤.论益物权基本问题研究[M].北京:北京大学出版社,2006:4.
- [8] 胡玉浪.论林地承包经营权转让的条件[J].中国农学通报,2010,26(20):452-455.
- [9] 杨萍.福建省集体林林权流转方式探讨[J].中国林业经济,2008(5):32-35.
- [3] 翁炳煊,任宇珂,朱瑞建,等.染色体制备及核型分析室内控制标准及其考评标准的探讨[J].中国产前诊断杂志,2013,5(2):40-44.
- [4] 黄燕,陈绍坤.动物骨髓细胞染色体标本制备失败的原因分析[J].生物学通报,2006,42(1):52-54.
- [5] 郭健民,张耀平,刘瑞清,等.常用实验动物肿瘤染色体的研究[J].遗传学报,1980,7(4):376-381.
- [6] UMENE K, NISHIMOTO T. Replication of herpes simplex virus type 1 DNA is inhibited in a temperature-sensitive mutant of BHK-21 cells lacking RCC1 (regulator of chromosome condensation) and virus DNA remains linear[J]. J Gen Virol, 1996, 77(10):2261-2270.
- [7] ISLAM M Q, ISLAM K, LEVAN G, et al. Monochromosome transfers to syrian hamster BHK cells via microcell fusion provide functional evidence for suppressor genes on human chromosome 9 both for anchorage independence and for tumorigenicity [J]. Genes Chromosomes Cancer, 1995, 13(2): 112-115.

(上接第98页)

3 结论

用商业化的代血清培养基驯化培养 BHK21 细胞,逐渐降低培养液中的血清含量,进行传代培养,通过选取不同代次细胞的染色体进行核型分析。结果表明,该细胞系的遗传学特性相对稳定,各代次间无本质差异,可候选为制苗用细胞。

参考文献

- [1] 张桂林,卫小静,郑梅玲.918 例孕中期羊水细胞染色体核型分析[J].中华医学遗传学杂志,2012,29(1):102-104.
- [2] 张旺东,王秋菊.染色体核型分析在白血病分型诊断和预后判断中的临床意义[J].国际检验医学杂志,2010,31(12):1359-1363.