

不同方法对 STO 细胞冻存效果的影响

谭菊, 武彩虹*, 文潮潮, 王萌 (江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的]建立一种更优化的 STO 细胞冷冻保存方法。[方法]STO 细胞传至第 3 代后,调节其浓度至 2.09×10^5 个/mL,开展冷冻保存试验。I 组将 STO 细胞置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下平衡,1 h 后转入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下,12 h 后将其转至液氮中保存;II 组将 STO 细胞装入已注入 250 mL 95% 乙醇的降温器后,立即转至 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 下,12 h 后再将其转至液氮中保存;III 组将 STO 细胞悬液于液氮面上方 10 cm 处平衡 20 min,然后将其缓缓转至液氮中。同时,设 IV 组为对照组,即 STO 细胞不进行冷冻处理。在液氮中保存 30 d 后进行解冻,以 STO 细胞的回收率、存活率和生长情况为研究指标,通过 MTT 法进行 STO 细胞冻存效果评价。[结果]经冷冻处理后,3 种方法 STO 细胞解冻后回收率和存活率均存在显著差异 ($P < 0.05$)。II 组细胞解冻后细胞回收率低于 I 组、高于 III 组,但细胞存活率最高 (84.91%)。与 I 组和 III 组相比,II 组 STO 细胞冻存方法不仅能保证冷冻效果,而且可以回收更多的细胞。II 组 STO 细胞复苏后生长相对缓慢,但 STO 细胞经培养后可恢复至冷冻前的生长状态。I 组和 II 组复苏后 STO 细胞的增殖速度较快,且增殖率基本相同,而 III 组细胞的增殖速度较慢。[结论]II 组 STO 细胞于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中平衡过夜,再转移至液氮中超低温冷冻是较为理想的保存方法。

关键词 STO 细胞;冷冻保存;存活率;生长

中图分类号 Q 813 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)23-0130-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.035



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Different Methods on the Cryopreservation of STO Cells

TAN Ju, WU Cai-hong, WEN Chao-chao et al (Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract [Objective] To establish an optimized method for the cryopreservation of STO cells. [Method] After subculture 3 generations, the concentration of STO cells were adjusted to 2.09×10^5 cells per milliliter, and then the cryopreservation experiment was conducted. STO cells in I group were equalized at $4\text{ }^\circ\text{C}$, transferred into $-20\text{ }^\circ\text{C}$ after 1 h, and stored in liquid nitrogen after 12 h. STO cells in II group were placed in a cooler which had been injected with 250 mL 95% alcohol and then transferred into $-70\text{ }^\circ\text{C}$ immediately, and then transferred to liquid nitrogen for preservation 12 hours later. In III group, STO cell suspension was balanced at 10 cm above the liquid nitrogen surface for 20 min, and then it was slowly transferred to liquid nitrogen. At the same time, IV group was set as the control group, STO cells were not cryopreserved. After being stored 30 days, STO cells were thawed. The cryopreservation effect of STO cells was evaluated by using MTT method with the recovery rate, survival rate and growth rate as the research indices. [Result] After freezing treatment, the recovery rate and survival rate of STO cells were significantly different among three different groups ($P < 0.05$). The recovery rate of STO cells in II group was lower than that in I group and higher than that in III group, but cell survival rate in II group was the highest (84.91%). Compared with I group and III group, the method of II group could not only ensure the freezing effect, but it could also recover more cells. The growth of STO cells in II group was relatively slow after resuscitated, but STO cells in II group could return to the growth state before freezing. After resuscitation, the proliferation rate of STO cells in I group and II group was faster, and the appreciation rate was basically the same, while the proliferation rate of STO cells in III group was slower. [Conclusion] The preservation method of group II (STO cells were equilibrated overnight in a refrigerator at $-70\text{ }^\circ\text{C}$, and then transferred to liquid nitrogen for ultra-low temperature freezing) was ideal for the preservation of STO cells.

Key words STO cells; Cryopreservation; Survival rate; Growth

胚胎干细胞(ESC)因其具有自我更新能力和多向分化潜能^[1]的特点而具有重要的科学价值和应用前景。ESC的自我更新能力可以有效确保其无限增殖和多向分化潜能^[2]。在体外,若 ESC 要维持自我更新的能力,则必须有饲养层或其他分化抑制物的支持^[3],否则 ESC 发生分化,其多向分化潜能会消失^[4]。其中,饲养层细胞是建立和维持 ESC 细胞系的必要条件^[5]。目前,原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)和鼠胚成纤维细胞系(STO)2 种细胞最常被用作饲养层细胞。STO 是已建成的细胞系,可进行多次传代,便于使用^[6]。但是,STO 细胞株作为连续细胞系,缺乏遗传稳定性,在连续传代过程中容易发生变异^[7]。对遗传相对稳定的未变异 STO 细胞株进行有效保存是防止 STO 细胞发生变异的有效方法。

低温保存是生物样本最常用的保存方法^[8]。常规慢速冷冻已被广泛应用于细胞保存^[9-10]。从理论上,在超低温

($-196\text{ }^\circ\text{C}$)冷冻状态下细胞的代谢活动几乎完全停止,因此生物技术领域常用该方法长期保存细胞^[11]。笔者以 STO 细胞为研究对象,探索不同冷冻方法对其保存效果的影响,旨在筛选相对稳定、效果好、操作简易可行、经济的饲养层细胞冻存方法。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料 小牛血清(NCS, Gibco)、DMEM 培养液(Gibco)、磷酸盐缓冲液(PBS, 上海生工)、二甲基亚砷(DMSO, Gibco)、台盼蓝(TB, 上海生工)、噻唑蓝(MTT, 上海生工)、STO 细胞均由江苏农牧科技职业学院实验室冻存。

1.2 主要试剂的配制

1.2.1 STO 细胞培养液的配制。将小牛血清于 $56\text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴加热 30 min 灭活,过滤除菌、分装;将 90 mL DMEM 培养液和 10 mL 灭活的小牛血清按 9:1 混合,即为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,用于 STO 细胞的培养。

1.2.2 冷冻液的配制。将二甲基亚砷与 STO 培养液按 1:9 混合,吹打混匀。现配现用。

1.2.3 MTT 试剂的配制。称取一定量的 MTT 粉溶解于 PBS

基金项目 江苏农牧科技职业学院大学生创新创业课题(202012-806077Y)。

作者简介 谭菊(1978—),女,江苏句容人,讲师,硕士,从事兽医临床研究。*通信作者,教授,博士,从事动物生殖生物学研究。

收稿日期 2021-07-27

缓冲液 (pH 7.4) 中,制成 5.0 mg/mL 的 MTT 溶液,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 下密封避光保存。

1.2.4 台盼蓝染色液的配制。称取一定量的台盼蓝 (TB) 粉溶于 0.9% 氯化钠溶液中,配制成 0.4% 的台盼蓝试剂,4 $^{\circ}\text{C}$ 下密闭保存。

1.3 主要方法

1.3.1 STO 细胞解冻和培养。将 STO 细胞冷冻-解冻后,加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,置于 CO_2 培养箱中培养,直至细胞汇合度为 80% 左右时加入含 10 ng/mL 丝裂霉素的 DMEM 培养液作用 2.5 h;将 1.75×10^5 个/孔的 STO 细胞置于用 0.1% 明胶预处理 30 min 的 4 孔板中,于 CO_2 培养箱中过夜培养,使其贴壁^[12-13]。

1.3.2 STO 细胞计数和存活率测定。采用台盼蓝染色方法对冷冻前后的 STO 细胞进行总细胞计数和存活率测定。TB 染色后,死细胞呈蓝绿色,活细胞未着色。

1.3.3 MTT 法测定细胞活力。经冷冻-解冻的 STO 细胞用 DMEM 培养液进行重悬,在经明胶预处理的 96 孔酶标板内加入 200 μL 重悬液,每孔 4×10^3 个,然后置于 5% CO_2 培养箱中;分别培养 12、24、48、72、96 和 120 h 后,使用酶联免疫检测仪测定^[12]。

1.4 试验设计 STO 细胞传代至第 3 代,调节其浓度至 2.09×10^5 个/mL,开展冷冻保存试验。试验分为 4 组:I~III 组为冷冻试验组,I 组将 STO 细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 1 h 后转入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 h,然后将其转至液氮中保存;II 组将 STO 细胞悬液装入已注入 250 mL 95% 乙醇的降温器中后,立即转至 -70 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 h,然后将其转至液氮中保存;III 组将装有 STO 细胞悬液的安瓿管置于液氮面上方 10 cm 处平衡 20 min,然后将其缓缓沉入液氮中。30 d 后,检查冻存效果。IV 组为对照组,STO 细胞不进行冷冻处理。

1.5 数据统计与分析 试验数据使用 SPSS 19.0 统计软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 STO 细胞冻后回收率和存活率 STO 细胞在液氮中保存 30 d 后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 解冻后复苏 3 min,复苏后的细胞总数及解冻后 STO 细胞存活率见表 1。由表 1 可知,经 3 种冷冻方法处理后,STO 细胞解冻后回收率和存活率均存在显著差异 ($P < 0.05$)。II 组 STO 细胞解冻后回收率低于 I 组、高于 III 组,但细胞存活率最高 (84.91%)。这说明 II 组 STO 细胞冻存方法较 I 组和 III 组冻存方法能更好地保证冷冻效果,且可以回收更多的细胞。

2.2 STO 细胞冻后的生长

2.2.1 复苏 STO 细胞的形态学观察。与 IV 组未经冷冻处理的 STO 细胞相比,II 组冻存 STO 细胞复苏后生长缓慢。II 组和 IV 组 STO 细胞接种培养结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,II 组第 0 代细胞接种后的前几天培养的 STO 细胞生长速度较慢;传代接种 3 h 后 IV 组细胞已经有拉长铺展、贴壁的现象,且核膜核仁逐渐清晰 (图 1A),而 II 组细胞则在培养 6 h 后开始出现贴壁、细胞分裂的现象 (图 1D);IV 组细胞传代接种

12 h 后 50% 以上呈典型的纤维细胞形状,而 II 组细胞在接种 48 h 后才出现此现象;IV 组细胞传代接种 5 d 后细胞贴壁展开面积占培养瓶底面积的 90% 以上,而 II 组细胞贴壁展开面积不足培养瓶底面积的 60%,且细胞质内可见微小空泡,细胞核周围颗粒化不明显。

表 1 各试验组解冻后 STO 细胞的回收率和存活率

Table 1 Recovery rate and survival rate of STO cells after thawing in each test group

组别 Group	复苏细胞总数 Total number of recovered cells $\times 10^5$ 个/ml	细胞回收率 Cell recovery rate//%	活细胞计数 Viable cell count $\times 10^5$ 个/mL	细胞存活率 Cell survival rate//%
I	1.77	84.69 a	1.13	63.84 b
II	1.59	76.08 b	1.35	84.91 a
III	1.31	62.68 c	0.61	46.56 c

注:同列不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

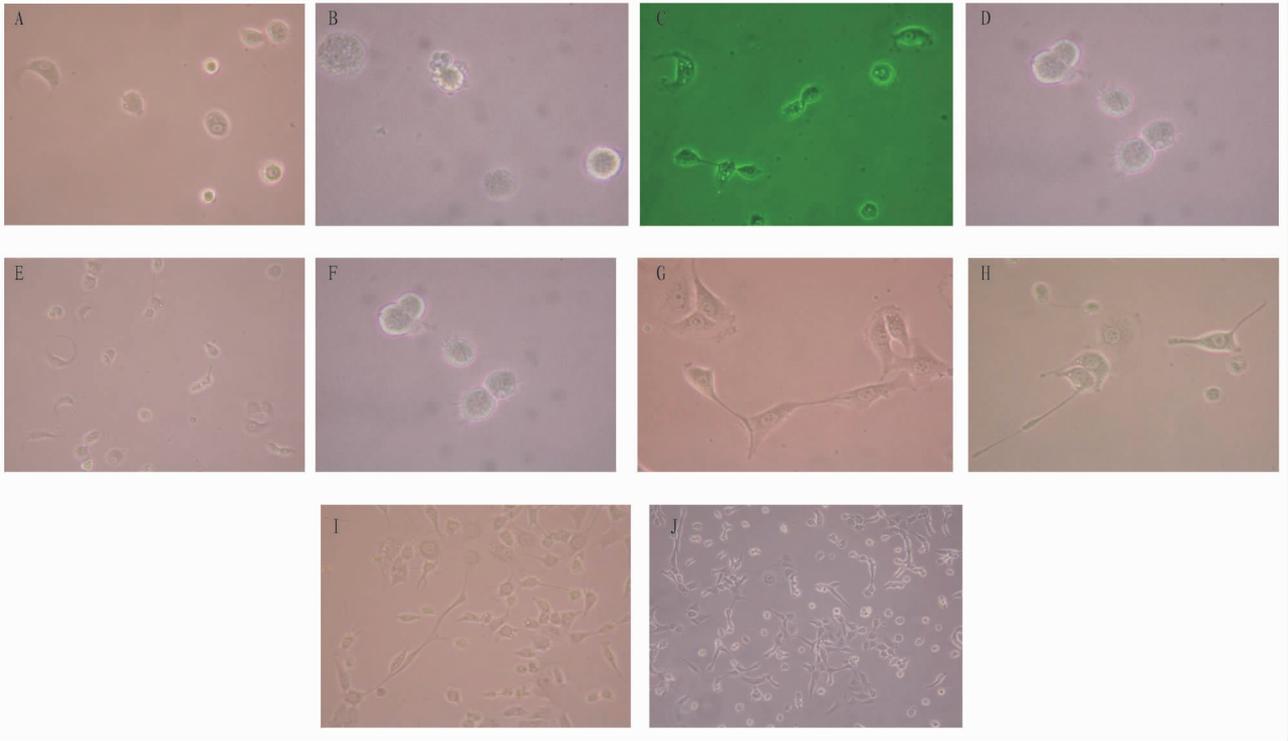
Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$)

2.2.2 冷冻复苏前后 STO 细胞的生长曲线。STO 细胞经冷冻、复苏后继续培养 12、24、48、72、96 和 120 h 进行 MTT 法测定,根据获得的 OD 值绘制生长曲线,见图 2。由图 2 可知,冷冻保存 30 d 后, I 组和 II 组 STO 细胞的增殖速度较快,且增殖率基本相同,而 III 组 STO 细胞的增殖速度较慢。究其原因,一方面,在冷冻过程中低温和冷冻保护剂等因素对细胞有一定的伤害、刺激作用;另一方面,由于 III 组细胞回收率低,复苏后细胞接种密度小,因而影响了细胞生长。

3 讨论

在低温冷冻条件下处于悬浮状态的细胞能长期保存,对人类和动物生殖医学研究、临床应用及种质资源保护均发挥着重要作用^[14]。STO 细胞作为饲养层时,可分泌干细胞生长因子,从而发挥维持干细胞多能性的作用,因此 STO 细胞被广泛应用于人类和动物胚胎干细胞研究^[13]。笔者比较了 3 种不同冷冻方法对 STO 细胞保存效果的影响,结果表明 II 组 STO 细胞于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中平衡过夜,再转移至液氮中超低温冷冻是较为理想的保存方法。复苏后,STO 细胞虽然在培养前 2 d 受活力的恢复、生长环境的适应以及接种密度等因素的影响,出现生长相对缓慢的情况,但仍可在 2 d 内恢复至冷冻前细胞的生长状态。这说明 II 组所用的冷冻方法对于保存 STO 细胞是有效的。

采用 II 组的冷冻方法保存 STO 细胞取得了较好的冷冻效果,其原因主要在于 II 组在保存过程中降温过程较 I 组和 III 组相对稳定。II 组所用的降温器预先加入 250 mL 95% 的乙醇,可以延缓降温速度,使降温速度保持在 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 左右^[7],保护细胞不会因降温速度过快而使胞内水分渗出^[15],避免胞内产生大量冰晶;同时,也不会因为降温速度过慢而促使胞内外形成冰晶。若冷冻时导致胞内有冰晶产生,随着温度的进一步降低,胞内冰晶的体积随之膨胀,会导致细胞骨架损伤和 DNA 损伤,进而造成细胞死亡;同时,冰晶也会导致细胞内的酶和蛋白质发生改变^[15]。当胞外冰晶过多时,则容易引起胞外电解质浓度骤变,从而对细胞造成溶质损



注:A. IV组 STO 细胞接种培养 3 h(200×);B. II组 STO 细胞解冻后接种培养 3 h(400×);C. IV组 STO 细胞接种培养 6 h(200×);D. II组 STO 细胞解冻后接种培养 6 h(400×);E. IV组 STO 细胞接种培养 12 h(100×);F. II组 STO 细胞解冻后接种培养 12 h(400×);G. IV组 STO 细胞接种培养 48 h(200×);H. II组 STO 细胞解冻后接种培养 48 h(200×);I. IV组 STO 细胞接种培养 5 d(100×);J. II组 STO 细胞解冻后接种培养 5 d(100×)

Note:A. STO cells in group IV were inoculated and cultured for 3 h(200×);B. STO cells in group II after thawing were inoculated and cultured for 3 h(400×);C. STO cells in group IV were inoculated and cultured for 6 h(200×);D. STO cells in group II after thawing were inoculated and cultured for 6 h(400×);E. STO cells in group IV were inoculated and cultured for 12 h(100×);F. STO cells in group II after thawing were inoculated and cultured for 12 h(400×);G. STO cells in group IV were inoculated and cultured for 48 h(200×);H. STO cells of group II after thawing were inoculated and cultured for 48 h(200×);I. STO cells in group IV were inoculated and cultured for 5 days(100×);J. STO cells in group II after thawing were inoculated and cultured for 5 days(100×)

图 1 II和IV组 STO 细胞接种培养结果

Fig. 1 The inoculation and culture results of STO cells in group II and IV

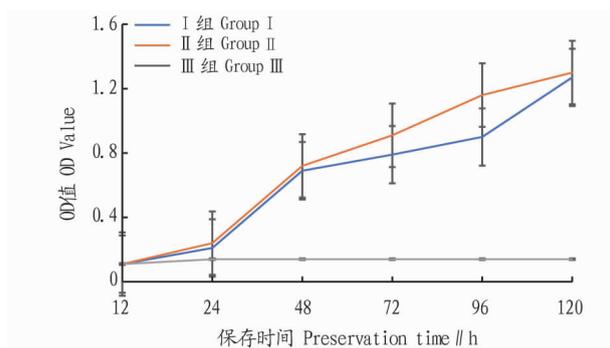


图 2 各试验组冷冻保存后 STO 细胞的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of STO cells after cryopreservation in each test group

伤^[16]。-70℃的超低温冰箱用途相对简单、控温能力强,可避免因反复开关使用而导致其内温度发生明显改变。另外,II组冷冻保存操作步骤相对简单,细胞无需多次转移后再投入液氮中,减少了每次转移过程中由于温度急剧变化而造成的细胞损伤^[7]。

参考文献

- [1] YOUNG R A. Control of the embryonic stem cell state [J]. Cell, 2011, 144(6): 940-954.
- [2] 田孝祥,张剑,陶杰,等. CREG 低表达饲养层 STO 细胞的建立[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(31): 6034-6037, 6010.
- [3] 刘民,李柏青. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离、扩增和抑制[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4): 215-219.
- [4] 郭雨霁,高英茂,邢鲁军. 小鼠胚胎干细胞饲养层培养体系的优化筛选[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(5): 437-441.
- [5] 刘发央,王志勇. 小鼠胚胎干细胞成纤维细胞液培养层的制备[J]. 草原与草坪, 2005, 25(2): 32-34.
- [6] HORIE M, ITO A, KIYOHARA T, et al. E-cadherin gene-engineered feeder systems for supporting undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 110(5): 582-587.
- [7] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养——基本技术指南[M]. 章静波,徐存拴,等译. 北京:科学出版社, 2004: 218-222, 349-366.
- [8] GIWA S, LEWIS J K, ALVAREZ L, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6): 530-542.
- [9] DA FONSECA CARDOSO L M, PINTO M A, HENRIQUES-PONS A, et al. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy [J]. Cryobiology, 2017, 78(3): 15-21.
- [10] LI Y, TAN J C, LI L S. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells [J]. Fertil Steril, 2010, 93(3): 999-1005.

(下转第 139 页)

粉病基因 *HvNEWENTRY* 的位点,为后续开展抗白粉病机制研究奠定基础,设计的 SSR 引物较少,难以精细定位该基因,因此,后续需继续加强对抗白粉病基因的研究与定位。

西藏是青稞的主产地,不仅要加强对白粉病的防治力度,更要注重青稞产业发展,同时青稞也是藏族人民基本的粮食来源,研究青稞抗白粉病机制及提高青稞产量也是解决部分贫困地区粮食缺乏的一种有效方法。

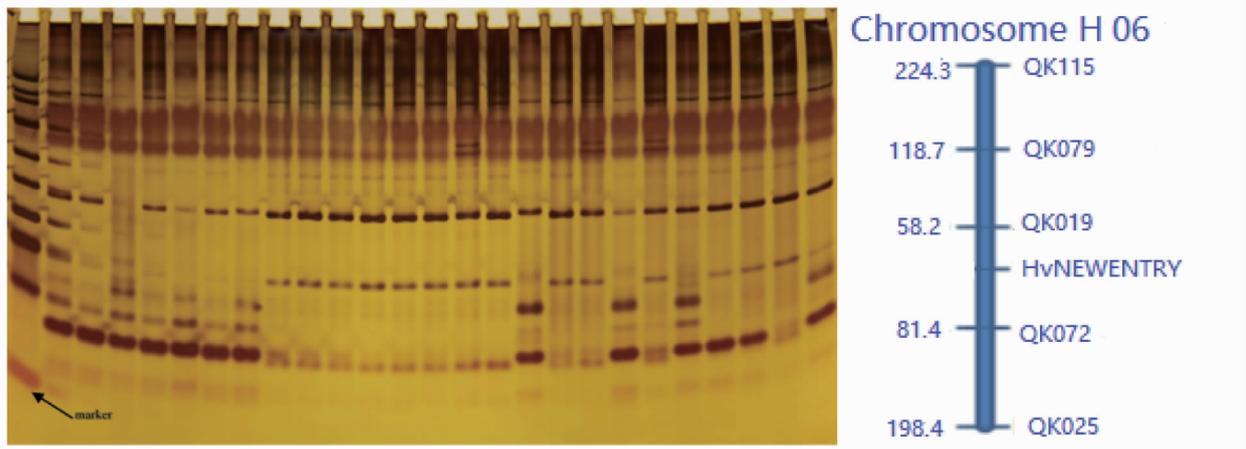


图2 QK019 引物在 F2 群体间扩增结果及 *HvNEWENTRY* 遗传图谱构建

Fig.2 The amplification results of the primer QK019 in F2 population and genetic linkage map of *HvNEWENTRY*

4 结论

通过构建抗感池,检测 200 对抗白粉病基因 SSR 引物的多态性,其中只有 25 对引物具有丰富的多态性,以此为基础对青稞 F2 群体采用 Mapmaker Exp 3.0 计算遗传距离和 MapDraw v2.1 绘制遗传连锁图谱,其中 QK155、QK025、QK019、QK079 和 QK072 定位在 *HvNEWENTRY* 的两侧,该基因位于 4H 染色体上,其中 QK019 和 QK072 定位 *HvNEWENTRY* 基因遗传距离最近,初步可认为是该基因的粗定位 SSR 引物。

参考文献

- [1] 郭慧娟,贾举庆,李欣,等. 小麦种质 CH7015 中抗白粉病基因的 SSR 定位[J]. 华北农学报,2019,34(6):203-208.
- [2] 侯丽媛,董艳辉,张春芬,等. SSR 分子标记技术在苹果种质资源及遗传育种研究中的应用[J]. 山西农业科学,2019,47(6):1107-1114.
- [3] 孙洪宝,许勇,张春秋,等. 比较基因组学在甜瓜白粉病抗病基因 *Pm-2F* 连锁标记开发中的应用[J]. 中国瓜菜,2019,32(8):187-188.
- [4] 马超,董振杰,田修斌,等. 来自西尔斯山羊草的抗小麦白粉病基因 *Pm57* 抗性丧失突变体的筛选与鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(2):386-393.
- [5] 陈芳,乔麟轶,李锐,等. 小麦新种质 CH1357 抗白粉病遗传分析及染色

- 体定位[J]. 作物学报,2019,45(10):1503-1510.
- [6] 王掌军,刘妍,张双喜,等. 宁春 4 号与河东乌麦杂交 F₂ 代抗病性及分子标记鉴定[J]. 浙江农业学报,2019,31(5):677-687.
- [7] 费新茹,朱娟,郭晖,等. 大麦白粉病抗性的遗传分析与 QTL 定位[J]. 核农学报,2019,33(5):888-893.
- [8] 叶卫军,杨勇,周斌,等. 分子标记在绿豆遗传连锁图谱构建和基因定位研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(6):1193-1203.
- [9] ZENG X Q, LONG H, WANG Z, et al. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(4):1095-1100.
- [10] 李思怡,卢浩,赵莉,等. 利用紧密连锁抗白粉病基因的 SSR 标记鉴定甜瓜种质[J]. 分子植物育种,2016,14(9):2435-2440.
- [11] 付必胜,刘颖,张巧凤,等. 与小麦抗白粉病基因 *Pm48* 紧密连锁分子标记的开发[J]. 作物学报,2017,43(2):307-312.
- [12] 徐志,章振羽,姬红丽,等. 四川小麦品种的遗传多样性及其对条锈病和白粉病的抗性[J]. 麦类作物学报,2017,37(2):258-267.
- [13] 刘婉辉,董宏图,李映辉,等. 栽培一粒小麦 3AA30 中抗白粉病基因的鉴定及分子标记定位[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(3):536-540.
- [14] PANSTRUGA R, KUHN H. Mutual interplay between phytopathogenic powdery mildew fungi and other microorganisms[J]. Mol Plant Pathol, 2019, 20(4):463-470.
- [15] BOURRAS S, PRAZ C R, SPANU P D, et al. Cereal powdery mildew effectors: A complex toolbox for an obligate pathogen[J]. Curr Opin Microbiol, 2018, 46:26-33.

(上接第 132 页)

- [11] 王华,杜立业,李华. 微生物液氮超低温保存研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):1-5.
- [12] 刘代艳,于泊洋,孔群芳,等. 海藻酸微囊替代 DMSO 和 FBS 的 STO 细胞冷冻保存研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(33):6413-6418.
- [13] 陈袁,赵丽华,杨宁,等. 建立稳定表达猪 LIF 蛋白的小鼠 STO 细胞系

- [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(8):897-904.
- [14] PEGG D E. The history and principles of cryopreservation[J]. Semin Reprod Med, 2002, 20(1):5-13.
- [15] 李洁,刘斌,李焰,等. 不同条件下细胞冻存效果比较[J]. 临床口腔医学杂志,2004,20(2):84-85.
- [16] 徐振波,李彦媚,弓松伟,等. 新型冷冻保存剂在细胞低温冻存中的选择[J]. 制冷,2004,23(4):19-24.