

# 冷冻保存细胞简易液氮装置

中国人民解放军某部

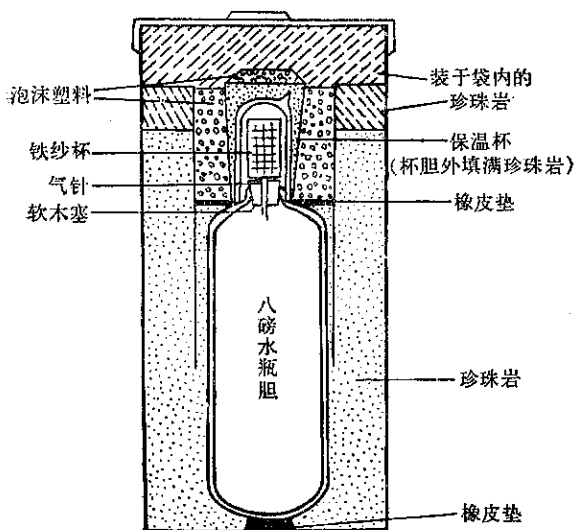
用液氮保存细胞,成活率高,保存时间亦较长,为病毒学诊断与肿瘤研究提供条件,亦为建立双倍体细胞株所必需。我们于1973年初试制了一种适合于一般小型实验室使用的简易液氮装置,既可冷冻细胞,又可将细胞长期保存,其特点是:(1)结构简单,自己可动手制造。(2)所用材料易于购到,造价低廉。(3)液氮消耗量每日为160—350克左右,每次加够可用8—11天。介绍于下:

## 一、液氮装置构造

### 1. 主件(图1)

主要容器为市售之八磅或十磅热水瓶胆(一级品)构成。瓶胆之真空度是保存液氮效果的关键,为此,我们除应用市售之热水瓶胆外,并在云南大学物理系帮助下,将热水瓶厂未熔封之瓶胆真空度抽至 $10^{-5}$ 毫米汞柱左右,然后熔封以进行比较。

装置外皮为铁皮壳,中填珍珠岩(北京电力建筑公司供应)。瓶胆口用软木塞塞紧,塞中插一细针头,使液氮挥发后,由此逸出。瓶口上加用市售玻璃真空夹层保温杯。保温杯周围为制备汽车座垫的泡沫塑料,上加泡沫塑料块覆盖,最上层为珍珠岩布袋。加铁盖盖紧时,保温杯上的泡沫塑料即被压扁,使保温杯口能



桶高53厘米,直径24厘米。

图1 液氮低温容器

环套上八磅瓶胆瓶口上的橡皮外圈,达到较好的保冷效果。由于保温杯顶部泡沫塑料富有弹性,若液氮挥发气体较多而积蓄时,能自动将保温杯顶起,使液氮气体由缝隙逸出,而无爆破之虞。

### 2. 附件

(1) 保温杯内冷冻细胞装置 保温杯之外壳一般为菠萝状,不太适用,我们改用市售之塑料筒(高13厘米,直径6.9厘米),稍剪去塑料筒口1—2厘米,底内四周填以珍珠岩少许,套在保温杯外,外形稍成锥体。保温杯之泡沫塑料圈外径与内套壳等大(内套壳可用原装之八磅热水瓶铁壳),内孔径与保温杯等大,可用手术刀切刻而成。保温杯内盛有铁纱网制成之小圈杯,为盛放待冷冻之细胞安瓿。

(2) 提取液氮与转加液氮之用具 向制氧厂提取液氮时,亦可用普通的八磅热水瓶,软木塞上接一针头,瓶口铝盖内加一泡沫塑料,待液氮装满后,即可加塞旋紧。液氮由此瓶加至液氮低温容器内,可用一加压装置注入(图2)。首先将盛有液氮软木塞移去,插入一个附有两根玻璃管之橡皮塞将瓶口塞紧。一侧玻璃管连接的塑料管应先插入液氮容器内,另一侧为加压的气球。如此可将水瓶内液氮借用液氮本身挥发的气压与气球的加压灌入液氮容器内。

如不用此加压装置,亦可直接将液氮倒入低温装置内,瓶口用漏斗承接,惟液氮损失较多。

(3) 在液氮内存放细胞的用具 细胞存放于安瓿

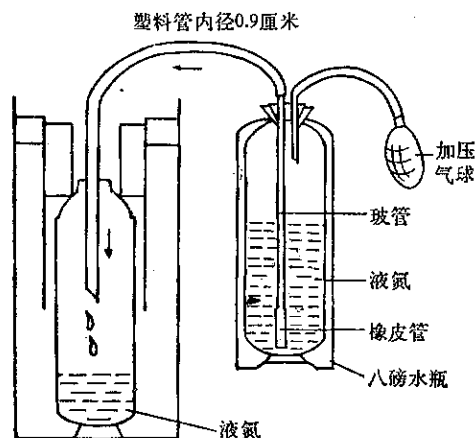


图2 液氮转加装置

中,置入纱布袋内,每袋可放3—6支安瓶,袋口可用松紧带,袋底放玻璃珠粒,以助安瓶下沉。为避免纱布袋吊绳互相缠乱,可将纱布袋按扣分级串联于布条上。吊线上应注明数字,以使提取细胞安瓶时,易于找取。此容器内可放置安瓶60—90支左右(图3)。

注:按扣缝于纱布袋,扣纽缝于布条上。

(4)操作时用具应备有手套以防操作时液氮飞溅冻伤,并应有手电筒及钢卷尺,以便观测液氮存量。

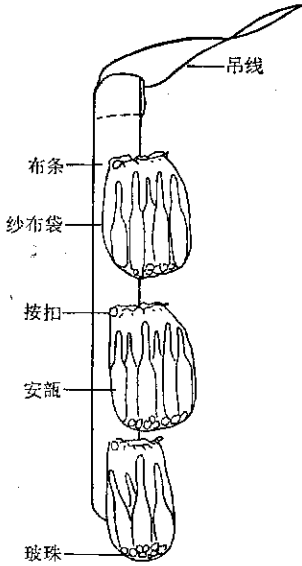


图3 存放细胞用具

## 二、使用方法

### 1. 冷冻细胞步骤

一次可冷冻细胞3—6支,我们用于保存传代人胚肺细胞、Hela细胞等。

(1)取生长良好的细胞方瓶培养物,以0.25%胰酶消化后,洗去胰酶,加少许细胞营养液,摇下细胞。以每分钟500转离心沉淀,5—10分钟后,将上清液吸出,使细胞混悬于含有10%甘油或二甲基亚砷之营养液内(15%牛血清Eagle液即可),细胞浓度约为150—200万/毫升。每1毫升安瓶内分装1毫升细胞液,火焰熔封后应置于美兰甲醇液内或倒握安瓶用力甩几次,检查是否密封。

(2)将已登记并注明细胞株号、袋次、日期的安瓶放入纱布袋内,袋口用拉线闭紧,并置于4℃冰箱4小时或一夜,以使温度逐步降低(为便于测定安瓶之降温度数,可在袋内放一小管酒精,因酒精在-30℃时不致冻结,可用温度计测定)。然后再放入液氮低温容器瓶口之保温杯内铁纱杯中。将软木塞拔去,再罩上保温杯,外加泡沫塑料圈及珍珠岩布垫压紧,约于1.5—2小时后,迅速打开保温杯,用温度计测量纱布袋旁之酒精管内温度,若温度已降低至-25℃或-30℃以下,细胞即冷冻,可以按扣扣连于上述之布条上(见图3),放入液氮中保存。将吊线固定于瓶口外之橡皮垫上,拧紧软木塞,将杯压紧即可。

### 2. 冷冻细胞复苏

将冷冻保存之细胞安瓶由纱布袋取出,检查无液氮漏入后,迅速投入37℃之水浴锅内,以使细胞悬液

很快融解(注意!!为防止有液氮漏入安瓶中,操作时可戴眼镜,以防爆炸)。融解后之细胞安瓶加入等量培养瓶中,逐步分次加入培养基,至甘油或二甲基亚砷由原浓度10%降为1%为止,次日应更换培养基一次。

## 三、初步结果与分析

### 1. 液氮消耗记录

一般市售热水瓶胆制成之装置于室温中每日约消耗液氮350克左右,于-15℃冰箱中约消耗液氮250克左右。我们于1973年下半年改用其真空度已达 $10^{-5}$ 毫米汞柱左右之热水瓶胆做成的装置,每日在室温中约消耗液氮230克左右,在-15℃冰箱每日约消耗液氮160克左右,大大地减少了液氮的消耗。此外,液氮消耗量也随外界温度、启开木塞时间长短、新放置安瓶多少而有所增加。我们所用之液氮装置八磅热水瓶胆可装液氮2.5公斤。装置内液氮最少应保持400克左右,以维持低温,一般每8—11天内,再增加液氮1.8—2.1公斤左右即可够用。

液氮容器内的液氮温度达-195℃,其上端近瓶口部分气态之温度经测定至少在-130℃以下。我们观察到,即使液氮在装置中残余量较少时,亦仍如此。按照细胞在-90℃以下即可长期保存,故细胞安瓶在装置内气态中亦可存放如此可尽量利用瓶内空间。

### 2. 细胞冷冻降温观察

细胞安瓶经4℃预冷后,再放入液氮装置瓶口的保温杯内,打开瓶口木塞,一般能在1.5到3小时,降至-25℃或-30℃以下,此时可迅速接入液氮装置内,即已完成冷冻保存手续。我们体会,如欲使细胞降温成功,细胞冻存之成活率高,应注意以下几个方面:①细胞应生长良好,忌用衰老的细胞。②若液氮装置放于-15℃冰箱内,冷冻细胞之保温杯内温度可达-40℃上下,此时冷冻细胞1.5—2小时即可。效果亦较好。若装置在室温中(18℃),保温杯内温度未打开瓶塞前只达到-18℃左右,此时冷冻降温时间应在2—3小时。降温时应以酒精管内测定之温度为准。若达不到-25℃以下,应进一步摸索延长。③降温时液氮容器内的液氮高度应在15公分以上,降温速度则不致过慢,细胞安瓶放入保温杯后,盖口宜严密。④安瓶冷冻后应迅速投入液氮内,切忌再融化。已冻存之细胞安瓶不宜经常取出,若有必要取出时,时间越短越好,否则会影响冻存效果。

### 3. 细胞保存试验

经冷冻保存之传代人胚肺细胞昆,与昆,株于冻存后,第1天,第3天,第7天,第32天进行复苏,细胞均生长良好,2至4天内能形成致密单层。现昆,株已保存一年零二个月,复苏后仍生长良好。冻存之Hela细胞至少可保存4个月以上。