

## 前言

腫瘤細胞一直是研究癌變機制、抗癌藥效、及癌變生成因子最重要的對象。腫瘤細胞的研究手法有很多種，最常見的是取癌變組織分析，但無法有效分離癌細胞或正常細胞，其結果令人質疑。其他如 LCM 方法取得癌病變區的樣品再進行分析，僅適用於石蠟包埋的組織，所得到的樣本，只能進行簡單的核酸分析，但由於核酸分離的成效、品質都差，導致分析結果常令人無法確信。而最好的方式當然是自新鮮組織的樣品中分離癌細胞，並加以培養，如此就能有源源不絕的癌細胞可供後續的蛋白質或核酸分析，唯有效的自新鮮組織分離癌細胞株需要專業技術的加持以及長時間的建立。那麼，我們如何自「新鮮組織」中分離出腫瘤細胞呢？

首先，我們必須先了解腫瘤細胞的特性：

## 一、腫瘤細胞的生物學特性

### 1、形態

形態不規則，細胞界線清晰，伸展較差，核大、核仁多且明顯。電顯觀察細胞表面微絨毛多而細密，與腫瘤細胞具不定向運動和附著不依賴性有關。

### 2、生物特性

癌細胞在無血清或低血清(<5%)時仍能生長，營養需求不高，因能自分泌促生長因子，在軟瓊脂培養時單個細胞能形成集落，生長方向性消失，再加上失去了接觸抑制，癌細胞數量增多時可呈多層重疊生長，有豐富的三極有絲分裂，分裂指數高，細胞倍增週期短。

### 3、永生性

永生性也稱不死性，在體外培養中表現為可無限制傳代而不凋亡(Apoptosis)，體外培養的腫瘤細胞系(株)都表現有這種特性。但體外培養的永生性和體內腫瘤的惡性(包括侵潤性)是兩種性狀，受不同基因調控的，因惡性腫瘤多數在體外培養時並不那麼容易獲得成功，生長增殖能力並不旺盛，有時只能傳若干代，說明體外培養的永生性可在體外培養後獲得的。另外，體外培養的許多細胞系，如NIH3T3、Rat-1 10T1/2等均具有永生性而無惡性。但兩者有相關性，永生性可能是細胞惡性變的某一階段。

### 4、侵潤性

侵潤性是腫瘤細胞擴張性增殖行為，體外培養的腫瘤細胞仍保持有這種特性，當與正常組織混合培養時，能侵潤入其他正常組織中，甚至能穿透人工隔膜。

### 5、異質性

所有腫瘤細胞都是由增殖能力、遺傳性、起源、週期狀態等性狀不同的細胞組成，屬於異質性，其中有的衰老、退化，有的處於週期阻滯狀態，只有那些處於活躍

增殖的腫瘤幹細胞才是支持腫瘤生長的成分，腫瘤幹細胞易於生長增殖，分離培養幹細胞的方法稱幹細胞培養(有幹細胞系和數個亞系組成)。

## 6、細胞遺傳性

失去二倍體核型，呈異倍體或多倍體，常有標記染色體出現，正常細胞與惡性腫瘤細胞的區別，如下表所示。

表. 區別正常成纖維細胞與惡性腫瘤細胞的常用指標

指 標	正常成纖維細胞	惡性腫瘤細胞
形 態	稜形或多角形，伸展良好，折光較弱，核漿比例小，嗜鹼性弱，核仁較少較小，多核巨細胞少見	多角形或細長形，伸展較差，折光強，核漿比例大，嗜鹼性強，核仁多、大，常見多核巨細胞
生長特性	排列有方向性，單層生長，有接觸抑制，飽和密度低	方向性消失，多層重疊生長，接觸抑制消失，飽和密度高
粘 附 性	細胞間粘附性強，緊貼壁生長	細胞間粘附性弱，易脫落
血清的要求	必須有血清	無需血清能生長
在 soft agar 中生長能力	不能生長	能生長，形成集落
電子顯微鏡觀察	核蛋白體較少，微絲微管有規則排列	核蛋白體豐富，微絲微管消失
細胞膜對低分子物質通透性	低	高
致瘤試驗	不能形成腫瘤	能形成腫瘤

## 二、分離腫瘤細胞

欲自新鮮組織中分離出癌細胞加以培養，目前主要的方法有：1) Microdissection：因需由病理醫師操作，在顯微下分離癌組織細胞，再繼以培養，所以對於一般研究者並不便利。2) Soft agar cloning：因為只有具有癌化的細胞才能在 Soft agar 生長，待細胞長出群落後，再與以分離。3) Cancer cell isolation kit：獨家研發出的試劑，經酵素分離細胞間隙再利用癌細胞易聚集成塊而形成比重較重的細胞團塊，加以分離癌細胞。其他方法，不是耗時太久，就是過於複雜，在此並不加以敘述。

## Soft agarose cloning

Soft agar 指的是半固狀的凝膠，正常的細胞必需貼附基底生長，而具癌化傾向的細胞，可以在半固狀的凝膠中懸浮生長，待細胞長成似菌落大小般時，可以簡單的用 Tip 或其他工具將 colony 挖起來。細胞間相黏緊密的，可能要用 trypsin 作用，將細胞打散，細胞間隙鬆散的可以用 pipette 直接打散。繼以培養。

而 Agar 是由中性的 Agarose 及酸性的 Agarpectin 所組成。其中常用的 Agarose 含極少量的 ester sulfates，其凝膠強度高，並且除去可能干擾細胞生長的其他鹽類，較合適細胞培養用途。

至於半固狀的 Agar，可以利用低熔點的 agarose 配製，例如 LONZA 公司生產的 SeaPlaque 就是一個純度高，熔點低的 agarose。

### 特性

- Melting temperature : <65°C
- Gelling temperature : 26-30°C
- Gel strength (1.0%) g/cm<sup>2</sup> : >200

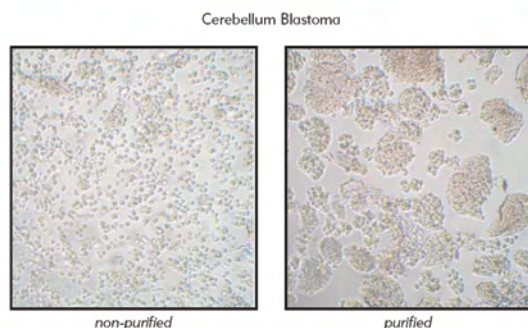
### 應用

- DNA 和 RNA 電泳 (200 bp ~ 25 kb)
- Cell culture
- Hybridoma cloning
- Viral plaque Assay

## Cancer cell isolation kit

利用癌細胞易聚集成塊的特性，在靜置的過程中，聚集成塊的癌細胞因為比重變大而落於管底的位置。

- 市面唯一可以從新鮮切片的樣品分離出癌細胞產品
- 快速建立 primary cell lines
- 分離出的細胞應用廣泛-- genetic analysis, biomarker identification 等。



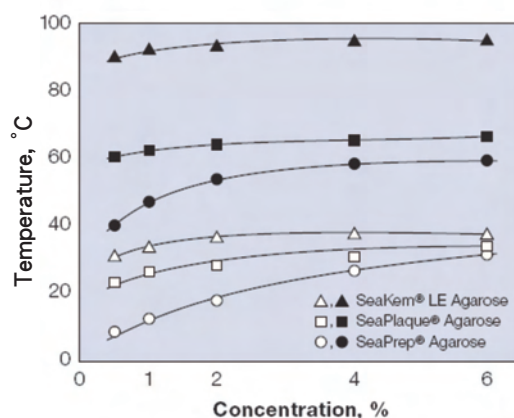
**HOT** 買本季 Cancer research tool 任一樣，  
即可以 **6900** 加購 CI0002

### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
CI0002	Cancer cell isolation kit	2 purifications

## Low melting agarose 的代名詞

## LONZA SeaPlaque Agarose



### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
50101	SeaPlaque agarose	25g
50100	SeaPlaque agarose	125g

### ■ 簡單的操作流程

- 把組織剪成小塊，加入培養液
- 離心，丟棄上清液
- 加入 Digestion solution，37度 2-4 小時
- 加入 Suspension solution，過篩後再用清洗一次
- 將 cell mixture 緩緩加入裝有 Purification solution 的管子中
- 直立管子六分鐘，待細胞聚集，取出底部 6 ml 的細胞液到新管中
- 離心後即得 tumor cell，加入培養液可繼續培養II

### 三、癌化特性檢驗

分離出的癌細胞一旦建立細胞系，就需要進行一系列的生物學特性鑑定。以確定分離出來的細胞的確具有癌化特性。目前較多人使用的方法為：

- 1、Cell Proliferation Assay
- 2、Cell Migration Assay
- 3、Angiogenesis
- 4、Tumor marker

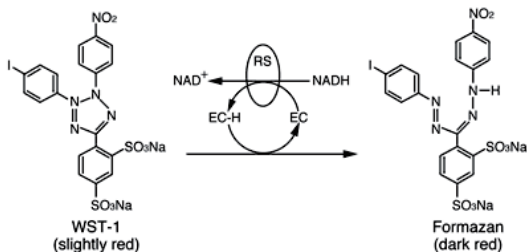


## Cell Proliferation Assay

癌細胞生長速度比正常細胞快，因此測定細胞繁殖的速度可作為一項判定的條件之一。其中，檢測細胞增生試驗中，最普遍也最簡單操作的是 WST-1 的試劑。WST-1 是 Tetrazolium 類的染劑，為 MTT 的改良版試劑，可以被粒腺體呼吸鏈上的脫氫酶還原生成橙色的產物，細胞增殖愈多，則顏色愈深，細胞毒性愈大或數量愈少，則橙色愈淺。

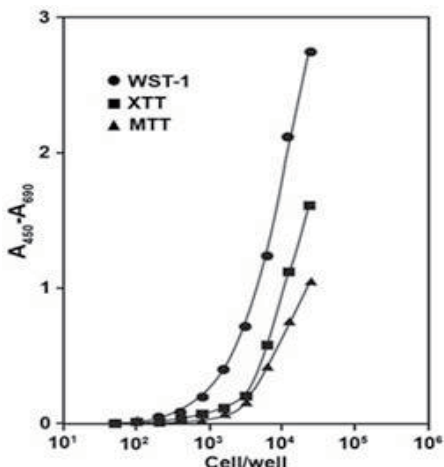
## Clontech Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent

- 精確：細胞酵素代謝活性與細胞數量息息相關
- 方便：馬上可用。
- 安全：沒有放射性物質，沒有有機溶劑
- 完全水溶：不用再 DMSO 回溶結晶
- 可反覆測定：WST-1 對細胞無毒性，因此可置入 Incubator，方便找到最佳的偵測時間。
- 血清及酚紅對實驗結果沒有明顯影響。



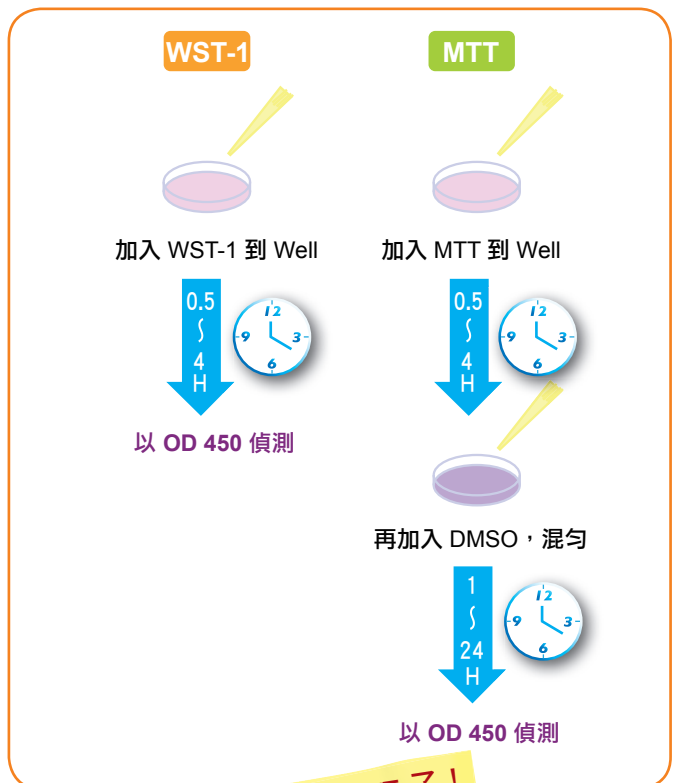
偵測粒腺體內的 Succinate Reductase 活性

### WST-1 與 XTT 及 MTT 的靈敏度比較



三種試劑中，以 WST-1 的靈敏度及線性度最佳。

### WST-1 與 MTT 流程比較



不要再 MTT 了!

拯救雙手，佛心專案  
**\$15,000.**

#### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
630118	WST-1 cell proliferation reagent	2,500 mxs

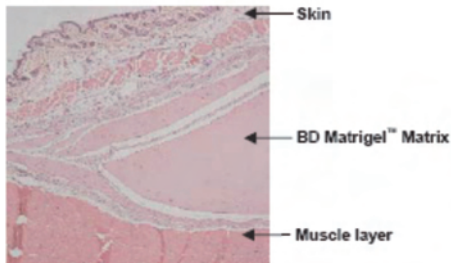
## BD Matrigel for Angiogenesis

Matrigel 由 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma 純化出來，是理想細胞基質的配方，不但擁有豐富的 ECM 蛋白，更含有生長所需的因子，在室溫的狀態下，能聚合成具有活性膠狀物質，是模擬細胞生長環境最佳的選擇。而血管新生的過程中，內皮細胞會分泌酵素分解ECM裡面的Collagen IV，造成細胞的遊走，經一連串的增生分化，最後形成管狀般的血管構造。Matrigel 已被證明可在 In vitro 的模式中引起在以 HUVEC血管新生。此外，也可應用於 In Vivo 的方式，以Plug assay 的方式，將 Matrigel 打入小鼠皮下，形成 Matrigel Plug，可輕易以手術的方法取出，觀察血管新生的情形。

### In Vivo study

#### 特點：

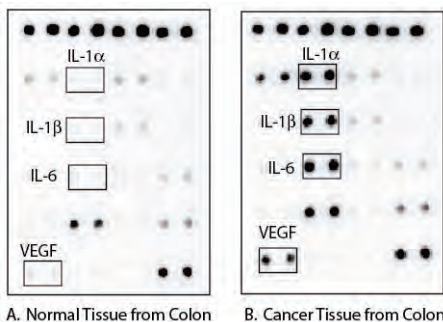
- 促進腫瘤在裸鼠體內生長速度
- 利於觀察與研究體內腫瘤血管新生情形



## Panomics Angiogenesis Ab Array

將許多與 Angiogenesis 相關蛋白的抗體點在膜上，一次可以 screen 多種 angiogenesis 蛋白的表現量，如 ELISA 型式般，簡單又好操作。

- 高敏感度：可測得 pg/ml 的蛋白
- 適用樣品範圍廣泛：Cell lysate、plasma、tissue lysate、conditioned media 皆可以使用
- 非放射性偵測：以 HRP 冷光呈色，可在 CCD Camera 上測偵，或是底片顯影。
- 每個蛋白點有兩重覆，結果更可信。
- Human array 可測得 19 個蛋白，Mouse array 可測得 18 個蛋白。



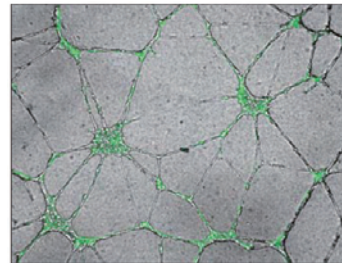
#### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
MA6310	Human Angiogenesis Ab Array	4 arrays
MA6320	Mouse Angiogenesis Ab Array	4 arrays

### In Vivo study

#### 特點：

- 專利 coating 技術，使 Matrigel 均勻分佈，實驗再現性極高
- 高透明度之96well盤底，便於取得清晰之血管分佈影像，而有較準確之數據分析結果
- 透過自動影像偵測系統，可快速獲取數據
- 本血管新生產品，僅偵測血管長度作為血管新生的參考值。



BD™ HUVEC-2 cells were assayed using the BD BioCoat Angiogenesis System: Endothelial Cell Tube Formation (Cat. No. 354149).

#### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
354149	Angiogenesis System:	1 plate
354150	Endothelial Cell Tube Formation	5 plate
354248	Matrigel matrix high protein concentration (18-22 mg/ml)	10 mL

## Millicell® Inserts



- 圓柱型加高設計，邊緣無開口，內外培養液不易相混，避免造成實驗誤差。
- 單顆無菌包裝，自由調整使用量，節省成本。
- 三端不對稱懸掛式設計，方便更換培養液及藥物的添加。
- 根據不同應用可選擇不同的孔徑大小。
- 另有站立式 Millicell，提供PCF、MCE、PTFE材質任君選擇。
- 24 well 及96 well 盤式Millicell方便大量培養使用。

#### 訂購資訊

貨號	品名	包裝
PIEP12R48	Millicell Hanging Cell Culture 24 well PET 8um	48/pk
PIEP15R48	Millicell Hanging Cell Culture 12 well PET 8um	48/pk
PIEP30R48	Millicell Hanging Cell Culture 6 well PET 8um	48/pk
PI8P01250	Millicell Standing Cell Culture 24 well PCF 8um	50/pk