

现代实用医学实验技术丛书

XIANDAI SHIYONG ZUZHIXUE
YU ZUZH HUAXUE JISHU

现代实用组织学 与组织化学技术

刘能保 王西明 主编
湖北科学技术出版社



51.45
196

现代实用医学实验技术丛书

XIANDAI SHIYONG ZUZHIXUE
YU ZUZH HUAXUE JISHU

现代实用组织学 与组织化学技术

●

刘能保 王西明 主编
湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代实用组织学与组织化学技术/刘能保,王西明主编,一武汉:湖北科学技术出版社,2003.3

(现代实用医学实验技术丛书)

ISBN 7-5352-2939-5

I. 现… II. ①刘… ②王… III. ①人体组织学—技术②人体组织学;化学—技术 IV. R329-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 110687 号

现代实用医学实验技术丛书

现代实用组织学与组织化学技术

©刘能保 王西明 主编

策 划:冯友仁

封面设计:张 浩

责任编辑:李海宁

责任校对:蒋 静

出版发行:湖北科学技术出版社

电话:86782508

地 址:武汉市武昌黄鹂路 75 号

邮编:430077

印 刷:石首市印刷一厂

邮编:434400

督 印:刘春尧

787mm×1092mm

16 开

19.25 印张

464 千字

2003 年 3 月第 1 版

2003 年 3 月第 1 次印刷

印 数:0 001-2 000

ISBN 7-5352-2939-5/R·663

定价:35.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

《现代实用医学实验技术丛书》

编辑委员会

屈 伸 沈关心 王西明

王淳本 刘能保 姜昌富

吴雄文 余从年 梁智辉

丛书策划

冯友仁

内 容 简 介

全书包括7章,介绍了各种现代组织学技术和现代组织化学技术。第一章,组织培养:介绍组织培养的基本培养技术,培养用液,传代细胞的培养,细胞克隆技术,各种器官组织的培养和组织培养技术的应用;第二章,组织化学:介绍经典组织化学的基本概念,组织化学技术的基本要求,标本的制备,多种光镜和电镜组织化学技术程序,主要是各种酶的光镜和电镜组织化学技术程序;第三章,免疫组织化学:介绍免疫组织化学的基本概念,免疫组织化学技术的基本要求,抗原与抗体的概念,各种基本的免疫组织化学技术原理,包括免疫荧光技术、免疫酶技术、亲合素-生物素技术和免疫胶体金技术的原理;标本的制备和多种染色程序,包括单、双标记的光、电镜免疫组织化学技术染色程序;第四章,原位杂交组织化学:介绍原位杂交的基本技术,各种技术的操作程序,原位杂交结合免疫组织化学的双标记程序,双重原位杂交标记程序,薄片组织及整体组织原位杂交程序和电镜原位杂交程序;第五章,定量组织化学技术:介绍目测定量术,显微分光光度术和图象分析系统;第六章,流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术:介绍流式细胞术的工作原理、功用、标本的制备和各种染色方法以及激光扫描共聚焦显微术的仪器系统组成、工作原理、主要特性、基本功能和样本制备的几种荧光染色法;第七章,凋亡细胞的检测:介绍凋亡细胞的光、电镜形态学检测,流式细胞术检测,TUNEL法检测,凋亡相关蛋白及酶的检测和DNA裂解的检测。

本书所介绍的众多现代组织学和现代组织化学技术可供从事基础研究和临床诊断工作的教师、医师、研究生和科研人员参考应用。

前 言

信息科学、生命科学和材料科学已成为我国现代科学的三大前沿学科。其中生命科学近 20 年来有了飞速发展,新发现和新理论不断涌现。作为生命科学的组成部分,人体组织学,其内容也不断更新和充实。组织学自 1830 年比利时植物学家 Raspail 发表《在生理学中使用显微镜观察化学物质》的论著起,就进入了组织化学阶段,此后的近两个世纪,特别是近半个多世纪以来,组织学与组织化学从定性、定位进入了定量阶段。此后的研究又由显微结构到超微结构,静态到动态,二维平面结构到三维立体结构,死细胞到活细胞,分析到分选,细胞水平到分子水平等,总之,组织学与组织化学有了很大发展,从而为基础医学和临床医学的发展作出了贡献。而组织学与组织化学的这些发展与相关技术手段,特别是与近年发展起来的光电检测技术和计算机技术等的发展和进步是息息相关的,也就是说,只有有了先进的科学技术手段,才会有生命科学长足的发展,反过来,生命科学的长足发展又促进了科学技术手段的不断改进和水平的提高。这就是我们编写本书的基本思考。

本书包括组织培养、组织化学、免疫组织化学、原位杂交组织化学、定量组织化学技术、流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术、凋亡细胞的检测,共 7 章。组织培养,本来是细胞学和组织学的经典技术之一,但现在在整个医学科学中已被广泛应用;包括经典组织化学、免疫组织化学和原位杂交组织化学在内的广义组织化学是介于细胞学、组织学以及生物化学、分子生物学之间的新兴边缘学科,已成为医学生物学科科研工作的重要手段;定量组织化学技术主要用于组织化学的原位定量研究,是组织化学从定性、定位研究进入定量研究的重要手段;流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术使组织化学的定性、定位和定量研究又有了新的突破,特别是激光扫描共聚焦显微术可在三维立体结构层面对细胞内化学物质进行更深层次的研究,并在各种细胞的微型手术切割以及细胞膜流动性、膜电位、膜通透性、高分子物质扩散和受体移动等的检测方面有了越来越广泛的应用;细胞凋亡的检测则是组织化学、生物化学和分子生物学技术在新的研究领域的新的应用。

为了压缩篇幅,增加实用性,本书从简了理论叙述,精简了不太常用的技术程序,减少了插图,而对于每个技术程序的介绍尽可能详细具体,以便于实验操作。总之,力求使本书做到简明、实用。

编者在长期从事教学工作的同时,采用本书所介绍的研究技术开展了包括与国外同行进行科研合作在内的大量科学实验工作。所以,本书汇集了编者长期科研实践的体会,也汇集了阅读许多有关专著、著作和文献的心得。由于编者水平有限,书中疏漏和错误之处,恳请广大读者批评指正。

编 者
2002 年 8 月

目 录

第一章 组织培养 (1)

第一节 基本培养技术 (1)	五、琼脂平板克隆培养 (39)
一、基本操作和培养技术 (1)	六、饲细胞层克隆法 (40)
二、常规组织培养法 (15)	第五节 各种器官组织的培养 (40)
三、特殊组织培养法 (18)	一、神经组织细胞的培养 (40)
第二节 组织培养用液 (24)	二、动脉壁平滑肌细胞培养 (43)
一、水 (24)	三、骨髓细胞的培养 (44)
二、平衡盐溶液 (25)	四、人表皮细胞的培养 (45)
三、常用试剂 (27)	五、气管上皮细胞的培养 (46)
四、常用培养液 (30)	六、乳腺上皮细胞的培养 (48)
第三节 传代细胞的培养 (34)	七、血管内皮细胞的培养 (49)
一、贴壁细胞的传代培养 (34)	八、肝细胞的培养 (51)
二、悬浮细胞的传代培养 (36)	九、胰岛组织的培养 (52)
第四节 细胞克隆技术 (36)	第六节 组织培养技术
一、低密度细胞悬液的制备 (37)	的应用研究 (54)
二、多孔板克隆细胞法 (37)	一、药物测试中的组织培养 (55)
三、Puck 法检测克隆形成率 (38)	二、杂交瘤技术中的细胞培养 (59)
四、软琼脂克隆形成法 (39)	三、组织培养技术的其他应用 (64)

第二章 组织化学 (67)

第一节 概述 (67)	三、脂类的显示 (78)
一、组织化学的基本概念 (67)	四、醛复红染色法 (82)
二、组织化学技术的基本要求 (67)	五、酶类的显示法 (83)
第二节 组织化学标本的制备 (68)	第四节 电镜组织化学 (110)
一、组织的固定 (68)	一、电镜组织化学的基本程序 (110)
二、组织切片的制备 (70)	二、糖类的电镜组织化学 (111)
第三节 光镜组织化学 (72)	三、脂类的电镜组织化学 (114)
一、多糖的显示 (72)	四、酶类的电镜组织化学 (115)
二、核酸的显示法 (75)	

第一节 原位杂交的基本程序	(169)	化学双标记	(183)
一、组织取材与处理	(169)	一、同位素原位杂交与免疫组织	
二、杂交前处理	(170)	化学 PAP 结合法	(184)
三、杂交反应	(171)	二、地高辛标记与免疫组织	
四、杂交后处理	(173)	化学 PAP 结合法	(185)
五、杂交体的检测	(173)	三、PCR 与原位杂交结合法	(187)
六、对照试验	(174)	第四节 双重标记原位杂交	(188)
第二节 原位杂交技术的		一、射性同位素和非放射性标记	
操作程序	(174)	探针结合的双重标记原位杂交	
一、细胞和组织切片的制作	(174)		(188)
二、预杂交(以双链探针检测		二、非放射性标记探针的	
DNA 为例)	(177)	双重标记原位杂交	(189)
三、杂交反应	(178)	第五节 薄片组织和整体组织原位	
四、杂交后处理	(178)	杂交	(190)
五、标记与检测	(178)	一、薄片组织的原位杂交	(190)
六、地高辛标记探针原位杂交的		二、整体组织原位杂交	(191)
操作程序	(182)	第六节 电镜原位杂交	(195)
第三节 原位杂交结合免疫组织		一、电镜原位杂交基本操作	

步骤·····	(195)	四、同位素标记 cRNA 探针电泳	
二、蛋白 A-金-生物素标记		原位杂交·····	(199)
DNA 探针电泳原位杂交·····	(195)	五、电泳原位杂交应注意的	
三、地高辛标记 rRNA 探针电泳		问题·····	(199)
原位杂交·····	(197)		

第五章 定量组织化学技术····· (201)

第一节 目测定量术·····	(201)	基本方法·····	(203)
第二节 显微分光光度术·····	(202)	第三节 图象分析系统·····	(204)
一、显微分光光度计的原理·····	(202)	一、图象分析系统的基本原理·····	(205)
二、显微分光光度计的组成·····	(202)	二、图象分析系统的组成·····	(205)
三、显微分光光度计测量的		三、图象分析系统的工作程序·····	(206)

第六章 流式细胞术和激光扫描共聚焦显微术····· (213)

第一节 流式细胞术·····	(213)	七、DNA 倍体分析·····	(219)
一、概述·····	(213)	八、Bcl-2 基因蛋白的分析·····	(219)
二、流式细胞仪的工作原理·····	(213)	第二节 激光扫描共聚焦显微术·····	(220)
三、流式细胞仪的功用·····	(214)	一、仪器系统组成·····	(220)
四、流式细胞仪样本的制备·····	(214)	二、工作原理·····	(220)
五、染色方法·····	(216)	三、主要特性·····	(220)
六、人外周血 T 淋巴细胞亚群的		四、基本功能·····	(222)
检测·····	(218)	五、几种荧光染色法·····	(225)

第七章 凋亡细胞的检测····· (231)

第一节 凋亡细胞的形态学检测·····	(231)	四、Annexin 法·····	(241)
一、光学显微镜观察法·····	(232)	第三节 凋亡细胞的 TUNEL 法	
二、透射电子显微镜观察法·····	(235)	检测·····	(241)
第二节 凋亡细胞的流式细胞术		一、过氧化物酶标记测定法·····	(241)
检测·····	(236)	二、荧光素标记测定法·····	(244)
一、PI 染色法·····	(237)	三、生物素-dUTP/酶标亲和	
二、Hoechst-PI 染色法·····	(238)	素测定法·····	(246)
三、荧光素标记测定法·····	(239)	第四节 细胞凋亡相关蛋白和酶	

的检测	(248)	检测	(253)
一、Fas 抗原的检测	(248)	一、细胞凋亡 DNA 裂解的生化	
二、Bcl-2 蛋白的检测	(250)	检测法	(253)
三、P53 蛋白的检测	(250)	二、细胞凋亡 DNA 裂解的免疫	
四、caspase 3 活性的检测	(251)	化学检测法	(254)
五、PARP 活性的测定	(252)	三、细胞凋亡 DNA 裂解的分子	
第五节 细胞凋亡 DNA 裂解的		生物学检测法	(256)

附 录 (259)

附录一 组织化学常用缓冲液	(259)	附录三 原位杂交组织化学常	
附录二 免疫组织化学常用		用溶液	(284)
溶液	(269)	附录四 中英文名词对照索引	(289)

第一章 组织培养

组织培养(tissue culture)是指从活体取出组织和细胞,在体外模拟体内的生理环境,即提供无菌、适宜温度和一定营养成分等条件,使之生存并生长,维持其结构与功能的技术。广义的组织培养也包括细胞培养(cell culture)和器官培养(organ culture)。采用的技术与组织培养的相同或相似。细胞培养的培养物是单个细胞或细胞群,使之得以在体外生存和生长,并维持其结构与功能;器官培养的培养物为某种器官的原基、器官的全部或部分,使之得以在体外生存和生长,并维持其一定的功能。细胞培养、组织培养和器官培养统称为体外培养(in vitro)。在培养过程中,无论是组织还是细胞,都是生存在人工环境中。生存环境的改变,细胞的运动,培养时间过长,特别是反复传代,以及其他因素的影响,都容易引起细胞的改变,或出现单一细胞类型,组织培养最终成了细胞培养。另一方面,细胞培养中的细胞也并不是彼此独立的,而是细胞之间相互依存,而呈现一定的“组织”特性,于是,细胞培养也成了组织培养。所以组织培养与细胞培养并无严格的界限。

组织培养是在器官、组织和细胞水平上研究生命现象的一种极好的实验手段,组织培养所制备的细胞应具有纯一性,由于物种、个体遗传背景、器官种类及其所处发育阶段等的不同,给组织培养的研究和应用带来很大困难,为了获取大量其生物学性状相同的细胞,必须进行细胞克隆。另外,凡为了培养而制备的细胞必须具有活力,在体外营养环境中能生长、增殖。同时,培养中的细胞系统均会受到营养系统和环境系统的影响与制约。以上这些问题都是组织培养技术所涉及的各种方法和措施的基本依据,其中,无菌技术则是组织培养成功的首要条件。

第一节 基本培养技术

一、基本操作和培养技术

人体内各种各样的组织细胞由于分化导致其相互间存在着差异,使它们均具有不同的生物学个性,反映在对于体外培养条件上各有其不同的要求。因此在培养技术上,培养不同组织细胞需用不同的培养方法,也就是说,培养任何一种组织细胞都需要使用相应的特定技术。但各种组织细胞间毕竟还存在着共性和共同的条件需求,所以培养方法虽多,但其基本方法却大同小异。各种不同的培养技术也都是在此基础上产生和衍化出来的。差别主要在一些技术细节和个别细胞所需的培养液稍有差异而已。故在此重点介绍基本的培养方法和原理等。

(一) 基本要求

1. 无菌操作

组织培养成功的首要条件是防止污染。由于体外培养细胞缺乏抗感染能力,故在一切操作中要努力做到最大限度的无菌。为达到这一要求,所有操作要求应有有条不紊和安全可靠地进行,目的之一就是防止污染。

2. 培养前准备

培养前必须做好充分的准备,对初学者,首先要制定详细的培养方案,按照此方案作好包

括所需的物品器材、试剂及溶液、消毒灭菌和工作场地等的一切准备,并将物品器材、试剂及溶液等分门别类,各就各位地放置,避免在操作开始后,因物品、试剂等的乱放而往返拿取时增加污染机会。同时,要使一切操作均能有条不紊地进行。

1) 操作野消毒

现多用紫外线灭菌,效果很好。用 30W 紫外线管灯,操作箱消毒 20 ~ 30 min 即可。操作室空间大,需消毒 30 ~ 50 min。净化工作台亦可设紫外线灯,主要用于消毒台面上的用品,但对台面流动的空气无意义。在用紫外线灯照射期间,操作台面上勿放置培养细胞和培养用液等物,如果确需放置,需用纸张覆盖,以免它们受射线影响。紫外线具有直接杀菌作用,工作用品过多或重叠放置,物品相互遮挡射线,会降低消毒效果。

2) 洗手和着装

基本上和外科手术的要求相同。在利用无菌箱工作时,因整个前臂要伸入箱内,洗刷时一定要清洗到肘部。必要时亦可用 0.2 % 的新洁尔灭洗涤消毒。在进行培养操作时,如利用净化工作台,仅戴口罩和工作帽,着一般工作服即可。在无菌室内工作时需着消毒衣帽。

3) 火焰消毒

在无菌环境中进行培养或做其他无菌操作时,首先要点燃酒精灯或煤气灯。以后一切操作,如安装吸管帽,开启或封闭瓶口等,都需经过火焰烧灼消毒。金属器械不能在火焰中烧得时间过长,以防退火。已吸取过营养液的吸管不能再火焰烧灼,因吸管头中残留的营养液会被烧焦形成炭膜,再用时会将其带入培养液中。消毒火焰要求无色或微蓝色,而红黄色或发黑的火苗,表示燃烧不完全或含有杂质,会将有害物带入培养液内。因此酒精灯需用 96 % 的不含杂质的酒精,绝不能使用含有二甲苯和甲醇的酒精。如用煤气灯,要有空气输入口以保证燃烧充分。

3. 操作要求

培养操作时,动作要准确敏捷而又不能太快,以防空气流动,增加污染机会。不能用手触及已消毒器皿,如已接触,则需用火焰烧灼消毒触及部位,如不便消毒,应予更换。为便于拿送用品,工作台面上的器材物品等的放置要有合理的布局。工作自始至终要保持一定的顺序。组织或细胞在未做处理之前,勿过早暴露在空气中。同样,培养液在未用前,不要过早开瓶,用过之后如不再重复使用,应立即封闭瓶口。培养用瓶开瓶以后,皆应保持 45° 斜位或平放,开口向上,长时间直立会增加向瓶内落菌的机会。吸取营养液、BSS、细胞悬液及其他各种溶液时,均应分别使用各自的吸管,不能混用,以防扩大污染或导致细胞间交叉污染。工作中不能面向操作台讲话或咳嗽,以免引起污染。

(二) 基本培养操作方法

1. 取材

理论上,各种动物和人体内的所有组织都可进行培养,实际上幼体组织,尤其是胚胎组织比成年尤其是老年个体的组织容易培养,分化程度低的组织比分化程度高的容易培养,肿瘤组织比正常组织容易培养。在无特定要求时,可取易培养的组织进行培养,成功率高。取材之后,最好立即培养,如因故不能培养时,应把组织切成 1cm³ 左右的小块,置于培养液中,4℃ 贮存,存放时间不宜超过 24 h,放置时间过长或组织块过大,细胞容易坏死。从体内取材时,应严格防止受到任何污染,也要避免受到紫外线照射或接触任何化学试剂及有害药物,如碘、汞等。取肿瘤和其他病理组织时容易带菌,为减少污染,可用含 500 ~ 1 000 U/ml 的青、链霉素 BSS 液,漂洗 5 ~ 10 min 后再做培养处理。外科手术取材时,预先于手术室内放置消毒好的平皿备

用,手术取下的组织置入平皿内,立即送培养室培养。

详细记录组织种类和组织供体的各种有关资讯等。

1)取鸡胚组织

组织培养所使用的鸡胚,一般应自行孵化处理,方法如下:

(1)选取健康受精鸡卵,置其内放有水皿的 37℃ 温箱内孵化,每日翻卵一次(180°)孵化 9~12 日后,取出鸡卵置小烧杯中,气室端朝上,碘酒和酒精消毒蛋壳;

(2)用消毒剪剪去气室端蛋壳,小心拨开尿囊膜,用弯玻棒或弯镊伸到胚体颈下方,轻轻挑起鸡胚置入平皿中;

(3)注意剔除胚眼、血块和尿囊膜等物,以免对细胞产生不良影响。BSS 冲洗鸡胚;

(4)将鸡胚置入小烧杯中用眼科剪剪碎,再用组织研磨器研磨,或置入无针头的 20~50 ml 注射器中直接挤压入无菌小烧杯中;

(5)加入等量的 Hanks 液,用吸管轻轻吹打均匀,密封后于 37℃ 温箱中置 30 min;

(6)3 000 r/min,离心 30 min,无菌取上清分装入小瓶内,-20℃ 保存,用前再离心一次,取上清使用。

2)取鼠胚组织

小鼠组织作为培养材料的优点是取材方便,生长效果好,又是与人相近的哺乳动物。小鼠皮毛中易隐藏微生物,且不易消毒,用以下方法取材效果甚好:

离断颈椎处死动物,即用一手捏住鼠尾,另手摸到鼠颈椎,用拇、食指夹住并用力快速卡断,即可处死动物。如取脑和脊髓等组织宜用其他处死方法。然后把整个小鼠浸入盛有 75% 酒精的烧杯中,置 2~3 sec(不能过长)后,取出抖掉酒精,置入碟皿中。动物虽浸过酒精,因动物口和肛门紧闭,酒精在使体表灭菌的同时不会进入体内,又能防止解剖动物时皮毛中的脏物飞扬引起污染。继之在动物躯干中部用尖剪刀环行切开皮肤,用止血钳分别夹住两侧皮肤拉向头尾两端,把动物躯体翻包起来,暴露出胸腹部,剖腹取出鼠胚或其他组织,置入无菌碟皿中备用。注意避免沾染酒精。

3)取皮肤

取皮肤通常于上臂和大腿内侧等处进行。先用肥皂洗净取材部位的皮肤,用 75% 酒精擦拭消毒 2~3 次(勿用碘酒)。取材方法可按如下两种方法:一是用注射器针尖轻轻斜刺入表皮内 2 mm 左右,向上挑起一个小的皮丘,然后用手术刀紧贴针尖下方,切下直径 2~3 mm 小片,深度以创面微见血迹为度;二是用拇指和食指将取皮部位的皮肤紧紧捏起,在绷起的皮肤表面,用手术刀轻轻片取一小片表皮,大小和深度同前。这样取材难免带一些真皮组织,必要时亦可用外科刮皮刀刮去,可能稍有出血。操作需在手术室进行。如取皮厚度适宜,术后包扎好伤口,恢复很快,并不致留显著瘢痕。刮皮刀取皮的优点是表皮细胞多,培养易成功。

4)取体液

血液白细胞是常用的培养材料,一般多用常规静脉抽血法取血,亦可从耳垂或指尖取血。从无名指尖取血很好,血多,消毒和取血都方便,刺口恢复很快不易感染。从手指取 2~3 滴血即够一次培养,血用量多时需从静脉采取。为防止凝血,常用肝素等抗凝剂,加入抗凝剂的量以量最小又不失抗凝效果为好。肝素常用浓度为 20 U/ml,抽血前先用 500 U/ml 肝素(生理盐水配制)湿润针管后推出亦可。吸出血后拔掉针头,立即把血注入无菌容器中备用。取骨髓组织、羊水、胸水和腹水按临床有关手术规程进行。

2. 组织的分离

自体内取出的各种组织均由众多细胞和纤维成分组成,且相互结合紧密。为获取多量生长良好的细胞,必须在不使细胞受到伤害的情况下,把组织细胞分散开,使细胞游离出来,尽可能达到单细胞水平,以利于细胞培养之需。分散细胞的方法有机械法和化学法两种,应根据组织种类和培养要求,采用相应的方法。

1) 离心分离法

当培养物为血液、羊水、腹水和胸水等细胞悬液时,可采用离心法分离。一般用低速 500 ~ 1 000 r/min 速度,离心 5 ~ 10 min。如悬液量大,离心时间可适当延长,但如离心速度过快和时间太长,易压挤细胞使之受损或死亡。微量全血培养淋巴细胞时,可不必进行淋巴细胞分离,可采用全血培养法。在需用大量白细胞进行培养情况下,才应采用特殊分离技术,如使用分层液等方法。国产淋巴细胞分层液 (lymphocyte separation medium) 效果很好。分层液是根据细胞比重不同,使各类细胞彼此分开。分层液适用于分离血中淋巴细胞。

(1) 取抗凝血若干毫升;

(2) 按 1:1 加入无菌分层液(滤过除菌)后,800 ~ 1 000 r/min 离心;

(3) 无菌分离出白细胞(白细胞位于红细胞上层,呈微白色);

(4) BSS 漂洗 1 ~ 2 次,用于培养或其他实验。

如用动物(如小鼠)血,白细胞的比重与人不同,需用相应比重的分层液。

2) 机械分散法

(1) 切割分散法:在进行组织块培养时,通常采用 1 mm³ 大小的组织块。无菌切取 1 cm³ 组织一块,置入青霉素瓶或小烧杯中,一手斜持容器,另手持眼科尖剪或弯剪(剪柄较长为好)伸入容器中,反复剪切组织至 1 mm³ 大小为止(成糊状)。然后用吸管吸取 Hanks 液把附着在剪刀上的组织小块冲下,并再补加 3 ~ 5 ml Hanks 液,用吸管反复轻轻吸吹冲打片刻,低速离心、去上清、余下组织块即可用于培养。剪刀剪切法可能对组织有一定损伤,但操作比较方便。另外,亦可用手术刀反复切割,即把组织块放在凹窝玻璃中,两手各持尖手术刀一把,交错反复切割至 1 mm³ 为止。手术刀切割法对组织损伤较小,但在空气中暴露的时间较长,污染机会大些。以上两种方法均适用于组织块培养法,可根据实际情况和个人习惯选用。

(2) 机械分散法:某些软组织如脑、胚胎和一些肿瘤组织等,可采用此法分散。常用方法有两种,一是压挤法,即把组织放入注射器针管中压挤,获取细胞;二是压取法,即把组织置于不锈钢纱网中用钝物压挤,获取细胞。无论用哪一种方法,都应把组织块先剪成小块后再处理。其中以压取法较多用,其方法如下:

I. 所需器材和溶液

镊子	2 个
不锈钢网或尼龙筛(网眼有 1 mm、100 μ m 和 20 μ m 三种,依组织硬度选用)	1 个
直径 10 cm 碟皿	2 个
吸管	2 个
20 ml 注射器	1 支
培养瓶	1 个
Hanks 液	100 ml
培养液	50 ml

II. 分散步骤

① 清洗预切: 取得组织后, 先用 BSS 洗去除表面血污, 然后预切成 $5 \sim 10 \text{ mm}^3$ 的小块, 置入 1 mm 孔径的不锈钢网筛中。

② 压挤: 将网筛放在大碟皿上, 一只手持网筛柄, 另一只手用无菌试管末端轻轻压挤组织, 使之穿过纱网, 然后用吸管吸取营养液把纱网上剩余组织吹洗掉。

③ 重复压挤: 用吸管从碟皿中吸出较大组织块, 置 $100 \mu\text{m}$ 孔径筛中, 再压挤, 方法同②。

④ 镜检: 可先吸取少许悬液镜检, 如组织块过大, 可再用 $20 \mu\text{m}$ 孔径筛做进一步压挤, 以分散成单个细胞或细胞团。被滤过的悬液即可用于培养。

⑤ 培养: 计数细胞后, 接种培养。

III. 说明

机械纱网压挤滤过法简便易行, 节省时间, 但对组织可能有一定损伤。纱网网眼愈小, 所需压力越大, 组织受损越重, 故本法仅适用于处理软组织, 对较硬组织和纤维性组织效果不好。

3) 消化分散法

此法是在把组织剪切成较小体积的基础上, 应用生化和化学方法进一步将组织细胞分散成细胞团或单个细胞, 然后加入培养液制成细胞悬液, 接种于培养容器中, 细胞容易生长增殖。各种消化液的作用机制各不相同, 应根据不同组织选用相应的消化液。

(1) 胰蛋白酶消化法: 胰蛋白酶是广泛应用的消化物。胰蛋白酶适于消化细胞外基质较少的软组织, 如上皮组织、胚胎组织、羊膜、肝、肾等软组织, 对细胞传代也非常好。用于消化纤维性组织或较硬的癌组织则效果较差。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对胰蛋白酶的活性有一定抑制作用, 故需用不含这些离子的 BSS 配制。血清有抑制胰蛋白酶活性的作用, 因此在做细胞传代培养时, 用胰蛋白酶消化细胞后, 可不必再用 Hanks 液冲洗, 可直接加入含有血清的培养液进行培养。残留的微量胰蛋白酶即被血清抑活, 对细胞没有什么影响。胰蛋白酶的消化作用, 与 pH、温度、组织块的大小、组织的硬度和胰蛋白酶的浓度都有关系。胰蛋白酶的应用浓度在 $0.01\% \sim 0.5\%$ 范围, 常用 0.25% 浓度, 37°C 下, $10 \sim 30 \text{ min}$ 即可消化 5 mm^3 大小的胚胎类软组织。大块组织或成体较硬组织, 可延长至数小时。当置于 4°C 时, 仍有缓慢消化作用, 消化时间可延长 $12 \sim 20 \text{ h}$ 。浓度过大或消化时间太长, 细胞可被消化掉, 但消化不充分也达不到分散细胞的目的。pH $8 \sim 9$ 较好。因此在新的条件下使用胰蛋白酶时, 开始可做些探测性预备试验, 以确定出最佳条件。其方法如下:

I. 所需器材和溶液

新鲜组织	若干
Hanks 液	若干
培养液	若干
三角烧瓶	1 个
吸管	若干支
0.25% 的胰蛋白酶	若干

II. 消化分散步骤

① 剪切: 把组织剪切成 $3 \sim 5 \text{ mm}^3$ 的小块。

② 加消化液: 把组织置入三角烧瓶中(瓶内置铁蕊搅棒或玻璃小球), 注入比组织量多 $30 \sim 50$ 倍已预温至 37°C 的 0.25% 的胰蛋白酶。

③ 消化: 置电磁搅拌器上, 搅拌消化 $30 \sim 60 \text{ min}$, 或置于 37°C 水浴中, 或放于 37°C 培养箱

中消化。在后两种情况下,每隔 5~10 min 摇动一次。如需长时间消化,中间可更换一次消化液,然后静置三角烧瓶 10 min,待组织下沉后,吸除 2/3 上清,余 1/3,再补加新胰蛋白酶液,继续消化。

④ 消化完毕,倒入离心管中,800 r/min,离心 6~8 min 后,吸除上清。

⑤ 用 Hanks 液漂洗 2~3 min,离心去上清,共两次。

⑥ 800 r/min,离心 5 min 后,去上清,加入一定量的营养液,通过 100 μm 孔径网眼的尼龙网或不锈钢纱网(或 3~4 层无菌纱布)滤过,以除掉未充分消化的较大块组织,如消化彻底可不过滤。用吸管吸取一滴细胞悬液于载玻片上观察,如细胞分散良好,形态完整,即可用于培养。

III. 说明

在 37℃ 下用胰蛋白酶长时间(1 h 以上)消化纤维性组织时,组织块表层细胞可随时从纤维网架中脱落下来。因此每隔 20~30 min,需用 20~50 μm 孔径的不锈钢网滤过一次,离心,收集这些细胞,以免它们被消化过度而破坏。如系冷消化,在从 4℃ 中取出后,亦应先滤过一次,离心,除上清,收集已游离下来的细胞,再向消化容器中补足新胰蛋白酶液,并再重置入 37℃ 培养箱中,继续温消化剩余组织 20~30 min,这样可能效果更好。上述方法主要适用于消化大量组织的初代培养法,如消化传代培养细胞,多与 EDTA 混合应用。

(2) 胶原酶消化法:胶原酶(collagenase)适于消化纤维性组织、上皮组织和癌组织等。上皮细胞本身对胶原酶有一定耐受性,但胶原酶对细胞间质有好的消化作用,可使上皮细胞与胶原成分脱离而不会受损伤,效果甚好。同时,此酶消化作用缓和,且无需机械振荡。此酶在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 存在的情况下仍有活性,故可用 BSS 和含有血清的培养液配制。所需最终浓度为 200 U/ml 或 0.1~0.3 mg/ml。消化程序如下:

I. 所需器材和溶液

25 cm 培养瓶	2 个
离心管	2 个
胶原酶(2 000 U/ml)干液	20 ml

II. 消化分散步骤

① 将漂洗干净的组织剪切成 1~5 mm^3 的小块,于每一培养瓶中置入若干块。

② 向每瓶中加入 4.5 ml 培养液,再注入 5 ml 粗胶原酶,使最终浓度为 200 U/ml, pH 6.5。

③ 置 36.5℃ 中 4~48 h,如消化缓慢可延长到 3~5 天,其间无需摇动,可换液一次(仍含有胶原酶)。

④ 轻轻摇动培养瓶,以检查消化效应,如见组织块已变软,散于瓶底,振荡后即散成细胞团和单个细胞,示消化良好,此时可轻轻倒出培养液,瓶内可能有很多巨噬细胞已附于瓶底,借此能把巨噬细胞从其他细胞中分离开,可用于单独培养或不用而弃之。

⑤ 低速离心培养液 5 min,去上清,重悬于 BSS 中,再低速离心 5 min,去上清。

⑥ 加入新培养液制备成细胞悬液,可接种培养。胰蛋白酶和胶原酶消化时间与浓度上的差异,依消化温度而异,另外,此两种酶也可协同应用,浓度为:0.1 mg/ml 胰蛋白酶-0.25 mg/ml 胶原酶。两种酶相比的差别见表 1-1 和表 1-2。

III. 说明

① 上皮组织经过胶原酶消化后,由于其对酶有耐受性,可能有一些上皮细胞团尚未被完全分散开。成小团的上皮细胞比分散的单个上皮细胞更易生长,因此不必要再做进一步消化

处理。

② 胶原酶与胰蛋白酶并用时,尚可外加透明质酸酶。透明质酸酶对细胞表面糖基有作用。胶原酶与胰蛋白酶两者结合使用,对分散大鼠和兔肝等组织非常有效。

③ 其他有消化作用的酶还很多,如链霉蛋白酶、粘蛋白酶、蜗牛酶等,可根据各种酶作用的特点和组织成分的不同分别选用。

表 1-1 胰蛋白酶和胶原酶生物活性差别的比较

项 目	胰 蛋 白 酶	胶 原 酶
消 化 特 性	适用于消化软组织	适用于消化纤维多的组织
浓 度	0.01 % ~ 0.5 %	0.1 ~ 0.3 mg/ml (200 U/ml)
消 化 时 间	0.2 ~ 2 h (小块)	1 ~ 12 h
pH	8 ~ 9	6.5 ~ 7.0
作用强度	强 烈	缓 和
细胞影响	时间过长有影响	无大影响
血清抑活	有	无
Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺	有影响	无影响

表 1-2 不同温度下胰蛋白酶和胶原酶消化各种组织小块(0.5 cm³ ~ 1 cm³)时所需时间(h)

酶种类和用量	较 硬 组 织			软 组 织		
	4℃	室 温	37℃	4℃	室 温	37℃
胰蛋白酶(0.25 %)	24 ~ 48	1 ~ 6	0.5 ~ 1	12 ~ 24	0.2 ~ 1	0.2 ~ 0.5
胶 原 酶(1 200 U/ml)	24	6	0.5	12	3	0.25
胰 蛋 白 酶 (0.25 %) + 胶原酶 (1 200 U/ml)	12 ~ 46	12 ~ 24	4 ~ 12	12 ~ 24	6 ~ 12	1 ~ 2

(3) EDTA 消化法: EDTA 是一种非酶性消化物,常用不含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的 BSS 配成 0.02% 的工作液。EDTA 的作用比胰蛋白酶缓和,很少用于单独消化新鲜组织(传代细胞可单用),如与胰蛋白酶按不同比例相混合并用,消化作用更好。EDTA 最适消化传代细胞,也多与胰蛋白酶混合使用(1:1 或 2 或 1)。用 EDTA 和胰蛋白酶混合消化法传代的程序如下:

① 吸出培养瓶内营养液,注入 EDTA(0.02 %)和胰蛋白酶(0.25 %)混合液(1:1),其量以能覆盖细胞为度,置 37℃ 培养箱或室温中作用 3 ~ 5 min。在消化过程中,要在镜下随时监视细胞状态,当见到细胞质回缩,胞体趋于变圆,细胞相互间缝隙变大时,便立即终止消化。上述变化在已连接成片的细胞最为明显,可见细胞由于胞质回缩,而相互分离,遂失去原来紧密接触的关系,出现明显可见的缝隙。如消化过度则细胞能完全从瓶壁脱落,这时需要做离心分离,以防细胞丢失。

② 吸出消化液,注入适量 Hanks 液洗一二次。注意注入时要缓慢,且朝向瓶底或瓶角部为好,不要让液体直接冲刷细胞多的部位,以避免把细胞从瓶壁上冲下来,然后轻轻晃动培养瓶,让 Hanks 液在细胞面上来回流动,以洗掉残余的消化液。