

现代过敏反应学丛书



实验过敏反应学

主 编 何韶衡



科学出版社
www.sciencep.com

现代过敏反应学丛书

实验过敏反应学

何韶衡 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书系统深入地介绍了过敏反应学的实验技术及其最新研究进展,从实验背景知识、实验材料、实验方法、注意事项等方面论述了每一个实验,力求使读者能够按照我们介绍的步骤进行实验时得到满意的结果。全书分为细胞生物学技术在过敏反应学中的应用、生物化学与分子生物学技术在过敏反应学中的应用、蛋白质组学与生物信息学在过敏反应学中的应用、抗体技术在过敏反应学中的应用、过敏反应相关的动物实验模型、临床相关的过敏反应学实验技术以及常见过敏原的收集与鉴定六个部分共15章。

本书由从事过敏反应学基础研究和临床检验领域的专家编著,可供从事过敏反应学的科研工作者、临床医学工作者参考,也可作为医学院校的授课教材使用。

图书在版编目(CIP)数据

实验过敏反应学/何韶衡主编. —北京:科学出版社,2010

(现代过敏反应学丛书)

ISBN 978-7-03-027985-9

I. ①实… II. ①何… III. ①变态反应病-诊疗 IV. ①R593.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 112487 号

责任编辑:李 晓 王 静/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年6月第一次印刷 印张:42 3/4 插页:1

印数:1—1 800 字数:1 016 000

定价:150.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《实验过敏反应学》

编辑委员会

主 编：何韶衡

责任编辑：张 姝

编 委(按姓氏拼音排序)：

陈章权	杜智华	李东栋	李 盟	李 涛
林珏龙	刘志刚	马文静	牛青霞	乔丽雅
孙 云	谈文峰	陶爱林	王 芳	魏继福
夏立新	杨海伟	杨立明	杨平常	张慧云
张 姝	郑鸿翱			

编 者(按姓氏拼音排序)：

蔡 飒：深圳大学生命科学学院
陈章权：广东医学院
迟 深：扬州大学医学院
杜智华：深圳大学生命科学学院
何韶衡：南京医科大学第一附属医院
黄 闾：汕头大学医学院
孔小丽：深圳大学生命科学学院
李东栋：海南大学理工学院
李 盟：深圳大学生命科学学院
李 涛：汕头大学医学院
李 文：广州医学院
林珏龙：汕头大学医学院
刘启才：广州医学院
刘志刚：深圳大学生命科学学院
马文静：南京医科大学第一附属医院
牛青霞：汕头大学医学院

目 录

序 前言

第一篇 细胞生物学技术在过敏反应学中的应用

第1章 过敏反应相关细胞的分离、纯化、培养、鉴定	3
第一节 细胞分离、纯化、培养、鉴定的基本原理	3
第二节 树突状细胞的分离、纯化、培养、鉴定	13
第三节 T、B淋巴细胞的分离、纯化、培养、鉴定	16
第四节 肥大细胞的分离、纯化、培养、鉴定	21
第五节 嗜碱性粒细胞的分离、纯化、培养、鉴定	27
第六节 嗜酸性粒细胞的分离、纯化、培养、鉴定	32
第七节 中性粒细胞的分离、纯化、培养、鉴定	37
第八节 单核/巨噬细胞的分离、纯化、培养、鉴定	42
第九节 上皮细胞的分离、纯化、培养、鉴定	46
第十节 内皮细胞的分离、培养、纯化、鉴定	52
第十一节 呼吸道平滑肌细胞的分离、纯化、培养、鉴定	57
第十二节 成纤维细胞的分离、纯化、培养、鉴定	63
第十三节 干细胞的培养	67
第十四节 细胞的冻存与复苏	69
第十五节 神经胶质细胞的分离、纯化、培养、鉴定	78
第十六节 血小板的分离、纯化、培养、鉴定	84
参考文献	87
第2章 过敏反应相关的细胞功能实验	94
第一节 肥大细胞激发实验	94
第二节 嗜碱性粒细胞激发实验	100
第三节 黏液分泌细胞刺激实验	102
第四节 T、B细胞激发实验	105
第五节 树突状细胞激发实验	121
第六节 内皮细胞激发实验	128
第七节 成纤维细胞激发实验	132
第八节 神经胶质细胞激发实验	134
第九节 细胞趋化性和细胞膜通透性实验	138
第十节 细胞增殖实验	144

第十一节 呼吸道平滑肌激发、收缩实验·····	148
第十二节 细胞凋亡实验·····	154
参考文献·····	160
第3章 细胞成分的标记和检测·····	165
第一节 常用组织和细胞取材及固定方法·····	165
第二节 组织切片的制备·····	177
第三节 组织化学染色·····	190
第四节 免疫组织化学染色·····	197
第五节 免疫组织化学双重或多重标记·····	203
第六节 酶-底物染色·····	209
第七节 原位杂交染色·····	220
第八节 免疫胶体金染色·····	229
第九节 激光共聚焦显微镜技术·····	234
第十节 流式细胞术·····	239
第十一节 细胞内钙离子水平测定·····	247
第十二节 鉴定细胞信号转导通路的常用技术·····	253
参考文献·····	260
 第二篇 生物化学与分子生物学技术在过敏反应学中的应用	
第4章 过敏反应相关的蛋白质纯化技术·····	267
第一节 过敏原蛋白质组分的提取与制备·····	267
第二节 蛋白质电泳技术·····	276
第三节 点杂交和免疫印迹·····	282
第四节 蛋白质的分离与纯化·····	289
第五节 蛋白质浓度测定·····	306
第六节 蛋白酶活性测定·····	312
第七节 蛋白质一级结构的测定方法·····	316
第八节 蛋白质的分子质量测定·····	323
第九节 过敏原生物学功能鉴定·····	332
第十节 表面等离子体共振技术·····	336
参考文献·····	340
第5章 过敏反应相关的分子生物学技术·····	344
第一节 常规分子生物学技术·····	344
第二节 普通 PCR 及荧光定量 PCR 技术·····	355
第三节 重组蛋白表达与纯化·····	365
第四节 细胞转染·····	373
第五节 cDNA 文库的建立·····	377
第六节 Northern blot 和 Southern blot·····	382

第七节 反义 RNA 技术	391
第八节 RNA 干扰技术	393
第九节 表位确定	404
第十节 限制性片段多态性技术、单链型多态性技术、单核苷酸多态性技术	417
第十一节 点突变技术在低过敏原性疫苗中的应用	424
第十二节 MicroRNA 技术	429
参考文献	433

第三篇 蛋白质组学与生物信息学在过敏反应学中的应用

第 6 章 蛋白质组学技术及在过敏反应学中的应用	443
第一节 过敏原蛋白质组的双向电泳分离技术	443
第二节 过敏原蛋白质的质谱分析和鉴定技术	467
第三节 过敏原蛋白质组学研究的策略与方法	488
参考文献	493
第 7 章 生物信息学在过敏原研究中的应用	497
第一节 生物信息学的主要研究内容	497
第二节 生物信息学在过敏反应学中的应用	500
参考文献	506

第四篇 抗体技术在过敏反应学中的应用

第 8 章 抗体制备	511
第一节 抗体制备的目的及基本原理	511
第二节 多克隆抗体制备	514
第三节 单克隆抗体制备	518
第四节 抗体的纯化与鉴定	525
参考文献	534
第 9 章 基因工程抗体	535
第一节 抗体工程	535
第二节 抗体的修饰和标记	541
参考文献	546

第五篇 过敏反应相关的动物实验模型

第 10 章 哮喘相关的动物实验模型	549
第一节 豚鼠支气管哮喘模型	549
第二节 小鼠支气管哮喘模型	551
第三节 大鼠支气管哮喘模型	555
第四节 狗哮喘模型	557

第五节 灵长类哮喘模型·····	558
第六节 猫哮喘模型·····	561
第七节 兔哮喘模型·····	564
第八节 绵羊哮喘模型·····	565
参考文献·····	566
第 11 章 过敏性鼻炎相关的动物实验模型 ·····	569
参考文献·····	575
第 12 章 其他动物实验模型 ·····	577
第一节 大鼠足跖肿胀模型·····	577
第二节 大白鼠皮肤毛细血管通透性模型·····	578
第三节 小白鼠腹腔炎症性细胞浸润模型·····	580
第四节 大白鼠皮肤炎症性细胞浸润模型·····	584
第五节 实验性过敏性脑脊髓炎模型·····	588
第六节 过敏性肠炎模型·····	592
参考文献·····	595
第六篇 临床相关的过敏反应学实验技术	
第 13 章 体液或培养液中特异性成分的测定 ·····	601
第一节 组胺水平测定·····	601
第二节 酶联免疫吸附测定·····	604
第三节 酶联免疫斑点法·····	613
第四节 放射免疫分析法·····	615
第五节 ImmunoCAP 系统 ·····	620
第六节 血清食物特异性 IgG 的检测 ·····	624
第七节 白三烯测定·····	626
第八节 过敏性皮炎模型·····	632
第九节 皮肤斑贴实验·····	634
参考文献·····	640
第 14 章 吸入性过敏原的收集与鉴定 ·····	644
第一节 吸入性过敏原的收集·····	644
第二节 吸入性过敏原的鉴定·····	652
参考文献·····	656
第 15 章 食入性过敏原的收集与鉴定 ·····	657
第一节 食入性过敏原的收集·····	657
第二节 食入性过敏原的鉴定·····	660
参考文献·····	661
中英文索引 ·····	663

第一篇

细胞生物学技术在过敏反应学中的应用

第1章 过敏反应相关细胞的 分离、纯化、培养、鉴定

第一节 细胞分离、纯化、培养、鉴定的基本原理

摘要 细胞培养是许多研究领域的科研工作者都要借助的研究方法，它易化了在整体水平难以研究的生物特征和功能。机体内的许多细胞参与了过敏性炎症反应并发挥了重要的作用，对过敏性疾病中所涉及的细胞进行研究，能够更好地了解过敏性疾病的发生发展过程。因此，细胞培养在该领域是一个非常重要的研究手段。

一、引言

(一) 细胞培养的基本概念

细胞培养是指从体内组织取出细胞模拟体内环境，在无菌、适当温度、酸碱度和一定营养条件下，使其生长繁殖，并维持其结构和功能的一种培养技术。细胞培养的培养物为单个细胞或细胞群。细胞离体后，失去了神经和体液的调节以及细胞间的相互影响，生活在缺乏动态平衡的相对稳定环境中，日久天长，易发生如下变化：分化现象减弱；形态功能趋于单一化或生存一定时间后衰退死亡；发生转化获得不死性，变成可无限生长的连续细胞系或恶性细胞系。因此，培养中的细胞可视为一种在特定条件下的细胞群体，它们既保持着与体内细胞相同的基本结构和功能，也有一些不同于体内细胞的性状。实际上，从细胞被置于体外培养后，这种差异就开始发生了。虽然体外细胞与机体细胞存有差异，但并未失去其研究的意义 (Bonifacino et al. 2000)。体外细胞不仅有许多性状仍与体内细胞相同（如体外培养的心肌细胞仍可搏动），只从细胞遗传学 (cyto-genetics) 的角度看，离体细胞仍带有全套的二倍体基因。细胞在培养时的表现，只不过是相应基因关闭或开启引起的现象，这并非是绝对缺陷。恰恰相反，在培养的细胞中某些特定功能的丧失，可为该基因的表达与调控提供线索。体外培养的细胞分化能力并未完全丧失，只是环境的改变，细胞分化的表现与在体内时不同。细胞是否表现分化，关键在于是否存在使细胞分化的条件。例如，小鼠红白血病细胞 (Friend 细胞)，在一定因素的作用下可以合成血红蛋白，血管内皮细胞在类似基膜物质底物上培养时能长成血管状结构，杂交瘤细胞能产生特异的单克隆抗体，这些均属于细胞分化行为。克隆 (clone) 亦称为无性繁殖系或简称无性系。对细胞来说，克隆是指由同一个祖先细胞通过有丝分裂产生的遗传性状一致的细胞群。体外培养细胞株可在培养过程中发生自发的或在外界作用下的转化，成为永久细胞系，也可直接建成永久细胞系，永久细胞系能在体外无限制地传代和生长。永久细胞系通常具有非整倍体细胞和细胞间核型不完全

相同的特征。但细胞克隆的细胞系的这一特征可以不明显。

体内组织细胞的生存期与完整机体的死亡衰老基本一致。人胚二倍体成纤维细胞培养,在不冻存和反复传代条件下,可传30~50代,相当于150~300个细胞增殖周期,能维持一年左右。如果供体为成体或衰老个体,则生存时间较短;如果培养的为其他细胞,如肝细胞或肾细胞,则生存时间更短,仅能传几代或十几代。只有当细胞发生遗传性改变,如获永生性(imortality)或恶性(malignancy)转化时,细胞的生存期才可能发生改变。正常细胞培养时,不论细胞的种类和供体的年龄如何,在细胞全生存过程中,大致都经历以下三个阶段(Davis et al. 2000)。

1. 原代培养期

原代培养(primary culture)也称为初代培养,即从体内取出组织接种培养到第一次传代阶段,一般持续1~4周。此期细胞活跃的移动,可见细胞分裂,但不旺盛。初代培养细胞与体内原组织在形态结构和功能活动上相似性大。细胞群是异质的(heterogeneous),即各细胞的遗传性状互不相同,细胞相互依存性强。如果把这种细胞群稀释分散成单细胞,在软琼脂培养基中进行培养时,细胞克隆形成率(cloning efficiency)很低,即细胞独立生存性差。克隆形成率,即细胞群被稀释分散成单个细胞进行培养时,形成细胞小群(克隆)的百分数。初代培养细胞多呈二倍体核型,由于原代培养细胞和体内细胞性状相似性大,所以其是检测药物作用很好的实验对象。

2. 传代培养期

原代培养细胞一经传代后便改称为细胞系(cell line)。培养细胞的“一代”,不表示细胞分裂一次,而是指培养细胞从接种到再次转移培养的过程。在一次传代培养(passage culture)中,细胞能倍增3~6次。全生命期中此期的持续时间最长。在培养条件较好的情况下,细胞增殖旺盛,并能维持二倍体核型,呈二倍体核型的细胞称为二倍体细胞系(diploid cell line)。为保持二倍体细胞性质,细胞应在初代培养期或传代后早期冻存。当前世界上常用细胞均在不出10代内冻存。如果不冻存,则需反复传代以维持细胞的适宜密度,以利于生存。但这样就有可能导致细胞失掉二倍体性质或发生转化。一般情况下当传代10~50次后,细胞增殖逐渐趋缓,以至完全停止,细胞进入第三期。

3. 衰退期

此期细胞仍然生存,但增殖很慢或不增殖;细胞形态轮廓增强,最后衰退凋亡。

原代培养物成功传代后,则称之为细胞系。如果细胞系的生存期有限,则称之为有限细胞系(finite cell line)。在细胞生命期阶段,少数情况下,在以上三期中的任何一期(多发生在传代末期或衰退期),由于某种因素的影响,细胞可能发生自发转化(spontaneous transformation)。转化的标志之一是细胞可能获得永生性或恶性。细胞永生性也称为不死性,即细胞获持久性增殖能力,这样的细胞群体称为无限细胞系(infinite cell line),也称为连续细胞系(continuous cell line)。在早期文献中无限细胞系也称为已建立细胞系(established cell line),现已不用。无限细胞系的形成主要发生在第二期末或第三期初,大多已发生异倍化,核型大多变成异倍体(heteroploid)。无限细胞系有的只有永生性(或不死性),但仍保留接触抑制,无异体接种致癌性;有的不仅

有永生性，异体接种也有致瘤性，成为恶性细胞。因此，无限细胞系本质上已是发生转化的细胞系。细胞转化亦可用人工方法诱导，转化后的细胞也可能具有恶性性质。细胞永生性和恶性非同一性状。

通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志物的细胞，称为细胞株 (cell strain)。细胞株的特殊性质或标志必须在整个培养期间始终存在。再由原细胞株进一步分离培养出与原株性状不同的细胞群，也可称之为亚株 (sub-strain)。

(二) 细胞培养的环境

细胞在体外培养时所需的条件与体内细胞基本相同 (Freshney et al. 2000)。

1. 无污染环境

培养环境无毒和无菌是保证细胞生存的首要条件。当细胞放置于体外培养时，与体内相比细胞丧失了对微生物和有毒物的防御能力，一旦被污染或自身代谢物质积累等，即可导致细胞死亡。因此，在培养过程中，保持细胞生存环境无污染、代谢物及时清除等，是维持细胞生存的基本条件。

2. 恒定的温度

维持培养细胞旺盛生长，必须有恒定适宜的温度。人体细胞培养的标准温度为 $(36.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，偏离这一温度范围，细胞的正常代谢会受到影响，甚至死亡。培养细胞对低温的耐受力较对高温强，温度上升不超过 39°C 时，细胞代谢与温度成正比；人体细胞在 $39 \sim 40^\circ\text{C}$ 1h，即能受到一定损伤，但仍有可能恢复；在 $40 \sim 41^\circ\text{C}$ 1h，细胞会普遍受到损伤，仅小半数有可能恢复； $41 \sim 42^\circ\text{C}$ 1h，细胞受到严重损伤，大部分细胞死亡，个别细胞仍有恢复可能；当温度在 43°C 以上 1h，细胞全部死亡。

3. 气体环境

气体是人体细胞培养生存必需条件之一，所需气体主要有氧气和二氧化碳。氧气参与三羧酸循环，产生供给细胞生长增殖的能量和合成细胞生长所需用的各种成分。开放培养时一般把细胞置于 95% 空气与 5% 二氧化碳的混合气体环境中。

二氧化碳既是细胞代谢产物，也是细胞生长繁殖所需成分，它在细胞培养中的主要作用在于维持培养基的 pH。大多数细胞的适宜 pH 为 7.2~7.4，偏离这一范围对细胞培养将产生有害的影响。但细胞耐酸性比耐碱性强一些，偏酸环境更利于细胞生长。有资料显示，原代羊水细胞培养 pH 为 6.8 时最合适。

细胞培养液 pH 大小的调节最常用的为加碳酸氢钠的方法，因为碳酸氢钠可供二氧化碳，但二氧化碳易于逸出，故最适用于封闭培养，而羟乙基哌嗪乙硫磺酸 (N' - α -hydroxyethylpiperazine- N' -ethanesulfonic acid, HEPES) 对细胞无毒性，也起缓冲作用，有防止 pH 迅速变动的特性而被用于开放细胞培养技术中，其最大优点是在开放培养或细胞观察时能维持较恒定的 pH。

4. 细胞培养基

培养基既是培养细胞中供给细胞营养和促使细胞生长增殖的基础物质，也是培养细胞生长和繁殖的生存环境。培养基的种类很多，按其物质状态分为半固体培养基和液体

培养基；按其来源分为合成培养基和天然培养基。

(1) 合成培养基：合成培养基是根据细胞所需物质的种类和数量严格配制而成的。内含碳水化合物（糖类）、氨基酸、脂类、无机盐、维生素、微量元素和细胞生长因子等。单独使用时细胞虽能生存但不能很好地生长增殖。

(2) 天然培养基：使用最普遍的天然培养基是血清，以小牛血清最为普遍。血清由于含有多种细胞生长因子、促贴附因子及许多活性物质，与合成培养基合用，能使细胞顺利生长增殖。常见血清使用量为 5%~20%。

二、细胞培养用液的配制与消毒

(一) 器材与试剂

干粉型培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、纯净水系统、电子天平、pH 计、磁力搅拌器。

(二) 具体步骤

1. 水的制备

细胞培养用水必须非常纯净，不含有离子和其他杂质。需要用新鲜双蒸水、三蒸水或纯净水。

2. PBS 的制备与消毒（也可用于其他 BSS，如 Hank's, D-Hank's 液的配制）

(1) 溶解定容：将药品（NaCl 8.0g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56g, KH_2PO_4 0.2g）倒入盛有双蒸水的烧杯中，用玻璃棒搅动，使其充分溶解，然后把溶液倒入容量瓶中准确定容至 1L，摇匀即成新配制的 PBS 溶液。

(2) 移入溶液瓶内待消毒：将 PBS 倒入溶液瓶（大的吊针瓶）内，盖上胶帽，并插上针头放入高压锅内消毒 20min。注意高压消毒后要用灭菌蒸馏水补充蒸发掉的水分。

3. EDTA 消化液配制

EDTA（0.02% 乙二胺四乙酸二钠）0.20g, NaCl 8.00g, KCl 0.20g, KH_2PO_4 0.02g, 葡萄糖 2.00g, 0.5% 酚红 4mL，加入蒸馏水定容至 1000mL。约 67.55kPa、20min 高压灭菌，使用时调节 pH 到 7.4。注意 EDTA 不能被血清中和，使用后培养瓶要彻底清洗，否则再培养时细胞容易脱壁。

4. 胰蛋白酶溶液的配制与消毒

胰蛋白酶的作用是使细胞间的蛋白质水解从而使细胞离散。不同的组织或者细胞对胰蛋白酶的作用反应不一样。胰蛋白酶分散细胞的活性还与其浓度、温度和作用时间有关，在 pH 为 8.0、温度为 37℃ 时，胰蛋白酶溶液的作用能力最强。使用胰蛋白酶时，应把握好浓度、温度和时间，以免消化过度造成细胞损伤。因为 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和血清、蛋白质可降低胰蛋白酶的活性，所以配制胰蛋白酶溶液时应选用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 BSS，如 D-Hank's 液。终止消化时，可用血清培养液或者胰蛋白酶抑制剂终止胰蛋白酶对细胞的作用。

(1) 称取胰蛋白酶：按胰蛋白酶液浓度为 0.25% 的量，用电子天平准确称取粉剂溶入小烧杯中的双蒸水（若用双蒸水需要调 pH 到 7.2 左右）或 PBS (D-hank's) 液中。搅拌混匀，置于 4℃ 过夜。

(2) 用注射滤器抽滤消毒：配好的胰蛋白酶溶液要在超净台内用注射滤器（0.22μm 微孔滤膜）抽滤除菌。然后分装成小瓶于 -20℃ 保存以备使用。

5. 青霉素、链霉素溶液的配制与消毒

(1) 所用纯净水（双蒸水）需用约 103kPa 高压灭菌 20min。

(2) 具体操作均在超净台内完成。青霉素是 80 万 U/瓶，用注射器加 4mL 灭菌双蒸水。链霉素是 100 万 U/瓶，加 5mL 灭菌双蒸水，即每毫升各为 20 万 U。

(3) 使用时溶入培养液中，使青霉素、链霉素的终浓度均为 100U/mL。

6. RPMI 1640 的制备与消毒

(1) 溶解、调 pH、定容：先将培养基粉剂加入培养液体积 2/3 的双蒸水中，并用双蒸水冲洗包装袋两三次（冲洗液一并加入培养基中），充分搅拌至粉剂全部溶解，并按照包装说明添加一定的药品。然后用注射器向培养基中加入配制好的青霉素、链霉素液各 0.5mL，使青霉素、链霉素的终浓度均为 100U/mL。然后用 1mol/L 的盐酸和氢氧化钠调 pH 到 7.2 左右。最后定容至 1L，摇匀。

(2) 安装蔡式滤器：安装时先装好支架，按规定放好滤膜，用螺丝将不锈钢滤器和支架连接好。然后卸下支架腿分别用布包好待消毒。

(3) 抽滤：配制好的培养液通常用滤器过滤除菌。通常用蔡式滤器在超净工作台内过滤。

(4) 分装：将过滤好的培养液分装入小瓶内，置于 4℃ 冰箱内待用。

(5) 使用前要向 100mL 培养液中加入 1mL 谷氨酰胺溶液（4℃ 时两周有效）。

7. 血清的灭活

细胞培养常用的是小牛血清，新买来的血清要在 56℃ 水浴中灭活 30min 后，再经过抽滤方可加入培养基中使用。

8. HEPES 溶液

HEPES 对细胞无毒性作用。它是一种氢离子缓冲剂，能较长时间控制恒定的 pH 范围。使用终浓度为 10~50mmol/L，一般培养液内含 20mmol/L HEPES 即可达到缓冲能力。1mol/L HEPES 缓冲液配制方法如下：准确称取 HEPES 238.3g，加入新鲜三蒸水定容至 1L。过滤除菌，分装后 4℃ 保存。

9. 谷氨酰胺

合成培养基中都含有大量的谷氨酰胺，其作用非常重要，细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质，谷氨酰胺缺乏主要导致细胞生长不良甚至死亡。在配制各种培养液时都应该补加一定量的谷氨酰胺。由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定，4℃ 下放置 1 周可分解 50%，故应单独配制，置于 -20℃ 冰箱中保存，用前加入培养液。加有谷氨酰胺的培养液在 4℃ 冰箱中储存 2 周以上时，应重新加入原来的谷氨酰胺。

一般培养液中谷氨酰胺的含量为 1~4mmol/L。可以配制 200mmol/L 谷氨酰胺液储存，用时加入培养液。配制方法：谷氨酰胺 2.922g 溶于三蒸水并定容至 100mL 即配

成 200mmol/L 的溶液,充分搅拌溶解后,过滤除菌,分装入小瓶内, -20℃ 保存,使用时可向 100mL 培养液中加入 1mL 谷氨酰胺溶液。

10. 肝素溶液的配制

含有肝素的培养液可以使内皮细胞纯度提高,全培养液中肝素最终浓度为 50 μ g/mL。因为现在市售的多为肝素钠,包装约为 0.56g/瓶,配制时,可将其溶于 100mL 三蒸水中,定容,过夜,然后过滤除菌,分装入小瓶内。使用时,向 100mL 培养液中加入 1mL (精确可加入 0.9mL) 即可。

11. I 型胶原酶

0.1% I 型胶原酶溶液配制和消毒灭菌同胰蛋白酶。

12. 明胶溶液

因为明胶难于过滤,所以配制 0.1% 明胶溶液必须用无菌的 PBS,制备过程中必须要注意无菌操作。首要的问题是如何无菌准确称量 0.1g (配成 100mL 溶液) 明胶,即解决无菌分装药品的问题。其次要注意即使是 0.1% 的溶液,明胶也难溶,因此要充分摇匀,过夜放置,然后无菌分装入 50mL 小瓶中, 4℃ 保存。

13. 粉末培养基的配制

细胞培养基通常须添加 10% 血清,因此粉末培养基的配制体积为 900mL, pH 为 7.2~7.4。NaHCO₃ 另外添加,若将 NaHCO₃ 粉末直接加入液体培养基中会造成 pH 的误差或局部过碱。因此粉末培养基及 NaHCO₃ 粉末应分别溶解后才混合,然后用 CO₂ 气体调整 pH,而非用强酸 (HCl) 或强碱 (NaOH),因为氯离子对细胞生长可能有影响,且储存时培养基的 pH 易发生改变。

(1) 取粉末培养基溶于 700mL milli-Q 水中,搅拌使其溶解。

(2) 称取适量的 NaHCO₃ 粉末 (数量依培养基种类而异) 溶于 200mL milli-Q 水中,搅拌使其溶解,然后通入 CO₂ 气体至饱和 (3~5min)。

(3) 将溶解且含饱和 CO₂ 的 NaHCO₃ 溶液加入溶解的液体培养基中混合。混合后溶液的 pH 应为 7.2~7.4,除非 pH 偏差太大,否则不需酸碱再调整。若太碱,可再通入 CO₂ 气体调整 pH。当培养基以真空泵通过过滤膜时, pH 会升高 0.1~0.2。

(4) 以 0.1mm 或 0.2mm 无菌过滤膜过滤灭菌,同时分装至无菌容器中,标示培养基种类、日期、瓶号等,储存于 4℃ (血清也可加入培养基中一起过滤)。

(5) 该培养基配制须做生长实验与污染测试。

(三) 讨论

(1) 配制溶液时必须用新鲜的蒸馏水。

(2) 安装蔡式滤器时通常使用孔径 0.45 μ m 和 0.22 μ m 滤膜各一张,放置位置为 0.45 μ m 的滤膜位于 0.22 μ m 的滤膜上方,并且要特别注意滤膜光面朝上。

(3) 配制 RPMI 1640 培养基时因为还要加入小牛血清,而小牛血清略偏酸性,为了保证培养液 pH 最终为 7.2,可在配制时调 pH 至 7.4。

(4) 因为现在市售 HEPES 为约 10g 包装的小瓶,所以可根据实际情况灵活配制,但是要保证培养液内 HEPES 的终浓度仍然为 20mmol/L,如称取 4.766g HEPES 溶于

20mL 三蒸水中, 过滤除菌后可完全将 20mL HEPES 加入 1L 培养液中, 或者每 100mL 培养液中加入 2mL 即可。

(5) 因为 I 型胶原酶分子颗粒比胰蛋白酶大, 不容易过滤, 因此可以用蔡式滤器过滤除菌。分装入 10mL 小瓶中, -20°C 保存。

三、细胞的原代和传代培养

(一) 细胞原代培养

1. 原理

近年来, 细胞的原代培养广泛地应用于分子生物学、遗传学、免疫学、肿瘤学、细胞工程学等领域, 发展成一种重要的生物技术, 并取得显著成就。由体内直接取出组织或细胞进行培养叫原代培养。原代培养的细胞离体时间短, 性状与体内相似, 适用于研究。一般来说, 幼稚状态的组织和细胞, 如动物的胚胎、幼仔的脏器等更容易进行原代培养。

2. 方法

(1) 取材。用颈椎脱位法使乳鼠迅速死亡。然后, 把整个动物浸入盛有 75% 乙醇的烧杯中数秒进行消毒, 取出后放在大平皿中携入超净台。用消过毒的剪刀剪开用碘酒和乙醇再次消毒后的皮肤, 取出所需要组织, 置于盛有冰冷 PBS 的无菌平皿中。

(2) 切割。用灭菌的 PBS 将取出的组织清洗 3 次, 然后用眼科手术剪将组织反复剪碎 (约成 1mm^3 左右的小块), 再用 PBS 清洗, 洗到组织块发白为止。移入无菌离心管中, 静置数分钟, 使组织块自然沉淀到管底, 弃去上清液。

(3) 消化、接种培养。吸取 0.25% 胰蛋白酶 / 0.02% EDTA 混合消化液 1mL, 加入离心管中, 与组织块混匀后, 加上管口塞子, 37°C 水浴中消化 8~10min。每隔几分钟摇动一下试管, 使组织与消化液充分接触。静止, 吸去上清液, 向离心管中加入 5~10mL 含 5% 小牛血清的 DMEM 培养基, 用吸管吹打混匀, 按所得细胞量分装入培养瓶中, 置于二氧化碳培养箱中培养。

3. 结果

细胞接种后一般几小时内就能贴壁, 并开始生长, 如接种的细胞密度适宜, 5d 到一周即可形成单层。

(二) 细胞传代培养 (消化法)

1. 原理

体外培养的原代细胞或细胞株要在体外持续地培养就必须传代, 以便获得稳定的细胞株或得到大量的同种细胞, 并维持细胞种的延续。培养的细胞形成单层汇合以后, 由于密度过大、生存空间不足而引起营养枯竭。将培养的细胞分散, 从容器中取出, 以 1:2 或 1:3 以上的比率转移到另外的容器中进行培养, 即为传代培养。

细胞“一代”指从细胞接种到分离再培养的一段期间, 它与细胞世代或倍增不同。在“一代”中, 细胞倍增 3~6 次。细胞传一代后, 一般要经过以下 3 个阶段: 潜伏期、