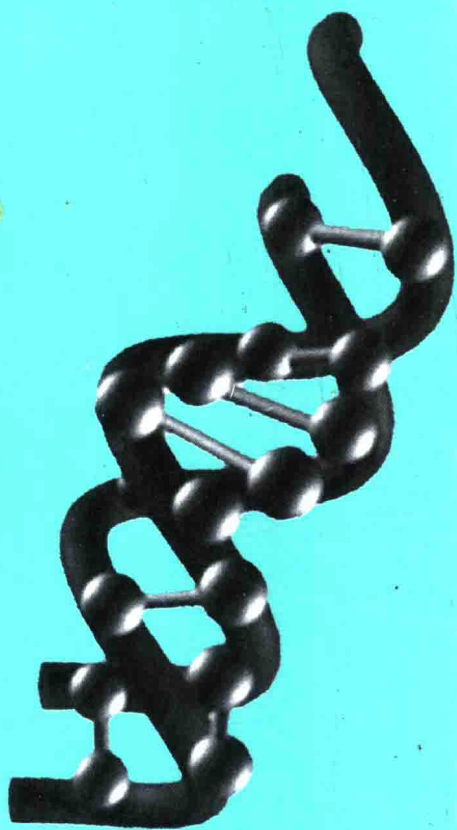


现代基础医学常用实验技术

主编 赵洪礼
王继群
孙 巍
董 萍



科学出版社

现代基础医学常用实验技术

主编 赵洪礼 王继群 孙巍 董萍

江苏工业学院图书馆
藏书章

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书以分子生物学的基础理论为基础,适应目前国内基础医学实验技术实际需要,结合作者多年从事医学科学实验工作经验,详细阐明和论述了现代基础医学常用的新技术和技巧,具有很强的共用性和实用性。主要内容包括:免疫学、生物化学、分子生物学、医学病毒学、组织培养、动物实验等常用的实验技术和方法。对于医学实验技术操作具有指导意义。

本书可作为医学高等院校的大学生、研究生进一步学习的教材,也可为基础医学工作者和临床医生掌握医学新技术和方法提供参考和借鉴。

现代基础医学常用实验技术

赵洪礼 王继群 孙巍 董萍 编著

责任编辑 孙桂荣 侯沈生

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

丹东印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年1月第1版 开本:787×1092 1/16

2002年1月第1次印刷 印张:14 1/8

印数:1-3 000 字数:330千字

ISBN 7-03-010061-1/R·825

定价:28.00元

序

现代基础医学实验技术的飞速发展,对医学科技工作者提出了更新更高的要求。一个优秀的基础医学工作者或临床医生不仅应当对医学各学科领域的现代进展有所了解,而且应当熟悉和掌握医学广泛领域内的研究方法和技巧。唯如此,方可适应现代医学高度综合发展之需求。

目前基础医学和临床医学的许多学科已经建立了以分子生物学为基础的实验和研究技术实验室。为适应这种要求,《现代基础医学常用实验技术》一书详细介绍了现代免疫学、分子生物学、生物化学、医学病毒学、组织培养和医学实验动物学的常用实验技术方法,使读者能够很方便地获得基础医学实验中常用的技术方法。

本书主编沈阳军区军事医学研究所研究员赵洪礼博士及各位编委均系工作在科研第一线具有一定理论水平和实践经验的科技工作者,他们中有博士后、博士和硕士。本书从实用出发,结合自己的经验和技巧,详细地介绍了基础医学常用实验技术,具有很强的实用性和可操作性。本书对现代基础医学实验技巧的应用、医学各基础学科的发展以及基础医学实验技术的不断充实和提高无疑将起到积极的作用。

姜 绍 淳

2001 年 6 月于第四军医大学,西安

前 言

近20年来,医学研究取得了巨大进展,新技术,新方法不断涌现,特别是单克隆抗体技术和分子生物学技术的兴起及应用,已经渗透到医学的各个领域。熟悉和掌握这些新技术,新方法,是适应现代医学高度综合发展的需要。在多年的科研工作中,我们深切地感到,为开展一项课题,常常需要查阅大量参考文献,查找各种技术方法,工作起来非常不方便,如有一部集这些常用实验技术为一体的参考书,将给工作带来极大的方便。出于这一目的,我们依据多年的工作经验和体会,参考大量文献,编写了这本普及与提高相结合、重点放在实用性上的参考书。

本书共有6篇22章组成,结合我们的实践经验和我国的实际情况,重点选择在现代基础医学中具有渗透性、共用性和实用性的免疫学、生物化学、分子生物学、组织培养、动物实验及病毒学内容。考虑到各学科均有理论性专著,所以在编写过程中侧重选择目前较常用的,特别是一般科研单位也能开展的技术方法,介绍其主要原理、材料准备、实验方法和注意事项等内容,使其更接近于实际工作,以使读者更方便用以指导实验操作。由于现代医学技术发展很快,文献浩瀚,本书不可能面面俱到,仅就当前成熟的方法和我们的工作经验,介绍了近年来工作中常有的技术方法。本书特别适合于医学院校的大学生、研究生和青年科技工作者。

特别高兴的是第四军医大学、著名的微生物学和免疫学家姜绍淳教授为本书作序,在此我们表示深深的谢忱!

由于编者的理论水平和实践经验均有限,本书定有疏漏和不当之处,诚请专家和广大读者批评指正。

赵 洪 礼

2001年6月于沈阳军区军事医学研究所,沈阳

目 录

第一篇 组织培养实验技术

第一章 组织培养常用设备、器材和试剂及准备	1
第一节 常用仪器设备	1
第二节 常用器材及准备	2
第三节 常用培养液准备	3
第二章 基本培养技术	9
第一节 组织培养的基本理论知识	9
第二节 组织培养的基本技术方法	12
第三节 人和动物组织的原代培养	16
第四节 组织培养中污染的判定和排除	21

第二篇 免疫学常用实验技术

第一章 体液免疫实验技术	25
第一节 免疫球蛋白的分离和纯化	25
第二节 免疫酶技术	29
第三节 免疫荧光技术	34
第四节 放射免疫测定方法	36
第五节 血凝试验	38
第六节 补体结合实验	41
第七节 免疫沉淀实验	43
第二章 细胞免疫技术	45
第一节 免疫反应细胞的制备	45
第二节 细胞免疫技术	49
第三节 部分淋巴因子检测技术	50
第三章 杂交瘤技术	55
第一节 制备杂交瘤的准备工作	55
第二节 免疫与细胞融合技术	57
第三节 单克隆抗体的筛选和鉴定	59
第四节 单克隆抗体的制备和纯化	61

第三篇 生物化学常用实验技术

第一章 电泳技术	63
第一节 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	63
第二节 琼脂糖凝胶电泳技术	69
第三节 等电聚焦技术	74
第四节 Phast 系统	83

第二章 层析技术	85
第一节 凝胶过滤层析技术	85
第二节 离子交换层析技术	91
第三节 亲和层析技术	95
第三章 蛋白质定量技术	99

第四篇 分子生物学常用技术

第一章 质粒	104
第一节 质粒 DNA 的提取	104
第二节 外源 DNA 片段与质粒载体的重组	110
第三节 重组质粒的转化	115
第四节 重组质粒的筛选及鉴定	119
第二章 重组噬菌体	122
第一节 λ 噬菌体的培养及噬菌体 DNA 的纯化	122
第二节 外源 DNA 与噬菌体载体重组	127
第三节 λ 噬菌体 DNA 的体外包装	131
第四节 重组 λ 噬菌体 DNA 克隆的筛选和分析	134
第五节 单链丝状噬菌体 M13 的繁殖及其 DNA 的制备	139
第三章 RNA 的提取方法	144
第一节 RNA 的提取	144
第二节 mRNA 的分离与纯化实验	148
第四章 cDNA 文库的构建	150
第五章 聚合酶链反应技术	155
第六章 分子杂交实验技术	162
第一节 核酸探针的制备	162
第二节 分子杂交技术	166

第五篇 病毒学常用实验技术

第一章 病毒的分离与鉴定	182
第一节 病毒的分离技术	182
第二节 病毒鉴定技术	189
第三节 病毒的纯化技术	191
第二章 病毒的血清学实验	195
第三章 病毒空斑实验	204

第六篇 实验动物学常用技术

第一章 动物的抓取实验方法	207
第二章 实验动物给药途径和方法	209
第三章 实验动物的麻醉	210
第四章 实验动物采血方法	211
第五章 实验动物的处死方法	214

第一篇 组织培养实验技术

从机体内取出组织或细胞,模拟体内的生理条件,在无菌、适当温度和一定营养条件下进行培养,使之生存和生长,称为组织培养(tissue culture)。广义的组织培养技术包括器官培养、小组织块培养和单层细胞培养。目前所指的组织培养多是指单层细胞培养。

组织培养是 Harrison 和 Carrel 分别于 1907 和 1910 年在参考前人的基础上建立起来的。此后愈来愈多的生物学家及临床医生应用了这项技术并使其日趋发展和完善。如今,组织培养技术已成为基础医学和临床医学常用的研究方法之一,也是医学实验工作者必须掌握的技术之一。

第一章 组织培养常用设备、器材和试剂及准备

第一节 常用仪器设备

从事组织培养工作所需设备主要有以下几类:

1. 无菌操作室 为专用于进行各种无菌操作的空间,包括操作间、缓冲间和更衣间。无菌室的特点是空间大、与外界隔离,便于进行大规模的培养工作。缺点是占据空间大,清扫和消毒困难,而工作时要着消毒衣帽等,因而比较麻烦,工作效率较低。

2. 超净工作台 是目前已普及应用于各种无菌操作的装置,其基本原理是利用鼓风机驱动空气通过高效滤器,净化后的空气徐徐通过工作台面,在工作区形成无菌环境。按操作方式分为单人单面、双人单面、和单人双面,可根据需要配置。

3. CO₂培养箱 CO₂培养箱在提供恒温恒湿环境的同时,还可维持箱内气体中的 CO₂ 浓度,从而维持培养液中 pH 值的稳定。CO₂培养箱应每两周用紫外灯照射或用酒精擦拭消毒一次。水槽内需充以无菌蒸馏水并每周更换一次,以防长菌。

4. CO₂钢瓶 用于贮存 CO₂。至少要准备 2 个,一个为使用瓶,一个作备用瓶。此外,组织培养对 CO₂要求较高,要选用高纯度 CO₂,如果纯度不高,尚需过滤后使用。

5. 电热干燥箱 用于烘干和干热消毒玻璃等耐热器皿。组织培养工作通常需要洗刷消毒的器皿数量较大,温度要求较高,因此应选用较大规格的干燥箱。

6. 蒸汽高压锅 用于不适于干烤灭菌的器材,及部分耐高压的液体试剂。

7. 抽滤装置 大多培养液只能用过滤的方法进行除菌,一般实验室都采用微孔滤膜过滤法,由抽气泵、抽滤瓶、和 0.22μm 的微孔滤膜组成。

8. 显微镜 应配备倒置显微镜一台以观察细胞生长情况,普通显微镜一台做常规观察使用。有条件的实验室可以配备相差显微镜、荧光显微镜及电镜以做深入的研究。

9. 蒸馏器 组织培养对水的质量要求极高,一般溶液的配制及玻璃容器的冲洗都要

用三蒸水或去离子水。因此,除应配有普通金属蒸馏器外,还应有玻璃蒸馏器或离子交换纯水器以制备三蒸水或纯水。

10. 冰箱 组织培养常用试剂较多,各种试剂保存条件不尽相同,普通冰箱(4℃)和冰柜(-20℃)必不可少。

11. 液氮罐 用于冷冻存贮细胞。液氮罐要专人管理,定期补充液氮。

12. 离心机 制备细胞悬液、洗涤细胞及调节细胞浓度时需要对细胞进行离心,离心速度一般要求在1000rpm左右,因此应配备低速离心机一台。

13. 天平 组织培养工作需要配制的试剂特别多,对天平的要求也较高,因此普通天平和电子天平都是必需设备。电子天平具有敏感度高、使用方便的优点;国产电子天平价格也相当便宜,正逐渐取代传统的分析天平。

14. 酸度计 用酸度计调pH值较为准确快速,可避免试纸法引起的视觉误差。

15. 其他 可根据需要配备电磁搅拌器等一些小型仪器。

第二节 常用器材及准备

一、器材的选择

1. 玻璃器材

(1) 培养瓶和培养皿 要严格选择,应由无色、透明、无气泡、耐碱、耐酸、耐高温的中性硬质玻璃制成的各规格制品。

(2) 各种规格的生理盐水瓶(500ml,250ml,100ml),吸管(10ml,5ml),离心管(50ml,10ml,5ml)

(3) 其他常用器材如烧杯、试管、漏斗和注射器等。

2. 橡胶制品

(1) 橡皮塞 根据培养瓶的规格选用,要求橡胶质量近中性、白色无毒。

(2) 橡皮管 要求质软、弹力强、耐高压、对细胞无毒。

3. 塑料制品 有多孔培养板、培养瓶、培养皿、细胞冻存管等。

4. 其他用品 各种规格的加样器及加样器头,套在吸管上方吸取液体用的胶帽(吸头),用于小件用品包装、消毒用的铝饭盒等,可根据需要选用。

二、清洗与消毒

在组织培养中,离体细胞对任何有害物质都十分敏感,有害物质包括解体的微生物、细胞残余物及其它化学物质,因此对培养器皿需要严格的清洗。

(一) 清洗

1. 玻璃制品

(1) 新玻璃器材的处理 用自来水洗去表面灰尘晾干后,在5%盐酸溶液中浸泡过夜,以除去玻璃表面的游离碱。用自来水冲洗干净晾干后再按下述方法进行泡酸和冲洗。

(2) 使用后玻璃器材的处理

浸泡 用后的玻璃器皿要立即浸入清水里,要求水能完全进入瓶皿中,不能留有气泡;

刷洗 用软毛刷沾优质洗涤剂(高级洗衣粉或洗洁精)洗去器皿表面的杂质。洗后用自来水充分冲洗晾干;

浸酸 将洗净晾干的玻璃器材分类装入耐酸的塑料网(包)内,浸入硫酸-重铬酸钾清洁液中6小时以上,一般浸泡过夜。硫酸-重铬酸钾清洁液的配法如下:

重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)	63g
浓硫酸	1000ml
蒸馏水	200ml

将重铬酸钾磨碎,置一大三角烧瓶内加水后加热助溶,待完全溶解并冷却后倒入耐酸容器内(也可借加酸时产热使其溶解)。然后缓慢加入浓硫酸(工业用即可),并不时摇动。切不可将重铬酸钾水溶液倒入浓硫酸中,以防爆炸。清洁液一般呈棕红色,遇有机溶剂和水分增多时变成绿色,表明失效,应重新配制。

冲洗 从酸缸中捞出所泡器皿,尽量控干其中的酸液,先用自来水冲洗10~15次,再用一蒸水漂洗6次,最后用双蒸水或去离子水漂洗3次,晾干备用。

2. 橡皮塞和橡皮管

新购置的橡皮塞(管)带有滑石粉,应先用自来水冲洗干净后,再按常规处理。常规清洗方法:每次用后的胶塞放入水中浸泡,以便进行集中处理:先在0.5mol/L NaOH溶液中煮沸15min,自来水冲洗;然后在1mol/L盐酸溶液中煮沸15min,自来水冲洗;最后用蒸馏水冲洗3次以上,煮沸10分钟或高压灭菌。

(二) 包装

清洗干净晾干后的器皿要进行恰当的包装以便进一步进行消毒处理。包装的材料常用带皱纹的包装纸、硫酸纸、棉布、铝饭盒和消毒筒等。按包装的方式分为以下两种:

局部包装 较大的瓶皿、滤器等只把瓶口部分紧密包扎起来即可。一般用硫酸纸包裹后,再罩以牛皮纸或棉布,用线绳扎紧。

全包装 较小的瓶皿、滤器、注射器、试管、金属器械、胶塞等需采用全包装法,可装入饭盒中一起消毒。

(三) 消毒

干热消毒 主要用于玻璃器皿、陶瓷制品的消毒。一般加热至160℃~180℃保持90min~120min,可以杀灭包括细菌芽孢在内的所有微生物。

湿热消毒 一般采用加压蒸汽灭菌法。在103.4kPa的压力下(121.3℃)维持15min~20min可杀灭所用的细菌芽孢和繁殖体,用于耐高温、耐湿的物品。对部分高温易分解的试剂如尿素等试剂可采用55.2kPa(112℃)维持20min,也可达到消毒的目的。

滤过除菌 大多数培养用液如人工合成培养基、酶溶液等在高温下易变性分解,必须采用过滤除菌法。目前最常用的是薄膜滤器,其滤膜由醋酸纤维素制成,孔径为0.22μm。其它还有以石棉板为滤板的蔡氏滤器、以玻璃细砂为滤板的玻璃滤器(G_5 、 G_6 用于除菌)等。

第三节 常用培养液及准备

一、水

水是构成细胞的主要化学成分和生存环境,体外培养细胞对水的质量要求较高。水的纯度不够,即使是一些含量极微的元素,有时也会对细胞产生不利影响,甚至引起细胞中毒死亡。因此,组织培养用水必须是三蒸水或去离子水(纯水),要求去离子水的电阻

要达到 18.2 MΩ 以上。

二、平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS)

BSS 主要由无机盐和葡萄糖组成,具有维持培养液的渗透压和酸碱度平衡的作用,同时供给细胞维持生存必需的能量和无机盐。主要用来为离体细胞提供临时、短期的生存环境,常作为细胞培养的基础成份,配制消化液。

表 1-1-1 是几种常用 BSS 的成份。其中 Hank's 液和 Earle 液是配制各种培养基的基础溶液,主要区别是缓冲系统不同。配制的要点是为防止 Ca^{2+} 沉淀,需将 CaCl_2 单配并将 BSS 配成浓缩液,使其在稀释前不让 Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 接触,避免产生 CaCO_3 的方法是将 Na_2CO_3 单独配制,用时现加。

表 1-1-1 常用 BSS 的主要成分 (g/L)

	Hank	Earle	PBS	Ringer	Tyrode	Dulbecco	D - Hank
KCl	0.40	0.40	0.20	0.42	0.20	0.20	0.40
NaCl	8.00	6.80	8.00	9.00	8.00	8.00	8.00
CaCl_2	0.14	0.20		0.25	0.20	0.10	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$					0.10	0.10	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	0.20					
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.06		1.56				
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.14			0.05	1.42		
KH_2PO_4	0.06		0.20			0.20	0.06
NaHCO_3	0.35	2.20			1.00		0.35
葡萄糖	1.00	1.00			1.00		
酚红	0.02	0.02				0.02	0.02

下面以 Hank 液为例说明 BSS 的配制方法:

实验 1 Hank 液的配制

1. 材料和试剂 见表 1-1-1

2. 方法

- 2.1 按成份所示准确称量各试剂;
- 2.2 将 CaCl_2 溶解在 100ml 水中 (a 液);
- 2.3 其它成份依次溶解在 750ml 水中待前一种药品完全溶解后,再溶解下一种药品 (b 液);
- 2.4 用数滴 5.6% 的 NaHCO_3 溶液溶解酚红 (c 液);
- 2.5 将 a 缓慢倒入 b 中并不时搅动防止出现沉淀 (d 液);
- 2.6 将 c 加入 d 中 (e 液);

2.7 将e移入容量瓶中,补足水分混匀;

2.8 分装瓶中,55.2kPa 15min 高压蒸汽灭菌,4℃冰箱内保存。

也可按上述方法配成 10 倍浓度的贮存液,内加少许氯仿(2~3ml/L)防腐。用时按比例稀释后高压灭菌。

三、培养基

分天然培养基和人工合成培养基

(一) 天然培养基

包括动物体液和组织提取液,如鸡胚浸出液、动物血清、水解乳蛋白、胶原等。是应用最早、效果较好的培养基。目前除个别(如胶原)仍有特殊使用价值外,大多已被合成培养基取代。其中鼠尾胶原是细胞生长的良好基质,有利于组织和细胞的固定附着、改善生长表面的特性从而适于细胞生长,在某些组织培养中非常有用,下面简要介绍其制备方法。

实验2 鼠尾胶原的制备

1. 材料和试剂 大白鼠数只,止血钳,骨钳,镊子,剪刀,平皿,75%酒精,1%冰醋酸,吸管,培养瓶,广口瓶,离心管,普通离心机,超净工作台,37℃温箱。

2. 方法

2.1 处死大白鼠,从根部切断鼠尾;

2.2 将鼠尾投入75%酒精中浸泡30min以上;

2.3 用剪刀剪开并剥除鼠尾皮肤,用止血钳或骨钳夹断鼠尾,抽出尾腱,置平皿中;

2.4 剪碎尾腱,称重,每克尾腱加1%冰醋酸100ml,密封于广口瓶中,置4℃冰箱中;

2.5 三天后取出以4000rpm离心30min取上清,分装,-20℃冻存。

2.6 使用方法:用吸管将胶原均匀涂布于无菌的培养瓶底内表面,胶原层不宜太厚,以不留液滴为准。将瓶口塞以无菌棉球,置37℃温箱中,干燥后用Hank's液洗涤数次即可使用。

(二) 合成培养基

合成培养基是根据天然培养基的成份,用化学物质模拟合成的,是一种较理想的培养基。

合成培养基有多种,如Eagle's氏液、RPMI1640、199等。不同的培养基各有其特点,但通常都适用于培养各种细胞,其主要成份为氨基酸、碳水化合物、维生素、无机盐及其它成分。

氨基酸是组成蛋白质的基本单位,所有组织培养液均需要12种氨基酸即精氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、谷氨酸。eagle's氏液只含有这12种氨基酸,RPMI1640、199、水解乳蛋白还含有其它氨基酸。

维生素是维持细胞生长和生物活性的物质,可作为酶的辅基或辅酶,对细胞代谢有重要影响。

无机盐是细胞的重要组成成分且为细胞代谢不可缺少。所有用于组织培养的培养基均以无机电解质为生理溶液,对于维持渗透压、激活酶活性、缓冲酸碱度等有重要作用。

下面是常用几种市售培养基的特点和用途:

1. Eagle MEM 培养基 含 12 种必需氨基酸、谷氨酰胺和 8 种维生素,成份简单。广泛用于各种已建立细胞系的培养,同时宜于添加某些成份,也特别适用于特殊细胞的研究。

2. RPMI - 1640 和 Eagle MEM 一样,是一种成份简单,用途极广的常用培养基。主要用于培养淋巴细胞,也可用于培养肿瘤细胞及一些正常细胞。

3. McCoy5A 一种特殊用途培养基,主要用于培养肉瘤细胞,也适用于原代培养、组织活检细胞和淋巴细胞,尤其适用于较难培养细胞的培养。

4. Ham F12 特殊用途培养基。含有一些微量元素无机离子,如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等,可在血清含量很少(2~10%)的情况下培养细胞,特别适用于单细胞培养,常用作克隆化培养基。

另外还有 Dulbecco - Vogt 培养基(Eagle 培养基的改良),Way Mouth 培养基等。

5. 干粉型培养基 现在大量使用,有性质稳定、经济、使用方便等优点。参照说明书配制即可,配完后过滤除菌。有的成份不完全要求自行加入如谷氨酰胺和 NaHCO_3 等。

干粉型培养基的一般配制过程:(1) 制备三蒸水;(2) 将水温加至 15°C ~ 30°C 加入干粉搅拌使其溶解;(3) 加 NaHCO_3 ;(4) 加水至最终需要量;(5) 必要时用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调节 pH;(6) 用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,分装, 4°C 或 -20°C 保存。

(三) 培养基的添加成份

血清 合成培养基中不含蛋白质成份,使用时须加一定量的动物血清。血清的作用有保护细胞、促进细胞贴壁和促进细胞生长等作用。血清的选择原则有:(1) 同种血清优于异种血清,人、小牛血清优于马血清,马血清优于兔、鸡和羊血清;(2) 动物的年龄以胎牛血清最佳,其次为小牛血清。血清使用前需加热灭活抑制物(如补体等),一般经 56°C 30min。

抗生素 为防止污染,培养基中还需加入一定量的抗生素(多用青霉素和链霉素)。

根据血清含量的多少,培养液分为生长营养液和维持营养液。生长液含 10% 动物血清和抗生素,维持液含 2~5% 的动物血清和抗生素。

四、常用试剂的配制

1. 5g/L 酚红溶液

酚红 0.5g 0.1mol/L NaOH 12ml H_2O 100ml 在干燥研钵中将酚红磨匀,边磨边加入 NaOH 溶液使其完全溶解,加水后充分混匀,分装, 103.43KPa 15min 灭菌,室温或 4°C 保存。

2. 2g/L 中性红

中性红 0.2g Hank's 液 100ml 将中性红在研钵中研磨,加少量 Hank 液,完全溶解后加 Hank 液至 100ml,分装, 68.95kPa 15min 灭菌, 4°C 保存。

3. 抗生素

(1) 青、链霉素(双抗)

青霉素(200,000u) 5 瓶

链霉素(100,000u) 1 瓶

无菌去离子水 400ml

将青霉素、链霉素溶于无菌去离子水中,分装 2ml/瓶, -20°C 保存,用时每 99ml 培养基中

加入 1ml 双抗(含 250u 青霉素和 250 μ g 链霉素)。

(2) 二性霉素 B

二性霉素 B (50mg) 1 瓶

无菌 Hank 液(pH7.4) 50ml

以无菌操作将二性霉素 B 溶于 Hank 液中,分装(2ml/瓶) - 20℃ 保存,用时每 100ml 培养基中加入 0.2ml 二性霉素 B 溶液。

(3) 卡那霉素

卡那霉素(1,000,000 μ g) 1 瓶

无菌去离子水 40ml

以无菌操作将卡那霉素溶于无菌去离子水中,2ml/瓶分装, - 20℃ 保存。用时每 99ml 培养基中加 1ml 卡那霉素溶液。

4. 0.2g/L EDTA 溶液

EDTA	0.20g	NaCl	8.00g
KCl	0.20g	Na ₂ HPO ₄	1.15g
KH ₂ PO ₄	0.20g	葡萄糖	0.20g
H ₂ O	1000ml		

称取各成分加入水中,加热完全溶解后,分装,68.95 kPa15min 灭菌,4℃ 保存。

5. 10g/L 胰蛋白酶

胰蛋白酶 1g

Hank 液 100ml

胰蛋白酶充分溶解后过滤除菌,分装 5ml/瓶, - 20℃ 保存。用时加 Hank's 液稀释所需浓度,一般应用浓度为 0.25%,并用 7.5% NaHCO₃调 pH 值至 8.0。

6. 生理盐水

表 1-1-2 不同来源生理盐水配方

组织来源	NaCl	H ₂ O
哺乳类	9.0g	1000ml
鸟类	7.5g	1000ml
青蛙	6.4g	1000ml
蝶螈	8.0g	1000ml

7. 林格生理盐水

NaCl 0.9g(冷血动物用 0.6g)

KCl 0.042g

CaCl₂ 0.025g

H₂O 100ml

各成分溶解后 103.43kPa 15min 灭菌备用。

8. 生长液

基础培养液 90%,小牛血清 10%,青霉素 100u/ml,链霉素 100 μ g/ml。

9. 维持液

基础培养液	95 ~ 98%
小牛血清	2 ~ 5%
青霉素	100u/ml
链霉素	100 μ g/ml

10. 冻存液

基础培养液	70%
二甲基亚砷(DMSC)或甘油	10%
小牛血清	20%

五、常用培养用液的保存条件(见表 1-1-3)

表 1-1-3 常用培养用液的保存条件及期限名

名称	温度(℃)	保存期限	名称	温度(℃)	保存期限
灭活及未灭活血清	-20	1 年	浓维生素	-20	1 年
未灭活血清	4	数周	L-谷酰胺	-20	1 年
灭活血清	4	数周	抗生素	-20	1 年
液体培养基无 L-谷酰胺	4	1 年	丙酮酸钠	4	6 个月
液体培养基有 L-谷酰胺	4	4 周	NaHCO ₃	15	1 年
液体培养基有血清	4	4 周	HEPES 缓冲液	15	1 年
液体培养基有水解乳蛋白	4	6 个月	胰蛋白酶	15	1 年
粉状简单培养基的母液	4	1 年	平衡盐水(BSS)	15	1 年
浓氨基酸	4	1 年	染料及指示剂	15	1 年

(宋秀红)

第二章 基本培养技术

现有的组织培养方法较多,但各种不同的培养方法大多是从一些最基本的培养技术中衍生出来的。本章介绍一些基本培养技术,相信读者掌握了这些技术方法后就可以举一反三,进而培养其它一些组织或细胞。

第一节 组织培养的基本理论知识

一、培养细胞的分型

(一) 培养细胞根据其来源、染色体特性及传代次数,主要分为以下3种类型:

1. 原代和次代培养细胞 采用机械和胰蛋白酶等方法处理离体的新鲜组织器官制成分散的单个细胞悬液,加入营养液后,分装于培养瓶(管)中培养。活细胞将贴壁并开始生长繁殖,当与邻近细胞接触时,生长繁殖即停止(接触性抑制),数天后形成单层细胞,称原代细胞。原代细胞培养物用胰蛋白酶或 EDTA 等经消化后,再洗下分装至含新鲜培养液的培养瓶(管)中继续培养,即为次代培养细胞。

2. 二倍体细胞 培养细胞的染色体数和核型与原供体相同,经过多次传代仍能保持二倍体特性($2n$)称为二倍体细胞株。二倍体细胞株广泛应用于病毒分离和疫苗生产。但这种细胞有一定的寿命(一般只能传 40~50 代),可在早期传代时把细胞分装到多支细胞冻存管内,液氮中冻存。取出复苏后可传 10 代左右而不明显改变对病毒的敏感性。这类细胞多数为人成纤维细胞,如人胚肺细胞株 WI-38 等。

3. 细胞系(株) 初代培养物开始第一次传代后即称为细胞系(cell line)。细胞系分有限细胞系和无限细胞系。大多数二倍体细胞为有限细胞系,这种细胞在体外的生存期是有限的。无限细胞系在体外能无限期地传代,一般来源于肿瘤细胞或传代过程中发生变异的细胞系,又称传代细胞系。无限细胞系的染色体和增殖特性类似于恶性肿瘤细胞,具有异倍体核型。用单细胞分离培养法,从原代培养或细胞系获得的培养物称为细胞株(cell strain)或克隆细胞株。常用细胞系(株)见表 1.2.1。

(二) 离体培养细胞大多生长在瓶皿中,根据它们能否贴附在支持物上生长的特性,分为贴附型和悬浮型两类

1. 贴附型 培养时能贴附在支持物上生长的细胞,大多数培养细胞属于此型。当细胞贴附在支持物上后,细胞分化现象常变得不显著,易失去其在体内时原有的特征,在形态上常表现单一化现象,并反映其胚层的起源,类似所谓“返祖”现象,因此在判定细胞形态时很难按体内细胞标准确定,仅大致分成以下几类:

(1) 纤维细胞型:细胞形态与体内成纤维细胞的形态相似,胞体呈梭形或不规则三角形,中央有卵圆形核,胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起。细胞在生长时呈放射状、火焰状或漩涡状走行。除真正的成纤维细胞外,凡由中胚层间充质起源的组织,如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮等也常呈本型形态。

(2) 上皮细胞型:呈扁平不规则多角形,内有圆形核,细胞彼此紧密相连成单层膜,

生长时呈膜状移动;处于上皮膜边缘的细胞总与膜相连,很少脱离细胞群单独活动。起源于内、外胚层的细胞如皮肤表皮及其衍生物,消化管上皮,肝、胰和肺泡上皮等都呈本型形态。

表 1-2-1 常用细胞系(株)及其来源

类别	名称	来源	类别	名称	来源
传代细胞系	Hela	人子宫癌传	传代细胞系	L929	小白鼠皮下组织
	HEP-2	人喉癌		NCTC1469	小白鼠肝组织
	Detroit-98	人胸骨髓		HaK	幼龄地鼠肾
	Detroit-6	人肺癌患者胸骨髓		BHK-21	幼龄地鼠肾
	KB	人口腔类上皮癌		LLC-RK1	兔肾
	L-132	人胎儿肺		RK-1	兔肾
	J-111	人慢性粒细胞性白血病患者		RK13	兔肾
	NCTC1783	人皮肤上皮细胞		肠407	人胎儿肠
	CV-1	非洲绿猴肾		MDK	狗肾
	FL	人羊膜		PK-15	猪肾
	AV ₃	人羊膜		MDBK	牛肾
	BSC-1	非洲绿猴肾		张-结膜	人眼球结膜
	Vero	非洲绿猴肾		张-肝	人肝
	NCTC3562	恒河猴肾	二倍体细胞株	HEL	人胎儿肺
	313	小白鼠胚胎组织		WI-38	人胎儿肺
	L	小白鼠皮下组织		HEL299	人胎儿肺

(3) 游走细胞型:细胞在支持物上散在生长,一般不连接成片,胞质常伸出伪足或突起,呈活跃的游走或变形运动,速度快且方向不规则。此型细胞不很稳定,有时亦难和其它型细胞相区别。在一定条件下,如培养基化学性质变动等,它们也可能呈成纤维细胞形态。

(4) 多形细胞型:除上述三型细胞外,还有一些组织和细胞,如神经组织的细胞等,难以确定它们的规律和稳定的形态,可统归入多形细胞型。

2. 悬浮型 培养时细胞不贴附于支持物上,而呈悬浮状态生长,如某些癌细胞和血液白细胞。悬浮生长的细胞胞体常为圆形,观察时不如贴附型方便,优点是细胞生存空间大,容许长时间生长,易于大量繁殖细胞,便于做细胞代谢研究。

二、培养细胞的生长和增殖过程

体内细胞在动态平衡的生理环境中生长,而组织培养细胞的生存空间和营养都是有限的,也失去了体内神经体液因素的调控。当细胞增殖达到一定密度后,需要分离出一部分细胞和更新营养液,这一过程称为传代。每次传代都会影响细胞的生长进程。细胞在体外的生存期一般也不是无限的,而是呈现出与体内细胞不同的生存过程。

1. 组织培养细胞的生命期 大多数二倍体细胞在培养中维持有限生存期,最多生存一年