

实用免疫学新技术

SHIYONG MIANYIXUE XIN JISHU

实用免疫学新技术

主 编 钱玉昆 副主编 殷金珠

R392-33
QYK
127476

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社

DE96/10 127476
0210/10

实用免疫学新技术

主 编 钱玉昆
副主编 殷金珠



R392-33
QYK

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社出版



A1C01090820

(京)新登字 147 号

图书在版编目 (CIP) 数据

实用免疫学新技术/钱玉昆主编·—北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994.

ISBN 7-81034-392-9

I. 实… II. 钱… III. 免疫学-技术 IV. R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (94) 第 08701 号

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

泰山新华印刷厂莱芜厂印刷 新华书店经销

※ ※ ※

787×1092 毫米 16 开本 印张: 8.25 字数: 196 千字

1994 年 9 月第 1 版 1994 年 9 月北京第 1 次印刷 印数: 1—4000 册

定价: 8.60 元

DE 18/21
掌握免疫学的新技术
为医疗科研教学服务

一九九〇年五月 吴阶平



序

十四年前我国科技和教育事业在经历“文化大革命”的巨大破坏之后刚刚复苏之际，钱玉昆教授就撰写了《实验免疫学》（人民卫生出版社，1980年出版），介绍了国外早已兴起而国内尚不熟悉的一些免疫学实验技术的原理、方法和应用，对后来我国免疫学的发展起到了一定的传媒和推广作用。

然而，自那以后，国际上免疫学新技术，例如杂交瘤技术、基因工程技术（包括核酸探针技术、聚合酶链反应技术等）如雨后春笋，日新月异地发展起来。为适应这种新形势的需要，钱玉昆教授协同殷金珠教授率领本研究室的一班青年教师并聘请了校外专家编写了这本书。书中着重介绍了基因工程技术和应用；还开辟了一章对中药作为免疫治疗剂的研究与开发程序进行了介绍。无疑，这些内容对免疫学研究室的建立、免疫学研究的开展以及免疫调节剂的开发都有实用价值。

作为一名老免疫学工作者，有幸在改革开放的今天，见到本书的问世，见到自己所从事的专业如此迅速的发展，人才辈出，硕果累累，真是感到欣慰。然而比起发达国家，我们尚有相当大的差距。期望同行们在大好形势下再接再厉，继续努力，为我们的共同事业做出更多新贡献。

首都医科大学 程松高

1994年元月

前 言

鉴于免疫学技术进展迅速,为适应广大免疫学科、生物学科、医学基础以及临床各学科教学与科研人员的迫切需要,本书作为参考书籍编写而成。

本书共分十四章。内容包括两部分:第一部分简要阐明基础免疫学新技术。第二部分重点放在分子免疫学最新技术,即细胞因子的基因工程、基因工程疫苗及抗体、基因诊断与治疗技术等。最后介绍中药免疫调节剂的研制与申报程序。

其中有关理论部分是在其姊妹篇“临床免疫学”中论述。

谨向在百忙中,抽出宝贵时间,参与本书编写工作的著名专家深表谢意。

不适之处,望多指数。

北京医科大学 钱玉昆

1994 年元旦

目 录

第1章 细胞培养实验室的设施及其管理	(1)
第1节 实验室设计	(1)
第2节 实验室仪器设备的使用和维护	(2)
第3节 水的纯化	(5)
第4节 实验器皿的清洗	(5)
第5节 无菌操作的基本要领	(6)
第6节 实验室的安全	(6)
第2章 细胞培养技术	(8)
第3章 淋巴细胞功能检测	(11)
第1节 T 细胞功能检测	(11)
第2节 B 细胞功能检测	(14)
第3节 NK 细胞及 LAK 细胞活性检测	(16)
第4节 中性粒细胞活性检测	(17)
第4章 细胞内第二信使浓度的测量	(18)
第1节 细胞内 cAMP 浓度的测定	(18)
第2节 细胞内钙离子浓度的测定	(19)
第5章 常用免疫标记技术	(22)
第1节 免疫荧光染色技术	(22)
第2节 免疫酶标技术	(24)
第3节 ABC-ELISA 标记技术	(25)
第4节 放射免疫分析技术	(26)
第6章 单克隆抗体技术	(29)
第1节 B 淋巴细胞杂交瘤技术	(29)
第2节 人单克隆抗体的制备	(33)
第3节 双特异性抗体的制备	(38)
第7章 细胞表面分子的检测技术	(41)
第1节 细胞表面抗原的检测	(41)
第2节 细胞膜受体的检测	(42)
第3节 细胞粘附分子的测定	(43)
第8章 细胞因子的检测技术	(46)
第1节 白细胞介素 1	(46)
第2节 白细胞介素 2	(49)
第3节 白细胞介素 3	(50)
第4节 白细胞介素 4	(51)
第5节 白细胞介素 5	(52)

第6节 白细胞介素6	(53)
第7节 白细胞介素7	(54)
第8节 白细胞介素8	(54)
第9节 肿瘤坏死因子的生物活性检测	(55)
第10节 GM-CSF 的活性检测	(55)
第9章 细胞因子的基因工程	(57)
第1节 反转录——聚合酶链反应法克隆细胞生长因子 hbFGF 基因	(57)
第2节 人表皮生长因子全长 cDNA 在 COS-7 细胞中的表达	(60)
第10章 基因工程疫苗	(66)
第1节 基因工程疫苗研制的原则与策略	(66)
第2节 基因工程疫苗研制所需要的工具与方法	(67)
第3节 基因工程疫苗实例	(70)
第11章 基因工程抗体	(72)
第1节 嵌合抗体的制备	(72)
第2节 单链抗体的制备	(76)
第3节 噬菌体抗体库技术	(79)
第12章 基因诊断	(85)
第1节 概论	(85)
第2节 基因诊断的实验技术	(87)
第3节 基因重排与慢性粒细胞白血病 (CML) 的诊断	(96)
第13章 基因治疗	(98)
第1节 免疫因子基因转移与表达	(98)
第2节 基因失活与免疫调控	(104)
第14章 免疫治疗剂的研究与开发概论	(108)
第1节 常用免疫治疗剂	(108)
第2节 免疫治疗剂研制与开发	(111)
第3节 从中草药中寻找免疫治疗剂	(114)
附录 培养液及试剂的配制	(120)

第 1 章 细胞培养实验室的设施及其管理

细胞培养室不同于其他实验室，由于细胞培养是无菌操作，要求工作环境和条件必须保证无微生物污染和其他有害因素的影响，坚持做到清洁、整齐，少有灰尘堆积。由于污染而导致实验失败，会造成劳动和材料的极大浪费。防止这种损失需采用严格的管理和先进的设备。

第 1 节 实验室设计

一、基本要求

良好的实验室设计是高效安全操作的重要前提。细胞培养实验室的设计原则是防止微生物和有害物的影响。要求环境清洁，空气清新、干燥、无烟尘。培养器皿的洗刷、无菌处理、细胞和用品贮存、无菌操作、温育（36.5℃）、培养液配制等，根据条件可采用不同设计方案。

二、实验室布局

实验室布局取决于空间的大小。如果实验室仅有一个房间，那么无菌操作区应尽可能在远离入口的安静里侧，实验与观察活动可与培养在同一室内进行，而清洗与消毒最好设在入口侧。在具有充余空间或新建实验室时，各实验室可按工作性质尽量建成 30~40m² 的较大房间，便于安放仪器和大型设备，具有较大的机动性。

总之，各实验室的工作内容不同，对无菌要求程度也不同，所以房间的设计和安排也不同。同时，各项工作环环相扣，布局需统一协调，既要方便工作，又要利于无菌操作。

三、无菌操作区

超净工作台是目前已普遍应用的无菌操作装置。超净台按气流方向不同分为外流式（气流水平地从内向外流动）和侧流式（气流垂直地从上向下两侧流动）两类。两类各有利弊。外流式超净台由于其气流的强均一性提供极佳的超净环境，但是，由于气流直接面对操作者，可能引起组织等材料上的有害微生物对操作者的侵害，因而外流式超净台最好用于已知无害材料的处理或配制培养液、试剂等。而侧流式超净台由于前有玻璃滑窗的遮挡保护了操作者，但在净化气流和外边气流交界处可因气流的流动出现负压区可能使少许未净化气体混入导致污染，所以应在负压区之内操作。

超净台应安置于实验室的洁净里侧，避免人员的走动，以防尘埃扬起。有条件的研究室最好每个独立的小室里有一个超净台和常用的设备、贮存柜。

四、细胞温育区

细胞温育的空间取决于实验室的研究活动。但是，至少应分配给每个人员有 0.4m² 的温育区。每人应有固定的温育区，以免培养物的混乱。如果实验室较小可用 160L 的立式孵箱可

满足需要。这种孵箱占用台面少，能为开放培养提供气湿两控的环境。如果实验室较大，需更多的温育区，购置数个这种孵箱就不很经济，不如建一个专用暖房。暖房设在实验室内或靠近实验室，须有良好隔离绝缘，温育枷最好用不锈钢制成，尽量避免用木质设备以免遇热变弯。暖房温度依靠恒温器调节。温度控制在 0.5°C 误差范围之内。

五、细胞培养试剂的保存

大部分细胞培养试剂应保存于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 或 -20°C 。一般通用 400L 的冰箱可满足需要。每个人员应有 200~250L 的 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的贮存空间和 100~150L 的 -20°C 的冻存空间。冰箱温度的波动对酶类、抗生素类等试剂有不良影响。冰箱内不可放置挥发易燃物品。冰箱内应保持整洁，试剂均详细标明并贴牢标签。另外，还应有一台 -80°C 的冰箱，因有些试剂或培养物需存于 -80°C 的条件下，还可用于细胞冻存时浸入液氮前的冷冻。

六、尘埃控制

一个繁忙的细胞培养实验室，由于人员的走动和冰箱、离心机、孵箱等的运行尘埃常被扬起。超净工作台虽能滤除几乎所有尘粒，但仍可能会有一些污染物进入而造成污染。因而，采取一切举措最大限度地预防尘埃污染十分必要。

（一）空气供应

细胞培养室应供给洁净滤过的空气。大多空调系统仅能排除较粗尘埃，只有 $40\%\sim 60\%$ 的微生物被有效清除。在空调系统中装上高效尘粒滤膜是个好方法，这种滤膜能清除 $0.3\mu\text{m}$ 以上的颗粒达 99.97%，同时所有的窗户应彻底密封以防有菌气流进入。

（二）实验室地面

实验室地面、实验台等表面须用光滑材料铺设以免存有裂隙且易清洗。实验室清扫时，不可干扫，最好用吸尘器。

（三）人员走动

最大限度地减少人员的走动。大多数尘埃常因人员活动被扬起。在实验室内工作时，一举一动都应十分轻微以减少空气剧烈波动。在无菌操作区减少人员走动尤其重要。

七、实验室的消毒

整个实验室和超净台需要定期消毒。常用消毒方法是用福尔马林（40%的甲醛溶液）或聚甲醛粉进行熏蒸。熏蒸可在周末进行以免对工作人员的不良刺激，因为这种化学药品的蒸汽对皮肤、眼、鼻子、咽喉等有强烈的刺激性。

第 2 节 实验室仪器设备的使用和维护

一、超净工作台

前面已述有两种类型的超净台，应该据其工作特点注意操作方式。

（一）准备工作

在无菌操作之前，使超净台内空气循环并紫外线照射至少 10 分钟，以建立无菌环境。开始操作之前，还要用杀菌剂（酒精溶液广泛使用但须防火，洗必太溶液更好）擦洗工作台所

用物件表面。

(二) 操作程序

进行细胞培养过程中要始终保持良好的无菌技术。如果有液体溅出，须仔细用含杀菌剂的棉球擦去。

超净台内不要存放太多物品，因为空台时滤菌效率最高，物品的存放会引起气流的无序，因此移走不必要的物件是明智的。如果特殊操作需要大量的器材，应尽可能放置于工作台的后部，这样可减少对气流的干扰。

大多数超净台都有紫外灯可在停止工作时用来消毒超净台表面。但是不可在紫外灯照射下工作，因为UV线会灼伤皮肤、损伤眼睛。繁忙的实验室，还应防止不同培养物的交叉污染。因此，切勿在超净台内同时处理两种培养物。在处理完一种培养物后应清除所有器材，清洗工作表面，紫外线照射并空气循环10分钟以上，再接着处理另一种培养物。

另外，即使一天间使用超净台有所间断，最好仍使空气循环连续不断，这样可维持工作表面的洁净，内部的气溶胶能被迅速干燥，可免微生物生长。

(三) 关闭程序

操作完成后，清除工作台内的所有器材，用杀菌剂清洗台面，打开紫外灯并维持空气循环大约10分钟，然后关闭即可。

二、高压消毒锅——湿热消毒法

消毒不仅只是杀灭微生物，而且具有减少有抗性孢子的效果。一般说，消毒有热消毒法包括干燥高温、高压蒸汽消毒，过滤除菌，射线消毒以及化学的方法等。采用哪种消毒方法有待消毒物体的性质及实验室要求而定。

(一) 消毒方法

湿热消毒即高压蒸汽消毒，是最有效的方法。消毒时，消毒品不能装得过满，要有利于热湿蒸汽的侵入和空气的流出。一般用棉布袋包装。加热升温前，要打开排气阀，加热排出残留消毒器的冷空气，空气排除后关闭排气阀，开始升压，至所需压力时，调节加热器，使压力恒定，并开始计算时间。消毒过程中要经常检查压力是否恒定，注意不要因放气系统堵塞失灵造成意外。消毒时间是从压力达到15磅，温度达到115℃时算起，一般需30分钟。消毒后，调节活塞使压力在7分钟左右均匀下降至零，避免液体激烈沸腾。

(二) 已消毒器材的存放

已包装消毒过的玻璃或塑料器材应贮存于良好密封的柜子里。这样大多数高压消毒过的器材可存放3个月左右。超过3个月后宜重新消毒。用于配制培养液的无菌纯水在没有泄漏的情况下可在室温贮存至少一年保持无菌。配制培养液用的滤器宜在消毒当天使用。

可用湿热法消毒的器材见表1-1。

三、电热干燥箱——干热消毒法

主要用于烘干和干热消毒玻璃器皿。在干热消毒时，温度一般要达到160℃并维持90分钟。需要消毒的玻璃器皿数量较大时，最好用较大规格的干燥消毒箱(650×500×500mm)。此外，干燥箱常具鼓风机，鼓风与升温应同时开始，有利于热循环，待温度达100℃时，可终止鼓风。消毒后，温度降至100℃以下后，再开箱门，以免温度骤变引起外界冷气进入或器皿遇冷而破裂。另外，装载物品要略远离加热器位置，避免局部高温，或因温度太高引起包装

纸和布烧焦。

可用于热法消毒的器材见表 1-1。

表 1-1 常用器材的消毒方法

干热消毒法	湿热消毒法
玻璃器皿	带有玻璃和硅胶管的用具
玻璃盖玻片	微形吸管的可丢弃的加样尖头
玻璃载玻片	Compu-pet 用的分装管子
玻璃的巴斯德吸管	滤净器—微孔的 Sartorius
玻璃吸管	有螺旋盖的玻璃瓶
试管	磁力搅拌棒
石蜡	螺旋盖
剪刀, 镊子, 解剖刀	硅化玻管
注射器和金属注射针	橡皮帽、塞, 矽硅塞, 橡皮手套
	口罩、衣服
	醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜
	砂芯玻璃/Seitz/Selas 滤器
	微孔滤膜

四、培养箱

(一) 温度监测

哺乳动物离体培养细胞和体内细胞一样, 都需要在恒定温度下才能生存, 温度变化应不超过 0.5°C , 因此要求培养箱具有较高的灵敏度。电热恒温箱的质量关键在于控温装置, 以电接点温度计控温隔水式恒温箱较好。大多细胞在温度低于最适条件时仍能生长, 但仅仅过热 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 常致细胞死亡。因此, 进行温度监测十分重要。

(二) CO_2 培养箱的维护

CO_2 培养箱已渐成为普遍应用设备, 优点是箱内恒定地供给一定量的 CO_2 (常用 5%)。可维持培养液稳定的 pH 值; 同时箱内有水槽可维持箱内湿度, 避免培养液蒸发。由于培养箱内的温湿环境, 所以, 需经常清理, 以免霉菌生长。培养箱和培养架可用 70% 酒精擦洗。水槽内的水应用无菌蒸馏水, 亦可在水中加入无腐蚀、无挥发性的防腐剂。

五、显微镜

对细胞进行观察, 一架简单的倒置显微镜是必要的。在培养过程中, 常需要拍摄活体培养物。因此, 需购置一架具高级接目镜和长焦距相差聚光器的倒置显微镜, 并配备照相机。此外, 进行免疫组织化学观察需要一台带有照相装置的荧光显微镜; 观察染色体制片、放射自显影结果等需一台生物显微镜; 进行活体观察照相可选用相差显微镜。为了适应多种应用, 可选用一台多功能显微镜代替多台单功能显微镜。

六、离心机

有多种类型,转速高低不等。一般选用 4000RPM 的足够了,最好配置一台低温冷冻高速离心机用于制备。如果仪器无自动平衡装置,离心前必须平衡以免损坏仪器。

七、水浴锅

水浴锅内的水须时常更换,以免微生物的生长。最好每周定期擦洗、换水。培养液和其它试剂常在水浴锅中融化。因此应保持水浴锅的洁净以防将菌带入超净台。

第 3 节 水的纯化

组织培养的各个环节对无菌条件的要求虽有不同,但对水的质量要求是一致的,可信赖高质量的纯水供应是所有细胞培养实验室成功操作的必要条件。如果水的质量低劣,最终会影响到细胞生长和实验结果的准确性。所以高纯度水的制备是很重要的,要求达到无嗅、无色、无菌和无离子。纯水的最低要求是含氯化钠不多于 0.4ppm,含内毒素水平每毫升不高于 10 单位。

配制溶液时应采用新的、具有电阻为 1.5~2.0Ω 的重蒸馏水。蒸馏水贮放时间不宜太长。在准备室选择一处洁净、无尘、清静的地方安放制备净水装置。所得净化水贮备在专用的干净玻璃瓶内,最好用硼砂硅玻璃瓶,标记上制备的日期。

净化水的常用制备方法:

(一) 双重玻璃蒸馏器

采用全套玻璃器皿制造,通过电热丝提供热源的蒸馏装置,最好采用石英玻璃蒸馏器。市售有不同规格的双重玻璃蒸馏器。

(二) 去离子法与玻璃蒸馏器法结合

水中杂有各种金属离子、油脂及酸类,以及 O₂、CO₂、H₂S、Cl₂ 等。这些物质通过交换树脂的处理可以除去。常用的是将强酸性阳离子交换树脂和强碱性阴离子交换树脂混合装入离子交换柱内,将水流通过离子交换柱即得纯净的去离子水,可用来冲洗器皿,去离子水再经过蒸馏得净化水,用于配制溶液。

(三) 逆相渗透净水法

是种新型的净水装置。此套装置可根据需要直接输送水进行净化。

第 4 节 实验器皿的清洗

一、新器皿与污染器皿的清洗

在细胞培养实验中,离体细胞对任何有害物质都十分敏感。有害物包括解体的微生物、细胞残余物以及非营养的化学成分,因此对新采用和重新使用的器皿,都要严格清洗,同时,所有细胞培养器材须与其他实验用器材严格分开。清洗可用手洗或器械清洗(如超声清洗器、吸管清洗器、培养瓶喷淋器等)。但都要符合下列程序:

1. 使用过的器皿不得待干后再除污,须用后即泡入水中。

2. 除污后的器皿须在 0.5% (V/V) 次氯酸钠中浸泡过夜, 然后, 彻底清除粘附细胞或培养基。

3. 用细胞培养专用去污剂清洗是必要的。

4. 用自来水冲淋彻底, 并用各级纯水漂洗。

5. 洗净的玻璃器皿倒立于干燥箱内烘干。

6. 用消毒袋或锡箔包装后置于无尘处待消毒处理。

二、特殊器材的清洗

螺旋盖、橡皮帽、橡皮塞、橡皮管、砂芯玻璃滤器等的清洗比较特殊, 需分别浸泡、清洗、包装、消毒。

第 5 节 无菌操作的基本要领

在一切操作中做到最大限度的无菌。为此, 所有工作要进行得有条不紊和可靠安全。

1. 培养前准备: 对每次培养所需物品和时间要胸中有数, 作好充分准备, 安排实验程序, 使之紧凑合理。

2. 洗手着装: 由于超净台的使用, 一般无需穿隔离衣帽、戴口罩, 但对手臂皮肤应仔细清洗。如果超净台风力不足, 操作时最好不要交谈并戴口罩, 以防呼吸气流造成污染。

3. 超净台内应合理布局, 避免培养瓶、贮液瓶等和风向相逆, 动作要准确敏捷, 防止手触及器皿的无菌部分。

4. 火焰消毒: 安装吸管帽, 开启或封闭瓶口等操作时, 都要经过火焰灼烧并在火焰附近进行。应避免玻璃器皿受热不均而破裂, 避免用灼热器皿直接接触细胞造成死亡。

5. 吸取营养液、细胞悬液等液体时, 应专管专用, 尽量不混用, 以防扩大污染或造成不同细胞间的污染。

6. 工作自始至终要保持一定的顺序性, 组织和细胞在未做处理前, 勿过早暴露于空气中。同样, 培养液等在未用前不要过早开瓶, 用后如不重复使用, 应立即封闭瓶口。培养瓶等开瓶后均应保持斜位或平放, 避免长时开口直立。

第 6 节 实验室的安全

目前, 研究人员面临的最常见的危险是破碎玻璃、尖锐器具、危险化学品、火、辐射等。但是, 在细胞培养室里, 还有各种各样的可能的病原体的感染的危险。所以, 应坚持安全工作标准, 重视安全问题并且在对工作人员没有危害的环境下进行细胞培养物的处理。

一、常规操作的安全问题

(一) 破碎与尖锐器材

玻璃器皿的碎片和尖锐器材常引起工作人员受伤。所以, 巴斯德吸管、针头、解剖刀片等须仔细处理。这些器件应分别置于可封闭的铁罐里, 以免与其他可重新使用的玻璃器皿混合。容量吸管的颈部在反复酸泡、高压消毒后易破裂, 不要试图将不配套的橡皮球套上以免刺伤, 颈部破裂的吸管应弃去。

(二) 危险化学品

细胞培养中遇到的危险化学品虽然并不很多。但是, 酸液、次氯酸钠、二甲基亚砷、福尔马林和其他一些化学品仍须仔细处理。另外, 高压气体、液氮都有一定危险性, 应予注意。用于浸泡的次氯酸钠溶液对操作者的皮肤和眼睛有刺激性, 浸泡用的强酸液具极大的腐蚀性, 洗涤或配制时, 工作人员应穿戴实验服、橡胶手套和防护眼镜。二甲基亚砷(DMSO)是易被皮肤吸收的有毒试剂。DMSO甚至可穿过乳胶手套。使用这种试剂须十分小心, 如有溅于手套上, 需尽快弃去并用肥皂洗涤。

CO₂ 气体是细胞培养常用气体, N₂ 有时用于正压抽滤, O₂ 有时用于封装安瓿。盛装气体的钢瓶须固定于架上。一般这些气体无显著的危害, 除非大量漏逸, CO₂ 和 N₂ 可引起窒息, 氧则可助燃。如有泄漏发生则疏散人员, 打开窗户通风。

在冻存或复苏细胞时应防止液氮冻伤、窒息和安瓿炸裂, 最好戴上保护眼镜和绝缘手套。

(三) 火

用可溶性酚或季铵化合物而不用 70% 酒精作为超净台表面消毒剂可减少超净台内着火的可能性。超净台内最好用酒精灯而不用煤气灯。

(四) 辐射

细胞培养室主要的辐射源于消毒用的紫外灯, UV 线可灼伤皮肤。在开始无菌操作时一定要关掉 UV 灯, 千万不要在 UV 灯直射下操作以免损伤眼睛。进行同位素标记、掺入等实验时, 还须注意避免同位素的污染, 必须符合核技术的操作规范。

二、培养物的危险性

由于细胞的来源不同, 有些细胞系可能具有与一些病原物或致癌病毒一样的危险性。操作人员应注意自我防护, 无关人员的进入须受限制, 进入实验室要穿上工作服, 离开时脱掉工作服并洗手。严禁在实验室饮食、抽烟。

参 考 文 献

1. Horrigan G, et al. Housekeeping For Culture Laboratories. in Horrigan G, Condron A eds. *Laboratory Methods in Immunology* (Vol. 3). 5-39. Plenum Publishing Co, New York, 1992.
2. 陈瑞铭, 等. 动物组织培养技术及其应用. 科学出版社, 北京, 1991.

(章灵华)

第2章 细胞培养技术

在严格无菌操作条件下,从机体内分离出细胞,模拟机体中生理条件进行细胞离体培养,使之生存和生长,称之为细胞培养。细胞培养技术是现代免疫学实验中常用的研究手段之一。

【材料】

(一) 细胞培养基

可用的细胞培养基有很多种,所含成分不完全相同,配制方法有所差异。

1. Hanks 液:是细胞培养中常用的无机盐溶液和平衡盐溶液,主要用于配制培养液和细胞清洗液,而不能单独作为细胞培养液,目前认为 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的存在会降低细胞的活力或损伤细胞,因此, Hanks 液一般用无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的液体配制。

2. RPMI-1640:是目前细胞培养中最通用的培养基,可作为生长旺盛的细胞株及细胞克隆化等的细胞培养。为提高培养效果,在 RPMI-1640 中可补加 2mol/L 谷氨酰胺及 0.11g/L 丙酮酸钠。

3. Eagle 培养液 (MEM, eagles mininum essential medium):含有的氨基酸和维生素的成分较少,宜于添加或减少某些成分,多用于特殊研究的细胞培养。

(二) 培养基的缓冲系统

常用的缓冲剂为 25mmol/L 碳酸氢钠- $5\%\text{CO}_2$ 与 25mmol/L HEPES (N-2-羟基乙基哌嗪, N-2-乙基磺酸) 二种类型。前者缓冲能力较低,但却很便宜且毒性很低,接近生理条件下的缓冲环境;而后者则具有较强的缓冲能力, 30mmol/L 相当于 $2\%\text{CO}_2$ 。近来,双缓冲体系已被采用且效果很好,如 RPMI-1640 就含有 25mmol/L 碳酸氢钠与 25mmol/L HEPES 双重缓冲剂。

培养基中的 pH 值也可以通过缓冲剂来调节。由于细胞的代谢,培养基很快变成黄色, pH 值随之下降。加入缓冲剂后,可以较长时间的控制 pH 值在生理范围内,促进细胞得以良好的生长。大多数细胞在 pH 7.4 的环境中生长。为了便于观察细胞培养基的 pH 变化,一般以酚红作为指示剂;它在碱性环境下呈紫色,中性环境下呈橙黄色,而在酸性环境中呈黄色。

(三) 抗生素

不同的实验室有不同的配方。一般多采用培养基内的最终浓度为每毫升含 100 单位青霉素和 $100\mu\text{g}$ 链霉素。为防止真菌污染,可加入每毫升 $2.5\mu\text{g}$ 二性霉素 B。消除支原体时使用卡那霉素最有效,浓度为每毫升 $100\mu\text{g}$ 。

(四) 小牛血清/胎牛血清

各批号牛血清对细胞生长的作用差别很大。选择一批效果好的牛血清是很必要的,也就是既能维持细胞生长,又不产生促分裂效应。培养基中加入不同份量的牛血清,其作用也不尽相同, 5% 牛血清为保护细胞用, 10% 为细胞生长用, 15% 为融合及克隆化用, 20% 为冻存细胞用。在牛血清中加入 2-ME (2-巯基乙醇) 能引起 B 细胞活化,提高牛血清的作用,也可减少牛血清的用量。由于胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 价格昂贵,故一般细胞培养可以小牛血清作为 FCS 的替代品。

【方法】

(一) 饲养细胞的培养

在体外细胞培养中单个或少数分散的细胞难以存活和繁殖，如果在培养瓶中加入一些能贴壁生长的活细胞（如巨噬细胞，胸腺细胞等），能促使很少量的细胞生长和逐渐增殖。

1. 制备饲养细胞悬液：

- (1) 将 15~20g 的 BALB/c 小鼠断颈处死，用 75% 酒精浸泡消毒。
- (2) 在无菌条件下解剖小鼠，分离腹腔巨噬细胞，将细胞悬液移至离心管中 1000rpm，10 分钟。
- (3) 弃上清，加入一定量 HAT（即 Eagle 培养液中加入次黄嘌呤、氨基嘌呤及胸腺嘧啶核苷）培养液，用血球计数盘做细胞计数。
- (4) 加入适量 HAT 后，调整饲养细胞悬液至 10/ml。向 24 孔或 96 孔培养板加入 0.5ml/孔（24 孔板）或 0.1ml/孔（96 孔板）的细胞悬液。
- (5) 将培养板放入 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。

2. 饲养细胞的传代：

- (1) 将生长良好的细胞群转入培养瓶中，倾弃旧培养液。
- (2) 加入适量 0.25% 胰蛋白酶消化液，倾斜培养瓶，使消化液覆盖全部培养瓶表面，室温下作用 30 秒钟。
- (3) 将培养瓶放入 37℃ 温箱孵育，大约 3~5 分钟后用手振荡培养瓶，反复几次直至贴壁细胞全部脱落为止。
- (4) 加入含 20% 血清（或 4ml FCS）的培养液，终止胰蛋白酶的消化作用。
- (5) 用吸管将细胞轻轻吹起，移入离心管中，离心 1500rpm，7 分钟，洗二遍，加适量培养液进行细胞计数。
- (6) 用适量 RPMI-1640 调整细胞悬液浓度为 10⁶/ml 用于传代。
- (7) 将部分饲养细胞转移至另一培养瓶中。向两瓶中加入适量培养液，混匀细胞，37℃，5%CO₂ 培养箱继续培养。

（二）小鼠骨髓瘤细胞株的培养

小鼠骨髓瘤细胞株常用于淋巴细胞杂交瘤的制备，常用的细胞株有小鼠 NS-1，SP2/0 和 X63-Ag8-653 等细胞系。

1. 在严格的无菌条件下取生长良好的细胞株，计数活细胞。瘤细胞的存活率需要 95% 以上。
2. 将瘤细胞培养在适量的 RPMI-1640 完全培养基中。
3. 将培养瓶置于含 5%~7%CO₂，37℃ 孵箱中培养，每 2~3 天换一次培养基。
4. 每日在倒置显微镜下观察一次，观察的主要内容是：是否有污染，细胞生长状态和 pH 等情况。一般在 5 天左右培养细胞可达到最大密度需要再次传代。
5. 瘤细胞株在体外培养过程中会发生突变回复，逐渐转变成 HGPRT 阳性，为了防止或去除回复突变的细胞，半年后宜用含 15μg/ml 8-氮杂鸟嘌呤的 DMEM（Dulbecco's modified eagles medium）培养液再培养筛选一次，清除突变回复了的细胞。

（三）外周血单个核细胞培养

1. 无菌静脉取血（肝素抗凝）5~10ml，加等量 Hanks 液，移入含淋巴细胞分层液的离心管中。
2. 离心 2000rpm，20 分钟。
3. 取液体界面的白细胞层，加入适量细胞培养液，轻轻吹打细胞悬液。