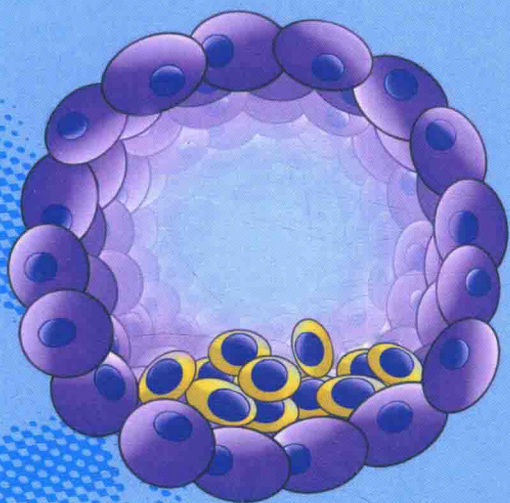




iCourse · 教材
生物技术与生物工程系列



细胞工程实验教程

Practical Course of
Cell Engineering

主编 李志勇

高等教育出版社



细胞工程实验教程

.....

Practical Course of Cell Engineering

主 编 李志勇

副主编 闫晓梅

编 者 (按姓氏拼音排序)

冯瑞丽 (上海大学)	高思琪 (上海海洋大学)
洪云汉 (上海海洋大学)	黄林彬 (上海海洋大学)
黄宜兵 (吉林大学)	李名友 (上海海洋大学)
李志勇 (上海交通大学)	梁玉玲 (河北大学)
吕恺伦 (上海海洋大学)	吕为群 (上海海洋大学)
文铁桥 (上海大学)	吴海歌 (大连大学)
闫晓梅 (上海交通大学)	严继舟 (上海海洋大学)
严兴洪 (上海海洋大学)	姚子昂 (大连大学)
张 霞 (上海交通大学)	张桂荣 (吉林大学)
赵 虎 (上海海洋大学)	赵 岩 (上海海洋大学)
周 燕 (华东理工大学)	



内容提要

为适应各类高校教学需要,本书综合设计了细胞工程有关的基本技术实验、基础实验、综合实验、前沿探索实验4个大类(篇)总计28个独立实验。每个实验内容除实验目的、原理、材料、试剂、仪器、步骤、结果、思考题之外,还提供了设计性实验内容、学时与教学安排建议等,方便同行参考。本书采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,数字课程提供了实验有关的知识拓展、实验仪器、实验材料、关键环节、视频、教学课件、辅教资源(包括实验准备要点、设计思路、授课要点等)、解题要点、参考文献等资源。

本书注重理论与实践结合,系统性强,技术方法新,突出技能训练,具有较强的实用性。适合普通高校生物技术、生物工程、生物制药等专业实践教学使用,也可供食品科学、农林等专业教学参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程实验教程 / 李志勇主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2016.7

iCourse 教材·生物技术与生物工程系列

ISBN 978-7-04-044622-7

I. ①细… II. ①李… III. ①细胞工程-实验-高等学校-教材 IV. ①Q813-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第012266号

Xibao Gongcheng Shiyan Jiaocheng

项目策划 吴雪梅 王 莉 单冉东

策划编辑 王 莉 责任编辑 单冉东 田 红 封面设计 王凌波 责任印制 毛斯璐

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京鑫丰华彩印有限公司
开 本 889mm×1194mm 1/16
印 张 9.25
字 数 500千字(含数字课程)
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2016年7月第1版
印 次 2016年7月第1次印刷
定 价 23.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 44622-00

数字课程 (基础版)

细胞工程实验 教程

主编 李志勇

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/44622>, 进行注册。已注册的用户输入用户名和密码登录, 进入“我的课程”。
2. 点击页面右上方“绑定课程”, 正确输入教材封底数字课程账号(20位密码, 刮开涂层可见), 进行课程绑定。
3. 在“我的课程”中选择本课程并点击“进入课程”即可进行学习。课程在首次使用时, 会出现在“申请学习”列表中。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn。

iCourse · 教材
生物技术与生物工程系列

细胞工程实验教程

主编 李志勇

用户名 密码 验证码 进入课程

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

细胞工程实验教程数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程包括知识拓展、实验仪器、实验材料、关键环节、视频、教学课件、辅教资源(包括实验准备要点、设计思路、授课要点等)、解题要点、参考文献等板块, 充分运用多种形式的媒体资源, 丰富知识的呈现形式, 拓展教材内容, 提升课程教学效果。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/44622>

出版说明

“十二五”期间是高等教育继续深化改革、走以提高质量为核心的内涵式发展道路的关键时期。课程建设是教育教学改革的重要内容，课程建设水平对教学质量和人才培养质量具有重要影响。2011年10月12日教育部发布了《教育部关于国家精品开放课程建设的实施意见》(教高[2011]8号)，开启了信息技术和网络技术条件下校、省、国家三级精品开放课程建设的序幕。作为国家精品开放课程展示、运行和管理平台的“爱课程(iCourse)”网站也逐渐为高校师生和社会公众认知和使用。截至目前，已有2600多门资源共享课和800多门视频公开课在“爱课程(iCourse)”网站上线。

高等教育出版社承担着“‘十二五’本科教学工程”中，国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务，在与广大高校的调研和协作中，我们了解到当前高校的教与学发生了深刻变化，也真切感受到课程和教材建设所面临的挑战和机遇。如何建设支撑学生自主学习和校际共建共享的课程和新形态教材成为现实课题。在教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会的指导下，结合我社2009年以来在数字课程建设上的探索和实践，我们提出了“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目，项目建设得到了众多高校的积极响应和广泛参与。2013年5月以来，分别在上海、天津、沈阳、杭州、武汉、无锡、银川等地陆续召开了项目启动会议、主编会议和编写会议。2015年，项目成果“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”陆续出版。

本系列教材涵盖生物技术、生物工程专业15门基础课程和专业课程，在出版形式、编写理念、内容选取等方面体现以下特点：

1. 采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质教材与丰富的数字教学资源一体化设计，纸质教材内容精炼适当，并以新颖的版式设计和内容编排，方便学生学习和使用；数字课程对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，形成以纸质教材为核心，数字教学资源配合的综合知识体系。
2. 创新教学理念，引导自主学习。通过适当的教学设计，鼓励学生拓展知识面和针对某些重要问题进行深入探讨，增强其独立获取知识的意识和能力，为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。
3. 强调基础与技术、工程应用之间的紧密联系，注重学生应用能力培养。在讲述理论的同时，通过数字课程对学科前沿进展和工程应用案例进行延伸，在概念引入和知识点讲授上也尽量从实际问题出发，这不仅有利于提高学生的学习兴趣，也有助于加强他们的创新意识和创新能力。
4. 教材建设与资源共享课建设紧密结合。本系列教材是对各校精品资源共享课和教学改革成果的集成和升华，参与院校共建共享课程资源，更可支持各级精品资源共享课的持续建设。

本系列教材以服务于生物技术、生物工程专业课程教学为核心,汇集了各高校学科专家与一线教师的智慧、经验和积累,实现了内容与形式、教学理念与教学设计、教学基本要求与个性化教学需求,以及资源共享课与教材建设的一体化设计,以期对我国生物技术与生物工程专业教学改革和人才培养产生积极影响。

建设切实满足高等教育教学需求、反映教改成果和学科发展、纸质出版与资源共享课紧密结合的新形态教材和优质教学资源,实现“校际联合共建,课程协同共享”是我们的宗旨和目标。将课程建设及教材出版紧密结合,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,是一种行之有效的方法和创新,得到了高校师生的高度认可。尽管我们在出版本系列教材的工作中力求尽善尽美,但难免存在不足和遗憾,恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与建议。

高等教育出版社

2015年6月

前 言

近年来,国家精品资源共享课、视频公开课、慕课等新型课程形式不断出现,对于课程的配套教材编写提出了更高的要求,数字化教材、网络化教材等新形式的教材应运而生。2010年高等教育出版社出版了上海交通大学编写的《细胞工程实验》,至今已经接近6个年头了。为配合国家精品资源共享课“细胞工程”的建设需要,深感编写一部突出数字化,适合网络学习、资源共享的细胞工程实验教材的必要性与迫切性。同时,为达到通过实验教学提高学生的实践与创新能力、提高学生综合素质的目的,也急需在实验教材内容与形式方面做出新的尝试。

受高等教育出版社委托,上海交通大学组织了来自上海交通大学、华东理工大学、上海大学、上海海洋大学、吉林大学、大连大学、河北大学的一批富有细胞工程实验教学经验的教授及骨干教师,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式进行“细胞工程实验”课程的构建和教材编写,使得实验内容和形式有了很大改变。该教材具有以下三个显著特点:

1. 层次分明,适应面广。在强调实验的基础性和技术性基础上,突出实验的综合性与前沿性,方便不同学校选用。
2. 选题新颖,科研反哺。实验设计紧密结合科学研究及前沿领域,内容新颖,利于培养学生创新能力。
3. 数字扩展,便利学习。除纸质版教材外,一体化设计和建设了相应的数字课程,方便学习与教学。

本书主要由基本技术实验、基础实验、综合实验、前沿探索实验4部分组成,共计28个实验。编委分工如下:上海交通大学闫晓梅编写实验1~9、14、16~18,同时负责全书的统稿;上海交通大学张霞编写实验10;上海海洋大学严兴洪、黄林彬编写实验11、12;上海海洋大学洪云汉、李名友编写实验13;大连大学吴海歌、姚子昂编写实验15;上海海洋大学吕恺伦、严继舟编写实验19;上海海洋大学赵岩、赵虎、吕为群编写实验20;华东理工大学周燕编写实验21、22;上海大学冯瑞丽、文铁桥编写实验23、24;河北大学梁玉玲编写实验25;吉林大学黄宜兵编写实验26;吉林大学张桂荣编写实验27;上海海洋大学高思琪、严继舟编写实验28。上海交通大学李志勇负责全书组织、统稿并编写引言部分。

本书的数字课程包括知识拓展、实验仪器、实验材料、关键环节、视频、教学课件、辅教资源(包括实验准备要点、设计思路、授课要点等)、解题要点和参考文献。数字课程与纸质教材相配套,

为教学和学生自主学习提供了更丰富的资源。

本书不仅适合生物技术、生物工程等专业的细胞工程实验教学，也可满足生物学等相关专业的细胞生物学实验教学需要，同时也适合相关科研与技术人员参考。

本书有幸被列为高等教育出版社“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”建设项目，同时得到了上海交通大学教材建设计划资助，特此致谢！

由于水平有限，难免存在错误与不足之处，敬请专家与读者不吝批评指正。

李志勇

2016年3月

目 录

引言 细胞工程实验室组成与无菌操作技术	1
---------------------	---

第一篇 基本技术实验

实验 1 普通光学显微镜的使用技术	9
实验 2 特殊光学显微镜的使用技术	13
实验 3 电子显微镜的使用技术	19
实验 4 台盼蓝染色与细胞计数	25
实验 5 福尔根反应显示细胞 DNA	28
实验 6 细胞吞噬与酸性磷酸酶反应	32
实验 7 动植物细胞凋亡的诱导与检测	35
实验 8 细胞冻存与复苏	39
实验 9 细胞器的分离与鉴定	42

第二篇 基础实验

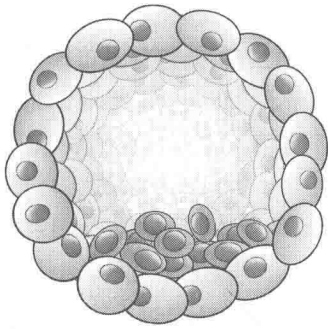
实验 10 植物组织培养	49
实验 11 海藻体细胞再生	55
实验 12 海藻的极性观察	58
实验 13 鱼类细胞移植	61
实验 14 表皮角质细胞的传代培养	68
实验 15 血管内皮细胞的体外三维培养	71
实验 16 MTT 法检测动物细胞的生长活力	74
实验 17 CHO 细胞药物处理后中间纤维的免疫酶标染色	77
实验 18 流式细胞术分析细胞周期	81

第三篇 综合实验

实验 19	鱼类精子冻存与体外受精	89
实验 20	三倍体鱼的制备与倍性鉴定	93
实验 21	动物细胞在微载体上的贴附与生长	98
实验 22	骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定	102
实验 23	大脑皮层神经元分离、培养与鉴定	107
实验 24	皮质神经元光遗传操作与细胞内记录	112
实验 25	根癌农杆菌介导的烟草叶片遗传转化	114

第四篇 前沿探索实验

实验 26	红细胞的制备及其在药物体外毒性评估中的应用	121
实验 27	利用细胞工程方法检测 HSC 细胞氧化应激后蛋白质及 ROS 的变化	126
实验 28	用斑马鱼受精卵建立人类疾病模型	131



引言 细胞工程实验室组成与无菌操作技术

一、实验室基本组成

细胞工程实验室一般由准备室、缓冲间、无菌室、培养室、分析室等几部分组成（图1）。要求工作环境和条件必须保证无微生物污染、环境清洁。

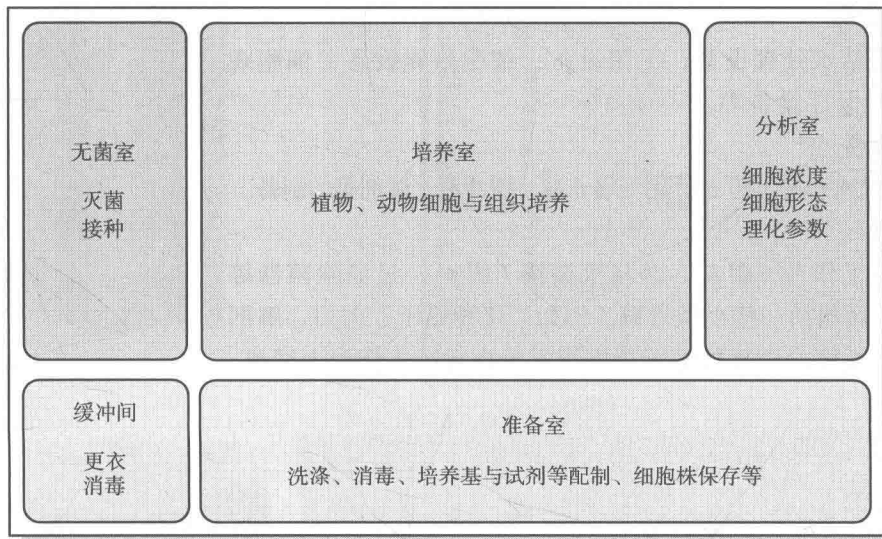


图1 细胞工程实验室示意图

1. 准备室

一般包括洗涤区、消毒区、制水区、控温区、工作区几部分。主要用于原材料处理，实验用品的洗涤、消毒、干燥，溶液配置，培养物准备和保存等。为避免污染，最好由多个小房间组成，具有良好的通风与采光条件。

- (1) 洗涤区 一般设有水槽、洗涤池，保持干燥。
- (2) 消毒区 需要配备消毒、烘干等设备，因耗电量大，一般需要单独设计供电线路。
- (3) 制水区 需要配备纯水机等设备。
- (4) 控温区 需要配备冰箱、培养箱等设备，用于保存细胞株、培养基材料、生化试剂等。
- (5) 工作区 放置天平、酸度计、磁力搅拌器等，用于培养基、缓冲液、各种试剂的配制。

2. 缓冲间

一般设计在培养室外，通常包括更衣间。需要保持清洁、干燥和不通风；设置有紫外灯等消毒设施。

3. 无菌室

主要用于材料的消毒、灭菌、接种、培养与转移等。需要密封、防尘、防菌。主要设备有：紫外光源、超净工作台、消毒器、酒精灯、灭菌锅、过滤除菌器等。

4. 培养室

是用于组织或细胞培养的场所，要求清洁、干燥、无菌、不通风。

对于植物组织或细胞培养，主要设备包括：空调机、除湿机、换气扇、灯光、培养架（控温、控光、控湿）、光照培养箱、人工气候箱、摇床、培养箱等。大多数植物在 $23 \sim 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，一般在 $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度保持在 $70\% \sim 80\%$ 。控制光照时间可安装定时开关钟。

对于动物细胞或组织器官培养，主要设备包括：超净工作台、倒置显微镜、离心机、 CO_2 培养箱、培养瓶培养系统、生物反应器等。

5. 分析室

用于对培养物的观察分析与培养物的计数等。主要设备有：离心机、细胞破碎仪、各种类型显微镜、酶标仪、紫外分光光度计、流式细胞仪、计算机及打印机等设备。

二、主要设备

主要设备包括水处理设备，无菌设备，细胞培养设备，细胞观察分析、分离与保存设备等。

1. 水处理设备

主要采用超纯水系统（图 2），用于培养液、缓冲液、试剂等的制备。

2. 无菌设备

主要有超净工作台（图 3）、高压灭菌锅（图 4）、过滤除菌器等大型设备。此外还包括一些小型器械，例如：接种镊子、剪刀、解剖刀、接种针等。细胞分离接种等无菌操作需要在超净工作台上完成。

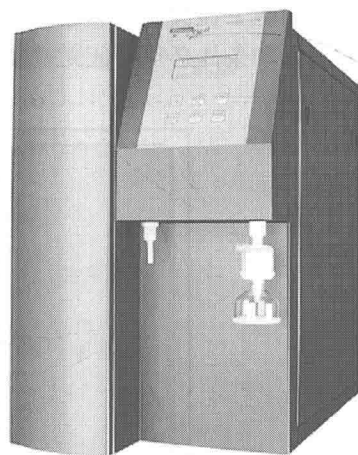


图 2 超纯水器



图 3 超净工作台



图 4 高压灭菌锅（周燕提供）

超净工作台分为侧流式、直流式和外流式三大类，工作原理是利用鼓风机驱动空气通过高效滤器除去空气中的尘埃颗粒，使空气得到净化。净化空气徐徐通过工作台面，结合紫外线杀菌使工作台内达到无菌条件。动物细胞培养基灭菌一般采用过滤除菌，过滤除菌器有金属滤器、微孔滤膜器、玻璃漏斗式滤器等类型。

3. 细胞培养设备

(1) 植物细胞、组织培养 主要采用光照培养箱(图5)、光照摇床等设备，为细胞生长提供稳定的温度、适当的湿度、光照等条件。大规模植物组织培养还需要专门设计人工气候室，要求能精确控制温度、湿度、光照以及 CO_2 等条件。

(2) 动物细胞培养 主要有 CO_2 培养箱(图6)、培养瓶培养系统等。 CO_2 培养箱可以使培养条件维持在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 等恒定条件，满足动物细胞生长需要。使用 CO_2 培养箱培养细胞时应注意：①用螺旋口瓶培养细胞时，需将瓶盖微松，以保证通气；②保持培养箱内空气干净，定期消毒($90\text{ }^\circ\text{C}$ ， 14 h)或紫外线灭菌；③保持箱内湿度，避免培养液蒸发。动物细胞较大规模培养需要常规生物反应器(图7)。动物细胞培养新型的培养系统还有中空纤维生物反应器(图8)、微重力生物反应器等。

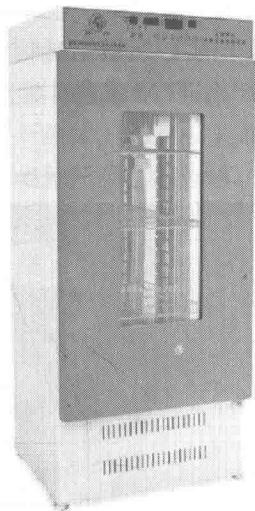


图5 光照培养箱



图6 CO_2 培养箱

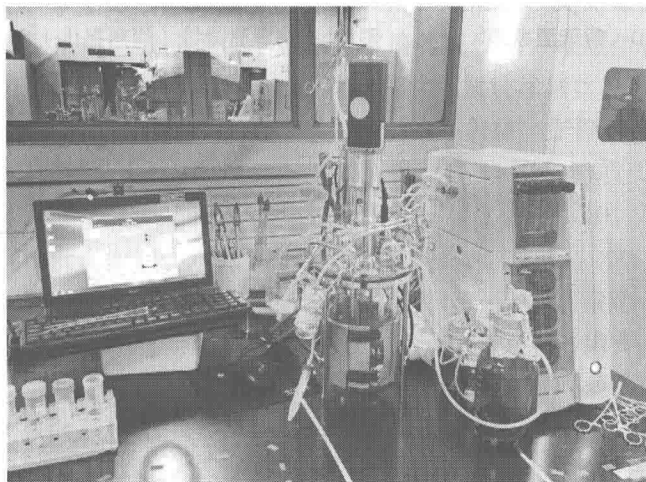


图7 常规生物反应器(周燕提供)

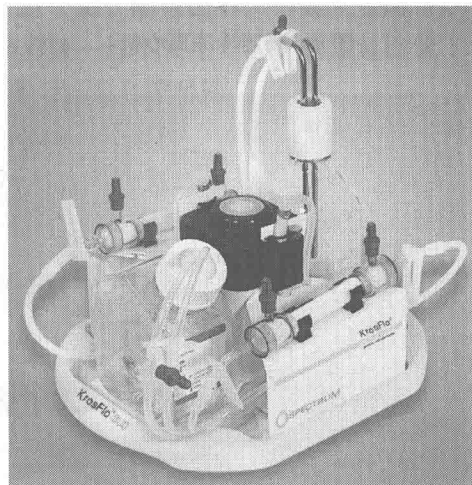


图8 中空纤维生物反应器

4. 细胞分离、保存设备

主要使用各种类型的离心机，包括低速、高速和常温、冷冻离心机（图9）。保存设备主要有普通冰箱、-80℃超低温冰箱（图10）、液氮罐等。胚胎、卵子或精子保存需要用到特殊的冷冻保存与复苏设备。

5. 细胞观察分析设备

通常采用各种类型的显微镜。实验室必须配置倒置普通光学显微镜（图11），以便随时观察细胞生长状况。最好配置拍照、图像捕捉及分析系统。细胞形态与结构的精细表征需要扫描电子显微镜和透射电子显微镜。

6. 其他设备

一些特殊操作需要特殊的仪器设备，例如，用于细胞分检或者分析的流式细胞仪（图12），用于细胞操作的显微操作系统（图13），以及用于细胞融合操作的细胞融合仪等。

三、无菌技术

无菌技术（aseptic technique）是防止微生物污染细胞的技术。植物细胞、组织培养以及动物细胞培养过程都需要严格保持无菌条件。

在培养过程中，细胞对有害物质非常敏感。微生物、细胞残留物及非营养成分的化学物质均可能会影响细胞的生长。因此，对新使用和重新使用的培养器皿都要严格彻底的清洗。

细胞培养的最大危险是发生细菌、真菌和病毒等微生物的污染，污染的主要原因包括操作间或周围空间的不洁、培养器皿和培养液消毒不彻底。细胞培养的每个环节都应严格进行无菌操作，防止污染。



图9 高速冷冻离心机

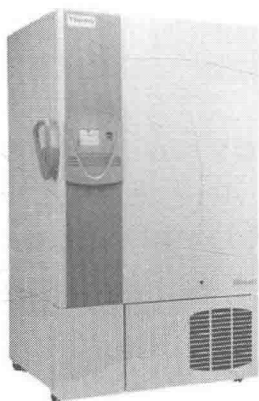


图10 超低温冰箱

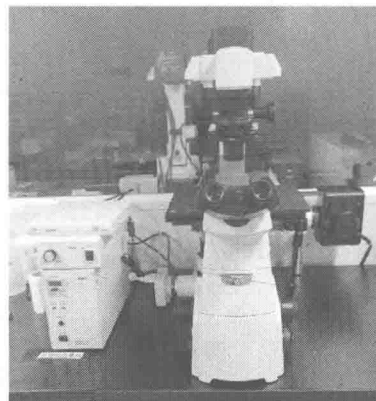


图11 倒置显微镜（周燕提供）

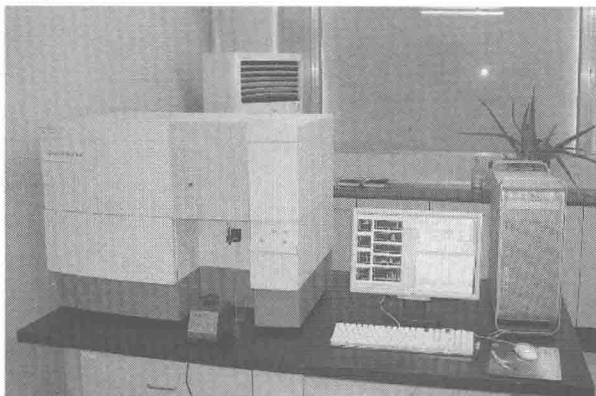


图12 流式细胞仪

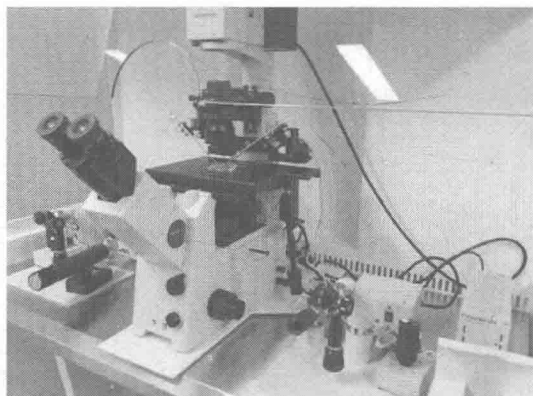


图13 显微操作系统

1. 消毒技术

消毒方法一般分为三类：物理灭菌法、化学灭菌法、使用抗生素抑菌。

(1) 物理灭菌法

紫外线消毒：用于空气、操作台表面和不能使用其他方法进行消毒的培养器皿的消毒，可以消灭空气中大部分细菌，培养室的紫外线灯应距地面不超过 2.5 m，消毒时物品不宜相互遮挡。紫外线可产生臭氧，污染空气，对人皮肤也有伤害，实验操作时要注意安全。

湿热消毒：即高压蒸气消毒，是一种使用最广泛、高效的消毒方法，主要用于培养液、培养器皿等的灭菌。压力蒸汽消毒器中消毒物品不能装得过满，以防止消毒器内气体阻塞而发生危险。在加热升压之前，先要打开排气阀门排放消毒器内的冷空气，冷空气排出后，关闭排气阀门。需要经常检验安全阀活动是否自如。消毒过程中，操作者不能离开工作岗位。

过滤除菌：主要用于气体的除菌。此外对于动物细胞培养，不能耐受高温的培养用液、血清、酶液等也常采用过滤法除菌。

(2) 化学消毒法 最常用的是 70% 乙醇（酒精），主要用于操作者的皮肤、操作台表面及无菌室内的壁面处理。

(3) 使用抗生素抑菌 在细胞培养时，在培养基中添加青霉素、链霉素、卡那霉素、制霉菌素等抗生素抑制细菌、真菌等污染。青霉素能抑制细菌细胞壁的合成；链霉素能抑制细菌蛋白质的合成；卡那霉素也能抑制细菌蛋白质合成；制霉菌素能干扰细菌细胞质膜的合成。

2. 污染检测与控制

(1) 细菌 细菌 (bacteria) 是一类形状细短、结构简单、多以二分裂方式进行繁殖的原核生物，主要由细胞壁、细胞质膜、细胞质、核质体等部分构成，有的细菌还有荚膜、鞭毛、菌毛等特殊结构。细菌直径 0.5 ~ 1.0 μm ，长度多为 0.5 ~ 5 μm 。可根据形状分为三类：球菌、杆菌和螺旋菌（包括弧形菌）。

细胞培养常见的污染细菌有枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、假单胞菌、白色葡萄球菌等。细菌污染初期不易发现，培养液颜色变黄，出现混浊，倒置显微镜下观察可以看见有大量圆球状颗粒漂浮。采用普通肉汤培养基培养也可以检测有无细菌污染。采用青霉素、链霉素可以预防细菌污染。

(2) 真菌 真菌 (fungus) 是具有真核和细胞壁的异养生物。其营养体除少数低等类型为单细胞外，大多是由纤细管状菌丝构成的菌丝体。多数真菌的细胞壁中最具特征性的是含有甲壳质，其次是纤维素。常见的真菌细胞器有：细胞核、线粒体，微体、核糖体，液泡、溶酶体、泡囊、内质网、微管、鞭毛等；常见的内含物有肝糖、晶体、脂体等。真菌通常分为三类：酵母菌、霉菌和蕈菌（大型真菌），它们归属于不同的亚门。

常见的污染真菌有白色念球菌、烟曲霉、黑曲霉、毛霉菌、孢子霉、酵母菌等。污染发生时可以看见呈白色或浅黄色小点漂浮于培养液表面，细胞生长变慢，培养液一般不发生浑浊。倒置显微镜下可见细胞间有纵横交错的丝状、管状或树枝状菌丝。可采用抗真菌剂防治真菌污染。

(3) 支原体 支原体 (mycoplasma) 是介于细菌和病毒之间能独立生存的、结构上更简单的一种原核生物。比细菌还要小 (0.1 ~ 0.3 μm)。遗传物质 (DNA) 存在于无膜分隔的核状区，或是双螺旋，或是环形分子。遗传物质的量通常只有细菌的 1/10。具有细胞质膜而无细胞壁。会引起动物或人的呼吸系统疾病。

支原体在细胞培养中是一种常见的污染源，会造成培养物异常或衰亡。污染具有隐蔽性，普通光学显微镜不能直接观察到支原体。检查支原体污染要用电子显微镜观察、荧光法或免疫法测定。可通过过滤器，因此过滤除菌不能去除。支原体污染时多吸附于细胞表面或分散于细胞之间，培养液不发生浑浊，细胞生长变慢，部分细胞变圆，从瓶壁脱落。但是多数细胞无明显变化，因此非常难发现。

支原体污染检测有相差显微镜观察、电镜检测、荧光染色观察、培养观察等方法，各自特点如下：

① 相差显微镜观察，呈暗色微小颗粒，多位于细胞与细胞之间。

② 电镜下支原体有三层结构，无细胞壁，中央有电子密度大的密集颗粒或丝状的中心囊。

③ 荧光染料 Hoechst33258 可以使支原体 DNA 着色，然后用荧光显微镜观察。

④ 采用支原体肉汤培养基培养观察有无雾状沉淀，然后再用琼脂培养基分离培养观察有无“荷包蛋”菌落出现。

支原体污染是动物细胞培养重点防治对象。污染的消除可以采用抗生素、加温处理、使用支原体特异性血清等方法。支原体对青霉素有抗药性，一般采用双抗生素（例如青霉素与链霉素）。4-氟-2-羟基喹啉、戴耳素衍生物、四环素衍生物等单用或者合用对防治支原体污染比较有效。支原体耐热性差，可以采用 41℃ 高温杀灭支原体，但是也要注意防止细胞受到伤害。

(4) 病毒 病毒 (virus) 是一类个体微小、无完整细胞结构、含单一核酸 (DNA 或 RNA) 型、必须在活细胞内寄生并复制的非细胞型微生物。病毒能增殖、遗传，具有生命最基本的特征。其主要特点是：① 含有一种核酸 (DNA 或 RNA) 的基因组和蛋白质外壳，没有细胞结构；② 在感染细胞的同时或稍后释放其核酸，然后以核酸复制的方式增殖，而不是以二分裂方式增殖；③ 严格的细胞内寄生性。

病毒大小以纳米计，可以通过滤器。病毒污染检测有细胞观察、电子显微镜、免疫学及 PCR 检测等方法。要特别注意培养液等过滤除菌不完全、空气等途径引起的病毒污染。病毒污染是动物细胞大量培养生产疫苗、干扰素等生物制品时需要特别注意的。

(5) 细胞交叉污染 多种细胞同时培养、所用器皿或液体混杂等容易引起细胞交叉污染。常用细胞形态观察、检查细胞标志物等方法检测。

在进行多细胞培养时，器皿应该严格区分，在换液和传代时务必防止因细胞带出而污染其他试剂或操作环境。细胞要冻存保种，一旦污染，可以复苏使用。

网上更多学习资源……

◆ 主要设备彩图 ◆ 参考文献

第一篇

基本技术实验