



普通高等教育“十二五”规划教材



朱月春 何永蜀 主编



分子医学基础实验教程

供医学类各专业使用



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

分子医学基础实验教程

朱月春 何永蜀 主编

杨银峰 李 清 狄 勇 杨 芳 副主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

《分子医学基础实验教程》是为适应当今高等医学教育发展、高等医学教学体系改革、课程整合实践而编写。本书以构建整合型实验教学体系为目的,整合了细胞生物学、医学遗传学、生物化学及分子生物学的实验教学内容,并结合教师的科研,构建新的“四合一”实验教学体系,既克服了单门课程教材体系单一、内容相互割裂的缺陷,也有利于培养学生的综合分析能力与实践能力。本书内容新颖,体系完整,对不同层次学生的培养目标有所侧重,便于教学选择。

本书可供医学院校本(专)科及研究生实验教学使用,也可作为教师、医师和技术人员的科研参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分子医学基础实验教程 / 朱月春, 何永蜀主编. —北京: 科学出版社, 2016.11

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-050555-2

I. ①分… II. ①朱… ②何… III. ①医学-分子生物-实验-高等学校-教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 268021 号

责任编辑: 刘 畅 / 责任校对: 张怡君
责任印制: 张 伟 / 封面设计: 迷底书装

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>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本: 720 × 1000 B5

2017 年 3 月第二次印刷 印张: 9 1/2

字数: 186 200

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《分子医学基础实验教程》编委会

主 编 朱月春 何永蜀

副 主 编 杨银峰 李 清 狄 勇 杨 芳

其他编委 武 静 张 巧 李治纲 赵一卉

 张 正 梁 璇 梁蕾蕾 曹西南

 李小洁 吴艳瑞 张 璐 李思嫚

前 言

基础医学的实验教学是培养学生实践能力、观察与分析能力和科学思维的主要方式,提高实验教学质量是提升整体医学教育水平的重要途径。细胞生物学、医学遗传学、生物化学及分子生物学的实验技术是当代医学研究的重要手段和方法,已广泛渗透到临床医学的各个领域,也是医学相关专业和各层次学生的必修实验课。为了适应高等医学院校整合实验教学的改革和发展,构建多层次、多模块的分子医学实验教学体系,同时鉴于整合课程没有合适的实验教程,我们编写了本书。这是教学改革实践的要求,也是对整合课程教材建设的探索。

本书共收编了 26 个实验,包括了上述 4 门课程的常规核心技术,如细胞培养、细胞器分离与纯化、细胞骨架显示等细胞生物学技术;骨髓细胞染色体与人淋巴细胞 G 带核型分析、红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶家系分析等医学遗传学实验;也包括血红蛋白的醋酸纤维薄膜、等电聚焦与凝胶柱色谱分离、碱性磷酸酶的分离纯化及比活性测定等生物化学实验;还包括真核基因组与线粒体 DNA 提取、G6PD 基因扩增、小鼠 *PKC ϵ* 基因克隆与表达等分子生物学实验。综合性实验则是上述整合课程的实验技术及其应用,如红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定及家系分析、镰状红细胞贫血与地中海贫血的基因诊断等;而抗氧化分子清除自由基活性检测与细胞周期、细胞增殖与凋亡检测等设计性实验则结合了教师科研课题,有利于培养学生的科研思维。

本书注重上述 4 门课程的基础性实验与整合性实验相结合、实验技术与临床应用相结合、实践技能与科研素质培养相结合。各高等医学院校根据各专业各层次学生的培养目标和要求,可选择本书中不同技术、不同层次的实验项目实施教学。此外,本书可以作为广大教师、研究生、医师和技术人员科研工作的重要参考书。

由于编者水平有限,各医学院校的实验教学模式和条件存在差异,书中存在不当或错误之处,恳请同行专家和同学们批评指正,提出宝贵意见。

朱月春 何永蜀

2016 年 8 月于昆明

目 录

前言

实验一	光学显微镜的结构和使用	1
实验二	光镜下细胞基本形态结构的观察及生物绘图	6
实验三	细胞培养技术	9
实验四	细胞核与线粒体的分级分离	18
实验五	细胞内 DNA 和 RNA 及细胞骨架(微丝)观察	21
实验六	CCK-8 法检测 HepG2 细胞的增殖	25
实验七	小鼠骨髓细胞染色体标本的制作及观察	28
实验八	人外周血淋巴细胞 G 显带染色体标本制备及核型分析	32
实验九	血清蛋白的盐析及清/球比值的测定	38
实验十	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	41
实验十一	血红蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	44
实验十二	血红蛋白的等电聚焦分离及其等电点测定	47
实验十三	血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	52
实验十四	兔肝碱性磷酸酶的分离纯化及比活性测定	55
实验十五	红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定及家系分析	60
实验十六	真核细胞线粒体基因组 DNA 提取	65
实验十七	人类性别鉴定(基于 PCR、X 或 Y 染色质的方法)	68
实验十八	G6PD 基因全序列查找、引物设计及外显子 12 的扩增	76
实验十九	镰状红细胞贫血的基因诊断(RFLP 分析)	81
实验二十	地中海贫血初步筛查及缺失型 α 地贫基因诊断	84
实验二十一	抗氧化分子清除自由基活性检测	87
实验二十二	小鼠脑组织总 RNA 提取与 RT-PCR 获取真核基因片段	91
实验二十三	小鼠 PKC ϵ 基因的克隆、鉴定及其 6His 融合蛋白的大肠杆菌表达和纯化	97
实验二十四	细胞周期、细胞增殖与凋亡检测的实验设计	106
实验二十五	自毁容貌综合征诊断的实验设计	108
实验二十六	G6PD 缺乏症诊断的实验设计	110
分子医学实验报告		111

实验一 光学显微镜的结构和使用

【实验目的】

1. 掌握光学显微镜的正确使用方法。
2. 了解光学显微镜的构造、各部分性能和保护措施。

【实验原理】

显微镜(microscope)于 1590 年由荷兰的詹森父子首创,最常见的是光学显微镜(optical microscope)。光学显微镜(简称光镜)是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器,广泛应用于生物科学和医学研究领域,在细胞生物学、组织学、病理学、微生物学及其他有关学科的教学研究工作中有着极为广泛的用途,是研究人体及其他生物机体组织和细胞结构强有力的工具。

目前使用的光镜种类繁多,外形和结构差别较大,有些类型的光镜有其特殊的用途,如暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、倒置显微镜等,但其基本的构造和工作原理是相似的。普通光镜一般有直立式和倾斜式两种,其结构可分为机械、照明和光学三部分。

光镜是如何使微小物体放大的呢?物镜和目镜的结构虽然比较复杂,但它们的作用都相当于一个凸透镜,由于被检标本是放在物镜下方 1~2 倍焦距之间的,上方形成一倒立的放大实像,该实像正好位于目镜的下焦点(焦平面)之内,目镜进一步将它放大成一个虚像,通过调焦可使虚像落在眼睛的明视距离处,在视网膜上形成一个直立的实像。

【实验器材与试剂】

普通光学显微镜、擦镜纸、香柏油或液体石蜡(石蜡油)、二甲苯。

【实验步骤】

一、光学显微镜的基本构造及功能

(一) 机械部分

1. 镜座(base) 是显微镜的基座,用以支撑和稳定镜体。
2. 镜柱(pillar) 与镜座和镜臂相连的短柱结构。
3. 镜臂(arm) 为支持镜筒和镜台的弯曲状构造,是取用显微镜时握拿的部位。

镜筒直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节,可使镜筒向后倾斜一

定角度以方便观察,但使用时倾斜角度不应超过 45° ,否则显微镜会由于重心偏移容易翻倒。在使用临时装片时,千万不要倾斜镜臂,以免液体或染液流出,污染显微镜。

4. 镜筒(body tube) 位于镜臂上方的圆筒,上端装有目镜,下端连接物镜转换器。镜筒分单筒式和双筒式两种。

5. 物镜转换器(revolving nosepiece) 又称物镜转换盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状构造,可以按顺时针或逆时针方向自由旋转。其上均匀分布有 3~4 个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。换用物镜时,可转动物镜转换器,但注意一定要将物镜转换器边缘上的缺刻和基座上的“T”形卡相扣合,使物镜与光轴合轴,否则无法观察标本。

6. 载物台(stage) 位于镜臂前方的方形平台,用以放置玻片标本。载物台中央有一通光孔,两侧有一对压片夹,用来固定标本。有的显微镜装有推片器,既可固定标本,又可前后左右移动。推片器上有纵横游标尺,可利用游标尺上的刻度作为标记,以便寻找物像。

7. 调焦器(adjustment knob) 位于镜柱下方,能调节焦距,呈同心圆排列,有大小两种螺旋。大螺旋(粗调焦器, coarse adjustment)可使载物台作较大距离和较快速度的升降,适于低倍镜对焦;小螺旋(细调焦器, fine adjustment)则使载物台缓慢升降,用作较精细的调节,适于高倍镜和油镜的对焦。

(二) 照明部分

1. 光源(light source) 显微镜有不带光源和自带光源两类。前者利用自然光源或人工光源照明;后者为电光源照明。电光源灯一般装在镜座里或镜座后的灯壳中,可以使用镜座后侧面的电压调节器,调节光源强度。

2. 反光镜(mirror) 装在镜座上、镜柱的前方,可向各个方向转动,把光线反射入聚光镜。反光镜一面是凹面镜,一面是平面镜。凹面镜有聚光作用,适用于较弱光和散射光;平面镜只有反射作用,一般用于较强光线和固定光源。有时使用平面镜,在视野内会出现窗外景物或窗框,这时下降聚光镜或改用凹面镜就可以消除之。

3. 聚光镜(condenser) 又名聚光器,位于载物台通光孔下方,由一组透镜组成,可使反光镜反射来的光线集中于标本上。其侧面有一聚光镜螺旋,调节时可升降聚光镜。聚光镜上升,光线增强;聚光镜下降,光线减弱。

4. 光圈(diaphragm) 又叫虹彩光圈或光阑,位于聚光镜下方,由许多金属薄片组成。侧面有一光阑小柄,拨动它可使光圈扩大或缩小,以调节进光量。

(三) 光学部分

1. 目镜(eye piece) 短筒状,插入镜筒上端。上面刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等符号,

表示其放大倍数,通常目镜越长,放大倍数越小。目镜筒内有一指针,用以指明视野中观察物像的位置,以利示范和提问。

2. 物镜(objective) 装在物镜转换器上,物镜越长,放大倍数越高。依放大倍数不同,物镜分为低倍镜、高倍镜和油镜。低倍镜短细,镜孔直径最大,放大倍数为 $8\times$ 或 $10\times$; 高倍镜较长,镜孔直径较小,放大倍数为 $40\times$ 、 $45\times$ 或 $60\times$; 油镜最长(有的也较短),镜孔直径最小,放大倍数为 $90\times$ 或 $100\times$ 。

通常在物镜上刻有相应的标记。例如,在 10 倍的物镜上刻有: 10/0.25 和 160/0.17。10 为物镜放大倍数; 0.25 为镜口率(或 NA 0.25); 160 为镜筒长度, 0.17 为盖玻片厚度,二者单位均为毫米。

镜口率又称数值孔径(numerical aperture, 简写为 NA), 可以反映物镜分辨力的大小, 数字越大, 表示分辨力越高。一般 $10\times$ 物镜的 NA 为 0.25, $40\times$ 物镜的 NA 为 0.65, $100\times$ 物镜的 NA 为 1.25 等。

显微镜的总放大倍数 = 物镜放大倍数 $\times$ 目镜放大倍数。

二、光学显微镜的使用方法

(一) 准备

将显微镜小心地从镜箱中取出(移动显微镜时应以右手握住镜臂, 左手托住镜座), 放置在实验台的偏左侧, 以镜座的后端离实验台边缘 3~4cm 为宜。首先检查显微镜的各个部件是否完整和正常。如果是镜筒直立式光镜, 可使镜筒倾斜一定角度(一般不应超过 45°) 以方便观察(观察临时装片时禁止倾斜镜臂)。

(二) 低倍镜的使用方法

1. 对光 打开实验台的工作灯, 先转动粗调焦器, 使镜筒略升高, 再转动物镜转换器, 将低倍镜对准通光孔。然后打开光圈, 上升聚光镜, 双眼同时睁开, 对准目镜观察, 反复转动反光镜, 直到视野内光线明亮均匀为止。

2. 放片 取一张玻片标本, 认清标本的位置和正反面, 正面朝上, 放在载物台上, 用压片夹或推片器固定。然后调节玻片位置, 将要观察的标本对准通光孔的中央。

3. 调焦 先从侧面注视低倍镜, 转动粗调焦器, 使低倍镜距玻片标本约 0.5cm, 然后从目镜中观察视野, 缓慢转动粗调焦器, 使载物台慢慢下降(或低倍镜慢慢上升), 直到视野中出现物像为止。然后调节细调焦器, 直到物像变清晰。

如果在调焦时, 载物台已降到最低(或镜筒已升至最高)仍未见到物像, 应先检查标本是否对准通光孔正中, 然后严格按照上述步骤重新操作。

如果光线太强或太弱, 可慢慢地调整光圈大小, 也可调整聚光镜位置, 找到最合适的光亮度。

(三) 高倍镜的使用方法

1. 低倍镜下找到物像后, 将要放大观察的部分移至视野中央, 调节清晰, 并

保持焦距不变。

2. 从侧面注视物镜, 转动物镜转换器, 将高倍镜对准通光孔。

3. 双眼注视目镜, 慢慢来回转动细调焦器, 直到在视野中见到清晰的物像。

如果按上述操作看不到物像, 可能的原因有: 目的物不在视野中; 低倍镜的焦距没调好; 标本放反; 物镜松动或有污物等。

(四) 油镜的使用方法

1. 用高倍镜找到需观察的标本物像, 将需要进一步放大的部分移至视野中央, 并调节清晰保持焦距不变。

2. 光圈开到最大, 聚光镜升到最高(因油镜所需光线较强)。

3. 旋转物镜转换器, 将高倍镜转开。眼睛注视侧面, 在标本上滴一滴香柏油, 转换油镜, 使油镜镜头与香柏油接触。

4. 双眼注视目镜, 慢慢来回转动细调焦器, 直至出现清晰的物像。

油镜使用完毕, 必须及时把镜头和标本上的香柏油擦干净。先用擦镜纸将油擦去, 然后用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭, 最后再用干净的擦镜纸擦一遍。无盖玻片的标本不能擦, 以免损坏标本, 可用吸水纸尽量将香柏油吸干。

【注意事项】

1. 取送显微镜时, 必须右手握住镜臂, 左手托住镜座, 轻拿轻放。不要用单手提拿, 以避免目镜或其他零部件滑落。

2. 显微镜的使用, 一定要按实验指导中写的方法和步骤认真、仔细去做, 不然既容易损坏标本和镜头, 又达不到看清物像的目的。

3. 在使用镜筒直立式显微镜时, 镜筒倾斜的角度不能超过 45° , 以免重心后移使显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时, 不要使用倾斜关节, 以避免由于载物台的倾斜而使液体流到显微镜上。

4. 不可随意拆卸显微镜上的零部件, 以免发生丢失损坏或使灰尘落入镜内。

5. 显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指揩擦, 以免磨损镜面, 需要时只能用擦镜纸轻轻擦拭。机械部分可用纱布等擦拭。

6. 显微镜使用完后应及时复原。先升高镜筒(或下降载物台), 取下玻片标本, 使物镜转离通光孔。如镜筒、载物台是倾斜的, 应恢复直立或水平状态。然后下降镜筒(或上升载物台), 使物镜与载物台相接近。垂直反光镜, 下降聚光器, 关小光圈, 最后放回镜箱中锁好。

7. 使用显微镜时, 一定要按照先低倍镜、后高倍镜、再油镜的顺序。在高倍镜和油镜下一定不能转动粗调焦器; 即使转动细调焦器, 也不能朝一个方向过度旋转。

8. 在利用显微镜观察标本时,要养成两眼同时睁开、双手并用(左手操纵调焦螺旋,右手操纵标本移动器)的习惯,必要时应一边观察一边计数或绘图记录。

【思考题】

1. 使用显微镜观察标本时,为什么必须按从低倍镜到高倍镜,再到油镜的顺序进行?
2. 如何调节视野内的光线强度?
3. 如果标本片放反了,可用高倍镜或油镜找到标本吗?为什么?
4. 在高倍镜下,未看到物像,可能有哪些原因?应该怎样解决?
5. 怎样区分低倍镜、高倍镜和油镜?如不注意区分,错用物镜可能造成什么后果?

(李 清)

实验二 光镜下细胞基本形态结构的观察及生物绘图

【实验目的】

1. 进一步熟悉显微镜的正确使用方法，并学会生物绘图。
2. 了解细胞的基本形态结构和多样性，以及光镜下的一些细胞器。
3. 了解临时制片的方法。

【实验原理】

细胞是生物体形态结构和生命活动的基本单位。细胞体形极微，在显微镜下才能看见，形状多种多样，有圆形、椭圆形、柱形、方形、多角形、扁形、梭形，甚至不定形。一般认为，细胞是由膜包围的原生质(protoplasm)，通过质膜与周围环境进行物质和信息交流；是构成有机体的基本单位，具有自我复制的能力，是有机体生长发育的基础；是代谢与功能的基本单位，具有一套完整的代谢和调节体系；是遗传的基本单位，具有发育的全能性。

【实验器材与试剂】

1. 实验器材 显微镜、载玻片、擦镜纸等。
2. 标本片 血涂片、精子、单层柱状上皮、骨骼肌、平滑肌、神经细胞(尼氏体)、高尔基体、线粒体。

【实验步骤】

一、光镜下各种细胞及细胞器的观察

1. 人血涂片的观察 视野中数量最多的是红细胞，中间薄而宽，边缘微暗，呈两面凹的圆饼状，没有细胞核。白细胞的数量比红细胞少，体积比红细胞大，有细胞核。

2. 单层柱状上皮细胞的观察 低倍镜下可见到小肠的腔面有许多高矮不一的指状突起，这些突起是小肠绒毛的纵断面。其表面覆盖着一层柱状上皮，选择一部分排列整齐的柱状上皮细胞，换高倍镜观察。在高倍镜下，柱状上皮细胞排列紧密，细胞的高度大于宽度，细胞界限不太清晰。细胞核呈椭圆形，位于细胞的基部。

3. 精子涂片的观察 精子在低倍镜下如“蝌蚪状”结构。换高倍镜可见前端膨大如锥形(侧面观)或椭圆形(正面观)的头部,细胞核位于其中,几乎见不到细胞质。其后有一细长的精子尾部,与其运动有关。

4. 骨骼肌标本片的观察 低倍镜下可见肌纤维横切呈多边形或不规则圆形,肌纤维纵切呈细长的圆柱状,有不明显的明暗相间横纹,细胞核数量多,呈扁椭圆形,位于肌膜的深面。高倍镜下肌纤维横切呈多边形或不规则圆形,边缘为肌膜,核呈椭圆形,位于细胞周缘,肌纤维纵切可见明暗相间的横纹。

5. 平滑肌标本片的观察 低倍镜下可见肌细胞为梭形,细胞内只有一个细胞核,位于细胞中央。

6. 神经细胞(尼氏体)的观察 低倍镜下可见零散分布、带突起的神经细胞。神经细胞有很多突起,但由于切片关系,只能看到其中的数个突起。胞质内有深染的块状或颗粒状物质,称尼氏体,在电镜下为粗面内质网。胞核着色较淡,多位于细胞中央,内含少量染色质,核膜明显,有一个大而圆的核仁。

7. 高尔基体的观察 在细胞核周围的细胞质中,有深染呈弯曲的线状、粒状和网状的结构,即高尔基复合体。

8. 线粒体的观察 细胞质中有许多颗粒状、棒状或线条状结构,即为线粒体。

二、生物绘图

(一) 生物绘图的要求

1. 具有高度的科学性,不得有科学性错误。形态结构要准确,比例要正确,要求真实感、立体感,精确而美观。

2. 图面要力求整洁,铅笔要保持尖锐,尽量少用橡皮。

3. 绘图大小要适宜,位置略偏左,右边留着注图。

4. 绘图的线条要光滑、匀称,点点要大小一致。

5. 绘图要完善,字体用正楷,大小要均匀,不能潦草。注图线用直尺画出,间隔要均匀,且一般多向右边引出,图注部分接近时可用折线,但注图线之间不能交叉,图注要尽量排列整齐。

6. 绘图完成后在绘图纸上方要写明实验名称、班级、姓名、时间,在图的下方注明图名及放大倍数。

(二) 生物绘图的方法

生物绘图的方法有多种,最常见的是点点衬阴法和线条衬阴法。点点衬阴法即将图形画出后,用铅笔点出圆点,以表示明暗和深浅,给予立体感。点在暗处要密、明处要疏,但要求点要均匀,点点要从明处点起,一行行交互着点,物体上的斑纹描出再点点衬阴。线条衬阴法又称涂抹阴影法,是依靠线条的疏密来表示阴暗和深浅。点点衬阴法要求不能用涂抹阴影的方法代替点点。

(三) 生物绘图的步骤

1. 绘图前认真观察标本，搞清实物标本的结构特点，切忌抄书或凭空想象。
2. 用 HB 铅笔轻轻将图轮廓画出，作为草图要掌握好比例和位置。
3. 在草图的基础上绘详图，此时要用 2H 和 3H 铅笔，线条要流畅，点要匀称，点线不要重复描绘。
4. 按注图要求绘图，写上图名及班级、姓名和放大倍数等。

【注意事项】

1. 注意强调显微镜使用过程中的保护措施。
2. 观察中除了对细胞基本形态结构的观察外，还要注意不同材料在制作标本时的不同特点。

【思考题】

按生物绘图的要求准确绘出神经细胞形态并标注其基本结构。

(李 清)

实验三 细胞培养技术

一、细胞的原代培养

【实验目的】

1. 初步掌握细胞培养的无菌操作技术。
2. 了解原代细胞培养的一般方法和步骤。

【实验原理】

细胞培养(cell culture)是指从生物体内取出组织或细胞,在体外模拟体内生理环境,在无菌、适当温度和一定培养条件下,使之生存、生长和繁殖,并维持其结构和功能的方法。由于体外培养的细胞在一定程度上保存着与体内细胞相同的基本结构和功能,便于使用各种技术和方法进行研究,并能在较长时间内直接观察细胞生长、发育、分化过程中的形态和功能变化,而且可同时提供大量生物学性状相似的细胞作为研究对象,因此,细胞培养已经成为现代医学研究中一项非常重要的技术。

细胞培养可分为原代培养和传代培养。原代培养(primary culture)是从供体取得组织或细胞后培养成功进行首次传代之前的培养,当培养的细胞增殖达到一定密度后,需要分瓶培养,即将培养的细胞分散后,从一个容器以一定比例转移到其他容器进行扩大培养,此过程称为传代培养(passage culture),传代的累积次数就是细胞的代数。

原代细胞是获得细胞、建立各种细胞系的第一步。原代培养的方法很多,最基本的有两种,即组织块培养法(explant culture)和单层细胞培养法(monolayer culture)。组织块培养法是常用的、简便易行的原代细胞培养方法。将组织块切割成 $0.5\sim 1\text{mm}^3$ 的小块后,直接贴附于瓶壁上,然后组织块边缘向外长出生长晕,最后联结成片形成单层细胞。单层细胞培养法用胰酶消化组织中的纤维、基质等细胞间质,使组织松散,分离成单个细胞或较小细胞团,使之易于生长。

【实验器材与试剂】

1. 材料 新生小鼠(出生 2~3 天)。

2. 试剂 DMEM、0.25%胰蛋白酶、小牛血清、PBS、双抗、75%乙醇、Hank's 液。

3. 器材 移液管、培养瓶、培养皿、解剖剪、解剖镊、眼科剪、眼科镊、离心管、微量加样器、吸管、吸头、血细胞计数板、酒精灯、无菌服、口罩、帽子、棉球等。CO₂ 培养箱、超净工作台、电冰箱、离心机、倒置相差显微镜、普通光学显微镜。

【实验步骤】

(一) 组织块培养法

1. 动物处死 取出生 2~3 天的小鼠一只, 颈椎脱臼法处死。浸入盛有 75% 乙醇的烧杯中 2~3s, 取出后放在大平皿中携入超净工作台。

2. 取材 用碘酒和 75%乙醇再次消毒, 打开消毒器械包, 用解剖剪剪开腹腔, 取出乳鼠的肾脏放入无菌培养皿中, 用 Hank's 液冲洗, 去除血污。移入干净的培养皿中, 用眼科剪剪成 0.5~1mm³ 的小块, 再吸入 0.5ml DMEM 细胞培养液, 轻轻吹打, 使组织块悬浮在培养液中。

3. 接种 用吸管吸取组织块悬液(注意组织块应吸在吸管端部, 以免吸得过高, 粘在吸管壁上而丢失), 将组织块均匀排在培养瓶底壁上, 翻转培养瓶, 加入 3ml 培养液, 盖上瓶塞, 倒置于 37℃ 恒温培养 2~3h 后, 待组织块略干燥能牢固贴于瓶底上, 再缓慢地翻转培养瓶, 使培养液浸泡组织块, 继续静置培养(将培养瓶盖拧一圈, 使得培养瓶适量通气; 如培养瓶盖带有滤芯, 则不需要回拧)。

4. 观察 每天轻轻取出培养瓶置于倒置相差显微镜下进行观察。观察有无污染(若有细菌污染, 培养液 pH 降低, 迅速变黄, 并出现混浊), 已贴壁的组织块边缘有无细胞“长”出。

培养 24h 后, 可观察到组织块周围开始有少量细胞。一般最先长出形态不规则的游走细胞, 接着长出成纤维细胞或上皮细胞, 随着细胞的生长, 组织块周围形成较大的生长量, 以后细胞生长加快, 呈放射状向外扩展逐渐连成一片(图 3-1)。当细胞从组织块游出数量增多时, 应根据培养液颜色(细胞代谢产物积累、CO₂ 增多, 培养液逐渐变酸呈黄色, 但液体仍澄清), 补加或更换培养液。培养液表面如有漂浮的组织块, 要及时吸弃。细胞生长良好时, 10~15 天可长成致密单层, 需传代培养。

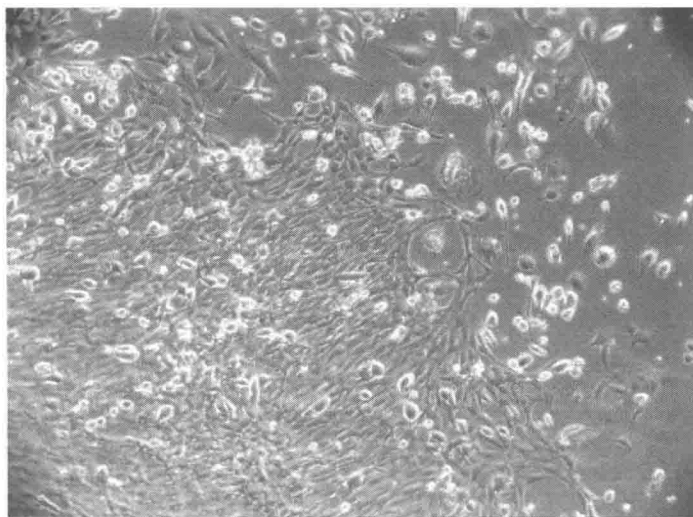


图 3-1 组织块周围细胞呈放射状向外扩展

(二) 单层细胞培养法

1. 动物处死 取出生 2~3 天的老鼠一只，颈椎脱臼法处死。浸入盛有 75% 乙醇的烧杯中 2~3s，取出后放在大平皿中携入超净工作台。

2. 取材 用碘酒和 75% 乙醇再次消毒，打开消毒器械包，用解剖剪剪开腹腔，取出乳鼠的肾脏放入无菌的培养皿中，用 Hank's 液冲洗，去除血污，移入干净的平皿中。

3. 消化 用眼科剪把组织块剪成 1mm^3 的小块，再用 Hank's 液洗涤 2~3 次。把小组织块移入离心管，加入 5~10 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶，盖好橡皮塞，置 37°C 水浴中消化 20~30min，每隔 5min 摇动一次。待组织块变得疏松、颜色略变白时，从水浴中取出带进超净台内。用吸管反复吹打，尽量使组织块分散成细胞团或单细胞，加入 2ml 培养液(培养液中的血清可以终止胰蛋白酶的消化作用)。静置片刻，待未被消化完的组织块下沉后，将上层细胞悬液移入另一支无菌离心管中备用。

4. 离心和计数 离心管平衡后，以 1000r/min 离心 5min，弃上清液，加入 2ml 培养液，用移液管轻轻吹打混匀后取样计数。根据计数结果用培养液调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml 细胞悬液。

5. 接种培养 每 25cm^3 培养瓶接种 2ml 细胞悬液，再添加 4ml 培养液，轻轻混匀后盖上瓶盖，注明细胞名称、日期等，置 CO_2 培养箱， 37°C 恒温培养(将培养瓶盖盖子回拧一圈，使得培养瓶适量通气；如培养瓶盖带有滤芯，则不需要回拧)。