

现代实验血液学 研究方法与技术

主编

郑德先 吴克复 褚建新

北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

现代实验血液学研究 方法与技术

郑德先 吴克复 褚建新 主编

编者名单 (按姓氏笔画为序)

王学琦	王海青	冯宝章	朱立平	朱明娟
刘杰文	齐淑玲	刘德培	杨少光	杨纯正
宋玉华	吴克复	张君奎	金永娟	法祥光
郑德先	姜学英	赵桐茂	韩敬淑	褚建新
蔡英林	蔡辉国			

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代实验血液学研究方法与技术/郑德先等主编. —北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999

ISBN 7-81034-893-0

I. 现… II. 郑… III. 实验医学: 血液学 IV. R331.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 28876 号

现代实验血液学研究方法与技术

主 编: 郑德先 吴克复 褚建新

责任编辑: 谢 阳

封面设计: 孙元明

技术设计: 栾广明

责任校对: 李爱萍

责任印制: 姜文祥

出版发行: 北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65228583)

经 销: 新华书店总店北京发行所

印 刷: 北京迪鑫印刷厂

开 本: 787×1092 毫米 1/16

印 张: 35.5

字 数: 883 千字

版 次: 1999 年 4 月第一版 1999 年 4 月北京第一次印刷

印 数: 1—3000

定 价: 76.00 元

ISBN 7-81034-893-0/R·891

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其它质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书为国内第一部较为齐全的有关实验血液学研究方法与技术的参考书，编者为国内相关领域卓有成就的专家教授。全书共 20 章，对实验血液学研究涉及的分子生物学、细胞生物学、生物化学、生物物理学、生理学、病理学、遗传学、免疫学等多学科的实验方法与技术进行了详尽的论述。本书不仅介绍了各种实验的原理、操作步骤及结果分析，还指出了应注意的技术关键，具有极高的科学性和实用性。适合于从事血液学研究的科研人员、研究生、大专院校师生以及医院的医师和检验人员参考。

序 言

实验血液学最初是由于临床血液病和放射病研究的发展，需要深入研究各类血液病和放射病的发生机理以及正常造血、止血、溶栓的生理，于是，在“实验血液学之父” Eugene Cronkite 等积极创导和带动下，各国生物医学领域的许多基础学科参与下，在世界范围开展基础血液学的研究，至 70 年代形成为一门有众多学科融合的“实验血液学”独立学科。国际实验血液学会和 Experimental Hematology 杂志应运而生。由于“文化大革命”的灾难，我国到 80 年代才产生实验血液学的全国性学术活动和学会。80 年代，分子生物学从国外涌进了我国基础医学领域。从此，我国实验血液学由细胞水平扩展到细胞、分子水平相结合的崭新的领域。近 10 年来，实验血液学研究汇合了更多的新学科和专业，除了现代细胞生物学和分子生物学基础外，分子免疫学、分子遗传学、分子病毒学、分子肿瘤学等新基础学科以及相关的新技术的大量渗入，使实验血液学更加生机盎然，蓬勃发展。这也显示了学科交叉推动科学发展的优势。近年来，实验血液学领域中，造血干细胞生物学研究的发展，使干细胞成为一种理想的体内长期表达目的基因的宿主细胞的研究可能获得成功，将有力地使基因治疗的基础研究推向一个新阶段，使有治疗效用的目的基因在病人体内永恒表达将成为可能。干细胞移植的治疗范围也因而扩大了。这可能是实验血液学在下一世纪重要贡献之一。

21 世纪由于我国临床血液学医生们科研素质的不断提高，和发达国家一样，其中必然会有更多的高、中级医生在完成临床工作的同时，踊跃地兼作某些实验血液学的基础研究。到那时，我国的实验血液学和临床血液学将空前地密切结合，互相促进，更多的方面将达到世界先进甚至领先的水平。

本书出现于世纪之交。它反映了我国现代实验血液学的发展。它将指导我国高、中级实验血液学工作者进行实验设计；对广大从事实验血液学研究的科技人员，它可作为一本实验操作的规范和标准。为此，我由衷地感谢本书的主编以及作者们对促进我国实验血液学发展所做出的贡献。

本书出版后，今后每隔几年应该进行必要的修改、补充和再版，不断地吸收当代实验血液学最新的成就，介绍最新的实验技术，同时删去一些相对陈旧而不适用的部分。这是我和广大读者们对本书的衷心愿望。

唐佩弦

前 言

70年代以来,实验血液学(experimental hematology)得到了迅速发展,特别是近十多年来,实验血液学越来越多地吸收细胞生物学和分子生物学的方法和概念,与发育生物学,分子胚胎学等基础学科有了更多的交叉和渗透。同时,由于骨髓以及造血干细胞移植的应用与推广,吸引了更多的临床血液学和其他学科研究工作者对实验血液学的关注和兴趣。实验血液学除了“造血和造血调控”这个血液学的核心理论课题外,更关注于血液病的病因、发病学和实验治疗研究,使这一研究领域不断形成新课题,获得新成果,生机盎然。

我国实验血液学的研究有了很大的进展,取得了不少引人瞩目的成果,科技队伍不断扩大,并已出版了中国《实验血液学杂志》。1988年经国家批准,在中国医学科学院血液学研究所建立了实验血液学国家重点实验室。本书以实验血液学国家重点实验室的专家为主体,并邀请了血液学研究所和其他单位的有关专家,共同编撰了《现代实验血液学研究方法与技术》,可以说本书是国内第一部有关实验血液学研究的方法和技术的参考书,可供国内从事血液学研究的科研人员、研究生、大专院校教师和学生、以及医院的医师和检验人员参考。

本书共20章,涉及学科较广,包括细胞生物学、分子生物学、生物化学、生物物理学、生理学、病理学、遗传学以及免疫学等不同学科的方法和技术。多数是已应用多年的较成熟的方法,作者介绍了它们的原理、操作步骤及结果分析,并指出应注意的技术关键,包含了作者实验室的多年工作经验。读者只要按其叙述,认真操作,即可获得满意的实验结果。实验血液学是医学生物学中迅速发展的学科,新方法、新技术,日新月异,层出不穷,因此,本书还介绍了近年来建立不久的新方法,少数则是正在建立中的方法。这些方法是作者根据文献资料、个人的实践经验和体会而设计的,可供读者在研究中参考。根据编者的经验,这类方法的介绍不仅可以减少读者查阅文献的时间和精力,也可少走弯路。如果读者在本书介绍的方法基础上,根据实验原理、实验条件和实验要求,能建立适合实际需要的方法,则本书的目的就算达到了。

承蒙我国著名实验血液学专家、中国病理生理学会实验血液学专业委员会副主任、中国实验血液学杂志主编、中国军事医学科学院唐佩弦教授在百忙之中为本书作序。在此谨表衷心的感谢。

由于本书专业跨度大,涉及学科多,尽管在编撰时由三位不同专业的主编对全书进行了编辑,但限于知识和编辑水平,错误和不妥之处难免,恳请广大读者指正。

编 者

目 录

第一章 造血细胞的体外培养	(1)
第一节 概述.....	(1)
第二节 血细胞分离方法.....	(5)
第三节 骨髓基质细胞培养.....	(24)
第四节 造血细胞集落培养和测定.....	(36)
第五节 造血细胞系的建立和应用.....	(59)
第六节 造血细胞的无血清培养.....	(74)
第七节 杂交瘤单克隆抗体的制备技术.....	(82)
第二章 造血细胞的大量培养	(92)
第一节 液体悬浮培养技术.....	(93)
第二节 灌注式细胞培养技术与无菌连接器.....	(98)
第三节 微载体——微囊培养技术.....	(102)
第四节 大载体生物反应器.....	(106)
第三章 造血细胞的细胞化学分析	(114)
第一节 造血细胞的基础细胞化学分析.....	(114)
第二节 造血细胞的免疫细胞化学分析.....	(126)
第三节 造血细胞的核酸分子原位杂交分析.....	(132)
第四章 造血细胞超微结构的研究技术	(160)
第一节 透射电子显微镜超薄切片的制备.....	(160)
第二节 电子显微镜免疫细胞化学技术.....	(168)
第三节 电子显微镜细胞化学技术.....	(175)
第四节 扫描电子显微镜标本制作技术.....	(178)
第五节 扫描电子显微镜表面分子标记术.....	(180)
第六节 电镜放射自显影技术.....	(182)
第七节 冷冻蚀刻技术.....	(183)
第八节 电镜生物样品的负染色技术.....	(184)
第五章 血液系统中细胞凋亡的研究方法	(186)
第一节 细胞凋亡的概念及形态学特点.....	(186)
第二节 细胞凋亡的生理意义.....	(188)
第三节 血液系统中的细胞凋亡.....	(189)
第四节 细胞凋亡的形态学研究方法.....	(199)
第五节 细胞凋亡的生物化学研究方法.....	(203)
第六节 细胞凋亡的免疫化学分析方法.....	(210)
第七节 细胞凋亡的分子生物学研究方法.....	(212)

第六章 血液流变学研究方法及其应用	(222)
第一节 概述	(222)
第二节 血液粘度测量方法	(223)
第三节 血浆粘度的测量	(225)
第四节 血液粘弹性检测方法	(227)
第五节 红细胞聚集性检测方法	(231)
第六节 红细胞变形性检测方法	(233)
第七节 白细胞流变性研究技术	(237)
第七章 血液动力学研究方法及其应用	(241)
第一节 血液动力学基本概念	(241)
第二节 光电容积描记法测定外周血循环	(242)
第三节 阻抗容积描记法测定心脏血液动力学	(244)
第四节 深静脉血栓的无创性测定	(247)
第五节 放射性核素测定肢体深静脉血栓形成	(249)
第六节 多普勒超声血流测定人体动、静脉血流动力学	(250)
第七节 多普勒超声血流测定在急慢性动物实验中应用	(252)
第八节 Swan - Ganz 导管法	(254)
第九节 电磁流量计法测定人体及动物血液动力学	(257)
第十节 放射性微球法测定心脏及组织血流量	(258)
第十一节 ^{86}Rb 测定心肌营养性血流量	(260)
第八章 免疫细胞表面标志的研究方法及检测技术	(263)
第一节 免疫细胞的表面标志	(263)
第二节 免疫荧光技术	(264)
第三节 免疫细胞化学方法检测免疫细胞表面标志	(276)
第九章 放射性核素及示踪技术在血液学研究中的应用	(278)
第一节 放射性标记化合物	(278)
第二节 放射性标记化合物在血液学研究中的应用	(279)
第三节 放射性核素标记细胞及应用	(286)
第四节 放射性核素标记核酸及示踪应用	(290)
第五节 放射自显影和细胞动力学研究技术	(298)
第十章 血细胞抗氧化酶和自由基检测技术	(303)
第一节 超氧化物歧化酶活力测定	(303)
第二节 谷胱甘肽过氧化物歧化酶	(304)
第三节 过氧化氢酶活力测定	(305)
第四节 超氧阴离子自由基测定	(306)
第五节 测量自由基的电子自旋共振技术	(307)
第六节 一氧化氮浓度测定	(308)
第七节 一氧化氮合成酶活性测定	(309)
第八节 一氧化氮和过氧化亚硝酸离子的合成	(310)

第九节	脂质过氧化物测定·····	(311)
第十一章	白细胞质膜和胞质体的分离制备及标志酶测定·····	(313)
第一节	中性粒细胞分离·····	(313)
第二节	白细胞质膜制备·····	(315)
第三节	中性粒细胞胞质体制备·····	(317)
第四节	中性粒细胞质膜标志酶测定·····	(319)
第五节	可溶性刺激物制备·····	(324)
第十二章	蛋白质分离和纯化技术·····	(326)
第一节	蛋白质纯化工作的一般策略·····	(326)
第二节	聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(327)
第三节	离子交换层析·····	(333)
第四节	疏水作用层析·····	(337)
第五节	聚焦层析·····	(338)
第六节	凝胶过滤层析·····	(340)
第七节	亲和层析·····	(342)
第八节	制备电泳·····	(345)
第九节	蛋白质溶液的浓缩·····	(347)
第十节	蛋白质纯度分析·····	(349)
第十一节	蛋白质定量分析·····	(350)
第十三章	分子生物学基础实验技术·····	(353)
第一节	基因组 DNA 提取 ·····	(353)
第二节	细菌质粒 DNA 提取 ·····	(356)
第三节	RNA 提取 ·····	(359)
第四节	DNA 凝胶电泳 ·····	(364)
第五节	噬菌体展示技术·····	(367)
第六节	其他常用实验技术·····	(368)
第十四章	血型基因分型技术·····	(372)
第一节	分子生物学技术基础·····	(372)
第二节	红细胞血型基因分型·····	(378)
第三节	血小板血型基因分型·····	(381)
第四节	粒细胞血型基因分型·····	(382)
第五节	免疫球蛋白 Gm 基因分型 ·····	(383)
第十五章	HLA 分子生物学研究技术 ·····	(385)
第一节	HLA 基因和 HLA 抗原 ·····	(385)
第二节	HLA 血清学分型 ·····	(389)
第三节	HLA 基因分型 ·····	(392)
第四节	PCR - SSOP 分型技术 ·····	(395)
第五节	PCR - SSP 分型技术 ·····	(400)
第十六章	基因突变检测和 DNA 多态性分析 ·····	(409)

第一节	PCR 基本方法	(409)
第二节	等位基因特异性寡聚核苷酸探针杂交法	(415)
第三节	限制性内切酶长度多态性分析	(416)
第四节	单链 DNA 构象多态性分析	(418)
第五节	变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳	(420)
第六节	PCR 直接测序	(421)
第七节	双脱氧指纹图谱法	(424)
第十七章	基因转移技术	(426)
第一节	基因转染哺乳动物细胞技术	(426)
第二节	基因转化大肠杆菌技术	(430)
第三节	转基因动物	(432)
第十八章	肿瘤细胞耐药表型及耐药基因表达调控研究技术	(455)
第一节	肿瘤细胞耐药表型和机制	(455)
第二节	肿瘤耐药细胞株的建立及鉴定	(460)
第三节	多药耐药基因及表达产物的测定	(464)
第四节	寻找肿瘤耐药性逆转剂方法	(480)
第五节	逆转录病毒介导的人类多药耐药基因 (mdrl) cDNA 转染和表达实验研究	(488)
第十九章	实验白血病研究技术	(499)
第一节	引言	(499)
第二节	动物白血病诱发方法	(499)
第三节	免疫缺陷小鼠在人白血病研究中的应用	(503)
第四节	微量残留白血病实验研究技术	(508)
第五节	特异性标记基因 (Lac-Z) 转染在白血病研究中的应用	(513)
第六节	转基因动物在白血病研究中的应用	(516)
第二十章	恶性血液病及相关肿瘤检测的遗传学技术	(524)
第一节	绪论	(524)
第二节	家族性白血病的早期发现和基因诊断	(525)
第三节	散发性白血病的早期发现和基因诊断	(532)
第四节	骨髓增生异常综合征 (MDS) 的细胞遗传学和基因诊断	(535)
第五节	大鼠 MDS 基因治疗	(544)
第六节	恶性白血病共同遗传背景和遗传咨询	(547)

第一章 造血细胞的体外培养

第一节 概 述

细胞培养就是将细胞放在模拟体内环境的条件下进行人工养殖,是人类对动、植物养殖的深入和发展,是现代医学、生物学实验研究的实验模型,也是生物工程产业的基础,有重要的理论意义和越来越大的实用价值,正在迅速发展和逐步完善。

对组织和细胞培养技术的探索早在本世纪初即有报道,真正应用和发展则是后半世纪的事。不同细胞培养技术的难度不同,成纤维细胞是最容易培养的细胞,60年代初就建立具有正常细胞性质的人二倍体细胞株,推动了细胞培养技术的发展。不久建立了一批类淋巴母细胞样细胞系(lymphoblastoid cell line, LCL),同时建立了造血前体细胞集落培养方法和正常骨髓细胞在饲养层细胞共同培养下的长期培养,形成了造血细胞体外培养的主要方法体系。随着细胞培养器材和试剂生产的迅速发展,细胞培养技术在各学科很快普及,并向生物技术应用发展,出现了转瓶培养、发酵罐、微载体、中孔纤维培养等大规模细胞培养的新技术。本章侧重讨论造血细胞培养的研究技术。第二章讨论造血细胞的大量培养技术。

一、造血细胞体外培养方法的类别、特点和应用

在运用小鼠进行造血调控研究时,曾用脾集落形成试验和腹腔扩散盒培养造血细胞,即利用经大剂量电离辐射处理后的小鼠提供培养条件,将研究的造血细胞进行体内培养,现已很少采用,普遍应用的还是体外培养法,因为体外培养法实验条件更为恒定,便于分析。由于实验目的和培养细胞的不同,造血细胞体外培养的方法众多。究竟采用何种方法依培养细胞的性质和实验目的而定。

血细胞来自具有高度自我更新能力和分化潜能的造血干细胞,在不同造血调节因子作用下,经多步定向分化而成。与其他体细胞相比,成熟血细胞的存活期短,处于不断的更新之中。由于成熟血细胞丧失了增殖能力,只能在体外作短期液体培养,一般不超过5天。淋巴细胞在丝裂素作用下淋巴母细胞化,可又出现细胞分裂,可用于染色体检查和一些免疫学试验(参看第二十章遗传学技术)。

造血前体细胞的体外培养有两大类,长期液体培养和集落培养。长期液体培养由基质细胞和造血细胞组成,作为研究造血过程的体外模型,用于研究髓系造血的Dexter培养和用于研究淋巴系造血的Whitlock-Witte培养即属于这一类,详见本章第三节。集落培养时将细胞分散成单个细胞,接种于由软琼脂或甲基纤维素作支持介质的半固体培养基中,在适宜条件下按 2^n 增殖,形成细胞丛或集落,在低倍镜下计数,一个细胞丛或集落代表一个有增殖能力的前体细胞,其标准随细胞系列而异,详见本章第四节。

恶性造血细胞的培养目前只能培养出一些在体外增殖能力强的细胞。可以用集落培养方法测定,有的可以培养成细胞系(详见本章第五节)。目前主要用于实验研究。

除了实验研究外,造血细胞的体外培养已显示出临床应用前景,有下述四方面:

(一) 干细胞移植: 随着骨髓移植疗法的成功, 脐血、外周血干细胞移植相继发展, 它们除要求严格的细胞培养技术外, 还需要细胞分离技术, 本章第二节对此进行了详述。由于脐血库的建立, 一个新的细胞工程领域正在形成。

(二) 基因治疗: 基因治疗是有潜在应用前景的重要研究领域, 对于治疗由遗传缺陷引起的疾患、甚至肿瘤, 是诱人的发展方向。靶细胞的选择和培养是基因治疗的基础之一。造血干细胞是重要的靶细胞之一。

(三) 过继性细胞免疫治疗: 如 LAK 细胞、TIL 细胞等应用成熟淋巴细胞的细胞免疫疗法至今仍在发展。由于应用于临床输注, 需要无血清培养技术。本章第六节介绍了造血细胞的无血清培养技术。

(四) 体外培养造血前体细胞, 使其扩增、分化, 生产大量的成熟血细胞供临床输血用, 目前尚属理想。但已有实验结果表明, 经培养后细胞总数能扩增 10^6 倍, 提示其具有临床应用的可能性。

二、细胞培养的基本环节

细胞培养的成败、好坏取决于诸多方面, 基本的有下述三个方面:

(一) 细胞标本的选择: 根据实验的目的, 选择适宜的培养细胞, 是取得预期结果的前提。因此, 必须认真地选择培养标本。如果所培养的细胞在标本中含量很低, 则需分离或富集, 详见本章第三节。如果用细胞系作实验模型, 则事先需对细胞系的性质有比较全面的了解。本章第五节对造血细胞系的性质作了系统介绍。读者可以根据实验需要选择细胞系, 向有关实验室引进或向细胞库购买。各国细胞库对所售细胞系的来源和性质均有介绍, 并保证其质量。由其他实验室引用的细胞系则应对其主要性质作必要的核实, 因为细胞系性质的漂变 (draft) 是普遍现象 (详见本章第五节)。

(二) 培养液 (基) 的选择和配制: 一般说, 引用或购买的细胞系应该用规定的培养液培养。自己建立细胞系或进行其他类型的造血细胞培养, 则需根据培养细胞的性质和实验要求选择培养液 (基)。培养液的主要组成有四个要素: 基础培养液、血清、添加剂和缓冲系统。这四个要素同样重要, 任一不当均可影响培养效果。

基础培养液有众多系列, 造血细胞使用较多、较早的有 RPMI 1640、Eagle、199 和 F-12 等。199 成分最多、最复杂, 近年来已很少使用。RPMI 1640 是外周血细胞和淋巴细胞系培养使用最多的基础培养液, 一般造血细胞系都能适应于 RPMI 1640 培养体系。Eagle 液是最早广泛使用的合成培养液之一, 经不同作者改良出现了大同小异的培养液, 如 Dulbecco 改良的 Eagle 培养液 (DMEM) 和 Iscove 在此基础上再改良的 IMDM 等。一般说髓系造血细胞使用 Eagle 系列较多。基础培养液 (基) 的选择各实验室不同, 有一定的经验性, 本章第六节列出了一些实验室用于不同系列造血细胞的培养液。不同公司生产的基础培养液会有微细的差别, 有时影响培养效果。购买时可查阅其产品配方。基础培养液的研制已成为细胞工程中的一个专门领域。新的培养液 (基) 不断出现 (如专为无血清培养用的, 有明确的专用性), 选择培养液 (基) 是件细致的工作, 不可忽视, 应认真参阅公司产品说明。

从经济和实用考虑, 一般实验室都购买粉末培养基。配制时必须严格掌握水的质量和过滤技术。其实随着技术的进步严格控制水的质量已不是很困难的事。除用市售纯水器外, 玻璃蒸馏水器将蒸馏水重蒸即可获得合格的实验用水, 不同的细胞对水质的要求不同。一般细胞培养用电阻 300000Ω (欧姆) 的水配制即可获得良好效果, 集落培养造血前体细胞则要求

更高纯度的水。近年来除菌过滤技术有很大提高，国外多数实验室采用一次性正压过滤器，简便、高效，但价格昂贵。我国一般实验室仍采用微孔滤膜正压过滤，由于滤膜质量不稳定，操作时尤应注意。有的厂家生产可高压灭菌的 RPMI 1640 液，另加谷氨酰胺，可省去大量过滤。

现在市售的基础培养液实际上已含有适用于一般实验所用细胞培养需要的添加剂，并已固定缓冲系统（磷酸盐、碳酸盐、二氧化碳、有的还加 HEPES 以增加缓冲容量），在常规实验中不必考虑。但是，在设计非常规性实验时必须考虑添加剂和缓冲系统是否合适。最常用的基础缓冲盐溶液是 Earle 液和 Hank 液，在它们的基础上加乳白蛋白水解液曾是大量生产疫苗的基础培养液。添加剂则根据实验需要增减，如 Hepes、碳酸氢钠等是调节 pH、缓冲容量用的；青霉素、链霉素等是防止细菌污染用的。在加减添加剂时应注意对 pH 值、渗透压等物理化学性质的影响，稍有疏忽可能造成明显的假象，影响实验结果。所以，一般将常用添加剂用量限制在一定范围内，习惯上加一定浓度的百分比，如青霉素 10000 U/ml、链霉素 10000 μ g/ml 加常用量 1% (V/V)，不得超度 2% (V/V)。

(三) 培养技术：一个操作熟练的老手和一个刚学的新手，培养同样的细胞、使用同样的培养液、器皿、材料，培养效果可以相差很大，亦即细胞培养技术有很强的经验性，甚至各人有各人的习惯、方法。无菌术是所有培养技术必须遵守的基本技术。一般操作原则应该是：操作尽量少而动作轻，尽可能减少对细胞可能引起的损伤。减少在室温下的时间。血细胞是非常脆弱的细胞，应该把它们想象成比鸡蛋还易破碎的物品。光滑的玻璃器皿对有些血细胞还是很粗糙的，有的要求将玻璃器皿硅化或全部用一次性塑料器皿。玻璃器皿的洗刷是费时费事的基本工作，发达国家由于人工昂贵，已用一次性塑料器皿取代，但有的尚不能完全取代。洗刷的疏忽，残留少量杂质或污物往往导致整个实验的失败，所以应将洗刷工作列为细胞培养的基本工作之一。

离心沉降是细胞培养操作中常用的手段，由于造血细胞脆弱，离心速度过高造成细胞挤压、破损，离心速度过低则回收率低。造血细胞适宜离心速度的幅度较窄，提醒读者在操作时注意，尤其避免离心速度忽高忽低。

广义的培养技术包括对整个实验过程的安排和对实验室的经营，如对血清的选购（对血清的讨论参看本章第六节）、培养液的保存、无菌室的维护和细胞保存（细胞保存和复苏参看本章第五节）。更具体些，甚至二氧化碳培养箱中的二氧化碳的质量也会严重影响细胞培养效果。

三、影响细胞培养的因素

细胞培养技术中的任何一个环节都能影响细胞生长和繁殖。因此，如果细胞生长不佳应该考虑每一个环节。在排除了细胞标本和取材的问题后，具体应考虑下述可能因素：

(一) 检查培养液

1. 是否丢失营养成分，是否培养液保存不善（如配制后长期保存于 4℃可引起谷氨酰胺失效），是否使用了过期的培养基等。
2. 水的纯度是否合格。
3. 缓冲容量是否够。
4. 抗生素浓度是否合适。
5. 渗透压是否合适，是否多加添加剂。

6. pH 是否合适。

(二) 检查血清

1. 血清对所培养的细胞是否合适。实验前曾否作预试验确认该批血清适用此类细胞。

2. 血清浓度是否合适。

3. 血清有无污染。除细菌外,血清往往是支原体的携带者,支原体污染的常见表现就是细胞生长不佳,并可以随着细胞长期传代下去。此外,我国北方小牛血清还多见黑胶虫污染,有时在光学显微镜下即可发现。

4. 血清的毒素和抑制物含量。有的小牛采血前有细菌感染,血清中有内毒素和其他抑制物,明显影响细胞生长。所以实验前应选择合适的血清,或将多批血清混合,混合血清的优点是可以稀释有害物质,使更多的细胞因子互补,增强血清活性。

(三) 检查培养器皿

1. 玻璃器皿是否洗刷合格。不能用洗衣粉等洗涤剂洗刷玻璃器皿,因为它很不容易洗净,残留的洗衣粉液足以影响细胞生长。残留的酸、碱也会明显影响细胞生长。

2. 若用塑料培养器皿,应是优质无毒性。塑料培养器皿表面有一层专门的涂料,多次使用后涂料被刮去或脱落也会影响细胞生长。

(四) 检查细胞培养的方法、技术

1. 有无污染:在常规加抗生素的细胞培养物中有时难以发现污染,可将抗生素撤消,继续培养,污染就很快显现。只要检查方法正确,细菌支原体、霉菌污染一般不难发现。另有一类特殊的污染,即在同时培养多系细胞或多种细胞时,细胞间的污染,此类事故曾有报道,应引起注意。

2. 所采用的培养方法是否合适:如细胞系传代时的扩增比例,有的细胞系有明显的浓度依赖,要求一定的细胞浓度,否则细胞生长不佳,连续传代可以丢失。又如集落培养,不同系列造血前体细胞的培养方法不尽相同。用培养红系集落的方法培养不出其他系列的前体细胞,反之亦然。

3. 操作技术有无问题:诸如离心速度、孵育时间等常用操作技术是否适合所培养细胞的要求。还有一些细小的操作技术也应考虑到,例如,有时用不带酚红指示剂的平衡盐溶液洗细胞, pH 是否合适应予核实,否则也会影响实验结果。

(五) 检查实验设备是否正常:如果细胞培养频繁污染,就应考虑实验系统是否有问题,包括超净台是否仍然有效。一般实验室使用的超净工作台仅相对无菌。应该定期检查,更换过滤器。二氧化碳培养箱由于保持饱和湿度,若有培养液泄漏容易污染水盘,尤其霉雨季节,应定期更换。对二氧化碳气体的质量应保持警惕,因为我国一般二氧化碳由啤酒厂供应,有时残留很浓的酒味,严重影响造血细胞生长。为安全考虑有的实验室将二氧化碳通过洗气瓶处理,则应定期处理洗气瓶。笔者实验室用自制的二氧化碳培养盒,以碳酸氢钠加 1/3 mol/L 磷酸定量反应产生二氧化碳,避免了二氧化碳质量不佳,也避免了二氧化碳培养箱大规模污染的危险,由于一组实验用一个培养盒,避免了由于培养箱开门引起的二氧化碳浓度和温度的波动。根据实验需要,制作了大小不同、水封式和胶纸封闭不同类型的二氧化碳培养盒,置普通隔水式培养箱培养,经济、简便、实用,培养效果与二氧化碳培养箱相比有过之而无不及,使用十多年从未发生过大量污染。

细胞培养是经验性很强的工作,读者在熟练掌握常规培养方法后,可以根据实验需要和

实际条件,灵活运用细胞培养的原则,建立切合实际的简便、实用、有效的培养方法。所以本章在介绍各类造血细胞培养方法时侧重原理、原则,供读者参考。具体方法由读者自己设计实施。

(吴克复)

第二节 血细胞分离方法

近十余年来细胞分离技术发展迅速。它们主要依据两类原则:①根据各种细胞不同的物理性状进行分离,如:细胞大小、密度、表面电荷及粘附能力等差异;②根据各种细胞表面受体或抗原的差异而采用不同的分离技术。

最常用的蔗糖-泛影酸钠(ficoll-hypaque)密度梯度离心法(以下简称F/H)分离周血中淋巴细胞就是利用各种细胞密度的差异将它们分散于自上而下的液体层次中,单个核细胞及血小板的密度小于比重1.077的F/H分离液,离心后在F/H液的顶端。红细胞及粒细胞比F/H密度高,离心后沉于F/H底端。血小板密度最小可用低速离心与单个核细胞分开,或用胎牛血清梯度离心,将血小板托起,而单个核细胞沉于底部。白环层中有淋巴细胞及单核细胞,后者粘附力强,孵育后贴壁而与淋巴细胞分开,或加入左旋亮氨酸甲醛酯(L-Leucine methyl ester)处死单核细胞而获得淋巴细胞。底层含粒细胞及红细胞,加入右旋糖酐或羟乙基淀粉液破坏细胞表面电荷,红细胞比粒细胞沉降快,而将两者分开(图1-1A)。

玫瑰花结法从淋巴细胞悬液中分离T细胞群也是利用细胞密度差异分离细胞的例子。T细胞表面的CD2是绵羊红细胞(以下简称sRBC)受体,与sRBC结合后,形成T细胞为花心、sRBC为花瓣的玫瑰花结,人为地使T细胞比重增大,经F/H法离心后,T细胞沉于管底,B细胞在白环层中。用低渗液溶解T细胞周围的sRBC而获T细胞群。然而,天然形成的玫瑰花结易散开,影响T细胞回收率并污染B细胞群,Weiner(1973年)及Madsen等(1979)分别用神经氨酸酶(neuraminidase)及AET(α -aminoethylisothiuronium bromide)预先处理sRBC,促进玫瑰花结稳定性,提高分离效果。B细胞层混杂的单核细胞也可用上述处理原则去除,而获B细胞群(图1-1B)。

随着单克隆抗体(简称:McAb或MAb)的问世,对白细胞分化抗原有了深入认识,广泛利用针对各种血细胞特征性表面抗原的MAb,从周血、骨髓、体液及培养液等混杂的细胞液中分离淋巴细胞亚群、造血细胞及某些肿瘤细胞。至此,细胞分离技术朝着更准确、纯净、高效、简单及快速的方向迅速发展。良好的细胞分离技术反过来又促进了对各种血细胞表型及功能的研究。

目前,抗体介导的细胞分离技术主要有:①流式细胞仪(FACS)细胞分选法(sorting);②免疫玫瑰花结分离法(immuno-rosetting);③平面粘附分离法(panning);④免疫磁珠分离法(immunomagnetic beads);⑤亲合素-生物素免疫吸附法(avidin-biotin immunoadsorption);⑥抗体/补体介导细胞溶解法(antibody/complement-mediated lysis);⑦免疫浮珠分离法(immuno-floating beads)等。

从抗体介导技术获得细胞的角度看,又可分为阳性细胞选择法和阴性细胞选择法。拟从混杂细胞群体中获得表达与抗体相应膜抗原的细胞群,称为阳性细胞选择法;反之,拟去除表达与抗体相应膜抗原的细胞,而收集其余的细胞群体,称为阴性细胞选择法。上述第⑥⑦

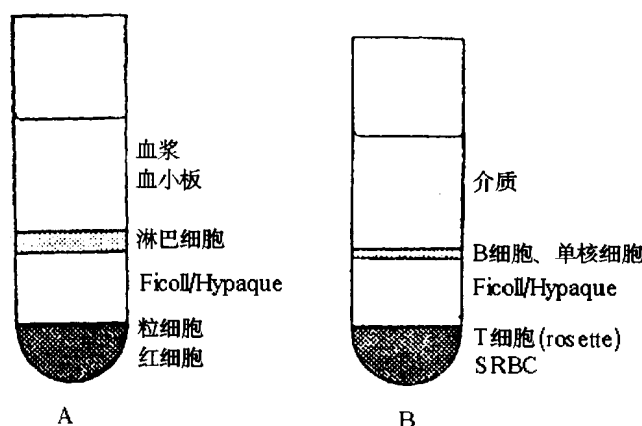


图 1-1 Ficoll/Hypaque 分离淋巴细胞示意图

A. 分离淋巴细胞; B. 分离 T、B 细胞

法为阴性细胞选择法;第②及④法作为阴性选择法更方便,但经合适的处理也可作为阳性选择法;其余方法均可用于阳性及阴性选择。

流式细胞仪细胞分选法的分辨率最高,所获细胞纯度最好,但设备昂贵、耗时、不便普及,其原理及方法等详见本书第八章。免疫磁珠法、panning 法及亲和素-生物素免疫吸附法的原理相似,只是它们固定抗体的载体和固定方式不同。现仅就某些分离法分述于下。

一、免疫玫瑰花结分离法 (immuno-rosetting)

此法首次由 Parish 及 Hayward (1974) 建立,从混杂细胞悬液中分离细胞亚群,包括胸导管淋巴细胞 (L-C)、胸腺细胞、脾细胞、淋巴结细胞及骨髓细胞悬液。去除特定的 L-C 亚群可用相应膜抗原的单克隆抗体,有时也可用经免疫吸附纯化的多克隆抗体。本法一般用作阴性细胞选择。

(一) 原理:用氯化铬偶联第二抗体及 sRBC,然后,被覆二抗的 sRBC 与单克隆抗体致敏的淋巴细胞结合,形成玫瑰花结大团块,经离心沉于管底,取上清液,含阴性选择细胞。

(二) 实验材料及试剂

1. 氯化铬生理盐水液:室温中,将氯化铬 ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.5g 溶于 0.9% NaCl 液中,用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 5.0。3 周内每周再调 pH 一次 (因为在此期间 pH 下降),此试剂存室温中,不加防腐剂至少可用两年。

2. sRBC:取绵羊颈静脉血,Alseve's 液保存于 4°C ,可用 14 天。只是绵羊要挑选青壮时期,洗时若有溶血不可用。

3. 小鼠源性抗特定细胞亚群表面抗原的单克隆抗体。

4. 兔抗小鼠 Ig 抗体 (经免疫吸附纯化)。

5. FITC 标记的兔抗小鼠 Ig 抗体。

6. 台盼蓝染液,0.2% (W/V),溶于含 NaN_3 的 PBS 中。

7. 牛白蛋白粉剂 (BSA)。

8. 磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH7.2):称取 Na_2HPO_4 1.15g、 KH_2PO_4 0.2g、NaCl 8.0g、KCl 0.2g,加双蒸水至 1000ml。

9. 0.85% NaCl 溶液。

10. 12mm 直径圆底试管、毛细滴管、20ml 带螺旋盖塑料小瓶等。

11. 水平转头离心机，可控温。

12. 落射光荧光镜、光学显微镜、流式细胞仪 (FCM)。

13. 旋转混合器 (rock - N - rock)。

14. 血细胞计数盘等。

(三) 实验步骤：所有步骤均在 4℃ 进行。

1. 兔抗小鼠 Ig 抗体包被 sRBC：

(1) 用生理盐水洗 sRBC 4 次 (200g，离心 10 分钟)，配成 5% (V/V) sRBC 生理盐水悬液。

(2) 取 5% sRBC 悬液 10ml，加兔抗小鼠 Ig 800μg，混匀，再加 0.1% 氯化铬液 400 ~ 500μl，充分混匀 (以上均以生理盐水为介质)，室温孵育 5 分钟，此时绝大多数 sRBC 沉降，形成凝块。

(3) 用 PBS 洗被覆抗体的 sRBC 2 次，再用含 0.2% BSA 的 PBS (简称 PBS/BSA) 洗 1 次。用 10ml PBS/BSA 悬浮 sRBC，备用。

2. 致敏淋巴细胞：将 PBS 洗过 2 次的 10^9 淋巴细胞沉积团块加入约 50μg 单抗 (需预先在荧光镜或 FACS 下检测与 L - C 反应的单抗最适量。若阳性抗原细胞为很小的亚群，还可适当减少单抗用量)，混匀，冰浴中孵育 1 小时，用 PBS/BSA 洗细胞 2 次，再悬浮于 10ml PBS/BSA 中，留一小样本 (约 10^6 L - C) 作为清除前样本活性及表型分析用。

3. 形成免疫玫瑰花结：

(1) 将其余的致敏 L - C 悬液转到一只 20ml 带螺旋盖的塑料瓶中，加入上述 5% 被覆抗小鼠 Ig 的 sRBC 悬液 10ml，混匀，用 PBS/BSA 补充到加盖后留下约 0.5ml 空间。

(2) 将装满 PBS/BSA 的瓶子，旋紧盖子，在 4℃ 旋转混合器 (end - N - end) 上，以 10r/min 混合 20 分钟，(若无此设备也可手持小瓶不时地轻轻转动混合)。

4. 分离细胞：

(1) 将小瓶 160g 离心 45 秒钟，玫瑰花团块沉管底，用毛细滴管吸取上清液，此含抗原阴性细胞群。

(2) 若需提高产率，可用毛细管轻轻再悬浮起团块，按上述操作，加满 PBS/BSA → 旋转混合 10 分钟 → 160g 离心 45 秒，取上清液。并将两次上清液混合。

(3) 混合液离心沉降细胞，用氯化铵或蒸馏水溶解 sRBC 后，再用 PBS/BSA 洗 1 次，配成目的细胞群的悬液。

5. 分离效果检测：

(1) 纯度：将清除前、后的细胞悬液与目的细胞表面抗原相应的单抗反应，洗涤后再与 FITC - 抗小鼠 Ig 反应，荧光镜或 FACS 测阳性标记细胞百分数，即目的细胞所占百分数，纯度。

(2) 回收率：台盼蓝染色清除前、后的细胞悬液，计数细胞总数、死、活细胞百分数

$$\text{回收率} (\%) = \frac{\text{清除后细胞总数} \times \text{清除后活细胞}\% \times \text{清除后目的细胞}\%}{\text{清除前细胞总数} \times \text{清除前活细胞}\% \times \text{清除前目的细胞}\%} \times 100$$