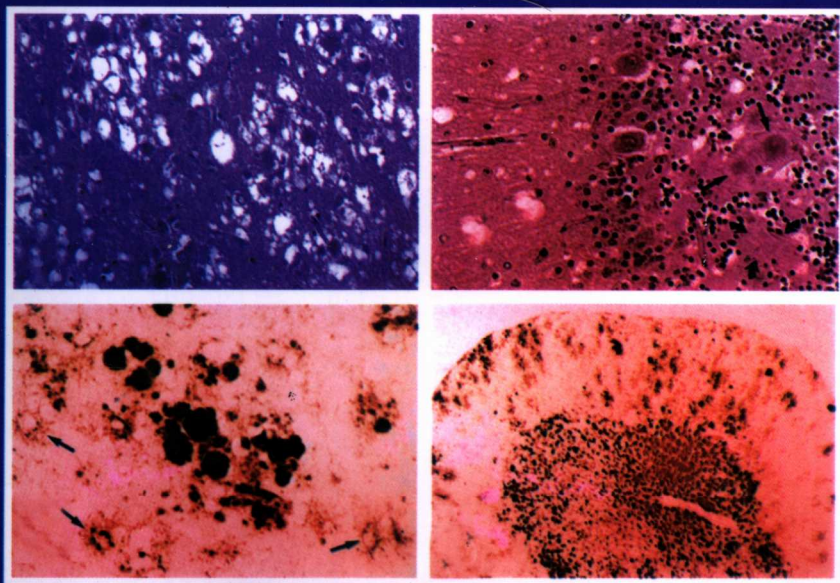


医学常用 实验技术精编

YIXUE CHANGYONG SHIYANJISHU JINGBIAN

主编：党双锁

UE
NGYONG
YANJISHU
GBIAN



世界图书出版公司



医学常用实验技术精编

YIXUE CHANGYONG SHIYANJISHU JINGBIAN

主 编 党双锁

副主编 刘利兵 洛文田 张向红

编 者 (按姓氏排列)

袁秉义 刘恩岐 徐仓宝

鱼 敏 程延安 杨 军

安群星 刘宏欣 孙载阳

田 琼 杨 娥 乔 红

牛新捷 杨鹏辉

主 审 楚雍烈

兴界图书出版公司

西安 北京 广州 上海

图书在版编目(CIP)数据

医学常用实验技术精编/党双锁编著. —西安: 世界图书出版西安公司: 2004.6

ISBN 7-5062-5336-4

I. 医... II. 党... III. 实验医学 VI. R-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 016298 号

医学常用实验技术精编

策 划 马可为
主 编 党双锁
主 审 楚雍烈
责任编辑 齐 琼

出版发行 世界图书出版西安公司
地 址 西安市南大街 17 号
邮 编 710001
电 话 029-87279676 87233647(发行部)
029-87279677(总编室)
传 真 029-87279675
E-mail wmcxian@public.xa.sn.cn
经 销 全国各地新华书店
印 刷 陕西新世纪印刷厂印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 19.25
字 数 380 千字

版 次 2004 年 6 月第 1 版 2004 年 6 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 7-5062-5336-4/R·561
定 价 38.00 元

☆如有印装错误,请寄回本公司更换☆

序

随着科学技术的迅速发展,加速了现代医学事业的进步与变革。新的医学实验技术也在不断产生、发展,这些先进的实验技术对医学研究、临床诊断和治疗水平的提高起到了有力的促进作用。从某种程度上来说,谁掌握了先进实验技术,谁就有可能在科研上争取主动,甚至创新和领先。

《医学常用实验技术精编》一书,即将由世界图书出版西安公司出版发行,本书对于正在从事科学研究的医学研究人员、临床医生,尤其是正在攻读学位研究生的学生们应该是一本难得的实验工具书。

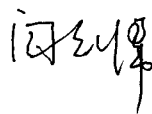
在任何一个实验室、研究室,都很容易发现各种各样、分门别类的医学实验方法类书籍。然而,具有较强的系统性、全面性、实用性的工具书并不多。进入 21 世纪,医学学科交叉、互动是当今医学的发展趋势,每一项创新性研究都有可能涉及多种实验技术与方法,对于医学研究生或医学科研工作者来说,很难在有限的时间里掌握全部的实验技术,因此,本书尽可能避免这种弊端,极大地满足读者的需求,这正是这一批年轻学者出版此书的真实用意。

本书的作者群主要为西安交通大学医学院、第二医院、第一医院和第四军医大学两校的 20 余位专家教授,他(她)们大多都经历了硕士、博士阶段的培养,目前已成为博士、硕士研究生导师。部分专家具有较长时期在国外从事科学研究的经历,已熟练掌握并应用自己所撰写的相关实验技术;部分专家目前正在从事实验室研究工作,熟悉相关研究领域实验技术的最新进展;也有部分专家正在从事临床科学研究,比较了解临床科学研究的需要。因此,本书基本可以满足研究生及一般科研人员从事医学科学研究的需要。相关学科研究人员也可以借助此书了解国际上医学实验技术的最新进展。

全书共分为 14 章,内容包括细菌培养、细胞培养、免疫学常用技术、免疫组织化学技术、核酸技术,染色体分析技术、蛋白质技术、组织芯片技术、动物实验、药理学常用技术、聚合酶链反应技术及其衍生技术和常用实验统计方法等。在实验方法的选择上尽可能选用常见的或作者自己实践过的方法,并对实验中常出现的问题给予分析和说明,力求使读者在阅读本书并熟悉所介绍相关方法或技术的基础上,能较娴熟地应用这些技术或方法并获得满意的实验结果。

我乐于为本书作序,同时向广大读者推荐,衷心地希望这本书能成为从事医学科学实验研究者的有力帮手。

西安交通大学副校长
西安交通大学医学院院长



2004 年 4 月 16 日

前言

医学实验技术是医学实验研究的必要手段，医学实验技术的不断革新和发展，有力地推动了医学事业的飞速发展。只有掌握和了解当代医学常用实验技术，并能够灵活准确地运用，才能够充分地利用现有的实验方法为医学发展服务，为疾病诊断模式的创新、治疗的更新、疗效的判断以及新发现疾病的认识提供服务。近年来，医学学科中各种实验技术都有了不断的创新和发展，一些旧的方法不断被改进或被淘汰，新的技术和方法不断出现和成熟，且学科交叉紧密，各学科研究技术相互运用。所以编写一本常用和经典实验技术工具书，对于各个从事实验研究的实验室很有必要。基于此，我们联合编写了本书。

在编写过程中我们力求使本书具有实用性、全面性和创新性的特点。实用性：以方法学为主，即具体的实验步骤，通过具体方法的介绍，使读者阅读后实现可操作性并获得满意结果。全面性：全书共 14 个章节，全面系统地介绍了医学科学常用实验方法及最新的实验技术，包括细胞培养、免疫组化、蛋白质研究技术、核酸技术、细菌培养检查、染色体分析技术、免疫学实验、药理学实验、动物实验、统计学方法及最新的 PCR 技术等。创新性：①内容上具有作者自己的特色，自己的经验总结。对以往实验中经常遇到的问题进行了分析，提出了可行的解决办法。②体现最新的医学实验方法的进展，本书的每个章节中均编入了最新的实验技术。

本书的作者群：以长期从事实验研究的医学博士为主体，其中几位作者曾在国外知名的大学实验室工作多年，所有人员均有丰富的实验室工作经验，因此，在编写过程中得心应手，他们既有较深的理论知识，又有根据国内实验条件下开展技术应用的经验和体会，保证了所写方法的前沿性、领先性、可靠性和实用性。

本书的出版，将给更多的读者和使用者带来方便。我们相信对于医学研究生、高年资临床医生及研究人员也不无裨益。

本书虽经多次修改，难免有不当之处，恳切希望读者批评指正。

编者

2003 年 10 月于西安

目 录

第一章 组织细胞培养技术	(1)	二、细胞生物学检测	(9)
第一节 培养室的基本条件	(1)	第八节 影响细胞生长的因素	(9)
一、培养室设置	(1)	一、营养	(9)
二、培养室仪器、器械及器皿	(1)	二、环境	(9)
第二节 培养试剂	(2)	第九节 细胞培养污染的控制	(10)
一、水、平衡盐液	(2)	一、污染的概念	(10)
二、培养基	(3)	二、污染的种类及表现	(10)
三、底物溶液	(3)	三、污染的预防及消除	(10)
四、培养基添加剂	(3)	四、支原体污染的对策	(10)
五、消化液	(3)	第十节 培养细胞的冻存、复苏	
六、pH调整液	(4)	与运输	(11)
七、抗生素液	(4)	一、细胞冻存	(11)
八、清洁液的配制和使用注意		二、复苏方法	(12)
事项	(4)	三、细胞运输	(12)
第三节 细胞培养的基本技术	(5)	第二章 细菌培养技术	(13)
一、清洗	(5)	第一节 培养基	(13)
二、包装及消毒	(5)	一、培养基的基本成分	(13)
三、无菌操作	(5)	二、培养基制备的一般程序	(14)
四、取材	(5)	三、常用培养基	(14)
五、细胞分散法	(6)	第二节 细菌培养法	(17)
六、淋巴细胞分离法	(6)	一、细菌检验室的一般注意事	
七、细胞计数	(6)	项及无菌技术	(17)
第四节 原代培养	(6)	二、接种环和接种针的使用	(17)
一、操作步骤	(7)	三、接种操作区	(17)
二、注意事项	(7)	四、接种法	(18)
第五节 传代培养	(7)	五、培养法	(19)
一、操作步骤	(8)	第三章 免疫学技术	(21)
二、注意事项	(8)	第一节 机体非特异性免疫功能	
第六节 体内细胞培养	(8)	检测	(21)
一、瘤细胞悬液接种	(8)	一、中性粒细胞吞噬功能检测	(21)
二、腹水瘤的建立与腹水瘤的		二、巨噬细胞吞噬功能试验	(21)
接种	(8)	第二节 抗体及其相关技术	(22)
第七节 培养细胞的观察	(8)	一、免疫血清的制备	(22)
一、细胞培养常规检查(活细			
胞直接观察)	(8)		

二、直接凝集反应	(22)
三、沉淀反应	(24)
第三节 细胞免疫测定	(25)
一、淋巴细胞转化试验	(25)
二、体外抗体形成细胞的检测	(25)
第四节 免疫标记技术	(26)
一、酶联免疫吸附试验	(26)
二、免疫荧光技术	(27)
三、放射免疫测定法	(28)
第五节 单克隆抗体技术	(29)
一、杂交瘤的基本原理	(29)
二、实验材料	(29)
三、杂交瘤细胞制备	(29)
四、杂交瘤细胞的选择性培养	(30)
五、杂交瘤细胞筛选	(31)
六、杂交瘤细胞的克隆化	(31)
七、单克隆抗体腹水的制备	(31)

第四章 免疫组织化学实用

技术

第一节 免疫组化实验室的建设和

试剂的保存

- 一、免疫组化实验室的建设
- 二、免疫组化试剂的选择
- 三、抗体的配制和保存
- 四、常用免疫组化缓冲液的配制和保存

第二节 组织标本的处理

- 一、组织标本的取材
- 二、组织标本的固定
- 三、组织的脱水、透明、浸蜡
- 四、组织样本的包埋

第三节 组织切片的准备

- 一、一般性准备工作
- 二、载玻片的清洁
- 三、载玻片的表面处理
- 四、盖玻片的处理

第四节 组织切片的制作

- 一、石蜡切片法制作过程
- 二、冷冻切片法制作过程

第五节 常用免疫组化染色方法

- 一、酶标抗体法
- 二、酶桥法(enzyme bridge method) ...
- 三、PAP法(peroxidase antiperoxidase method, 过氧化物酶抗过氧化物酶法)
- 四、双 PAP 法
- 五、BRAB 法(bridged avidin - biotin technique, 桥抗生物素 - 生物素技术)
- 六、LAB 法(labelled avidin - biotin technique, 标记生物素 - 抗生物素技术)
- 七、SPA - HRP 用于间接法的染色 ...
- 八、SPA 用于 PAP 法
- 九、ABC 法(avidin - biotin - peroxidase complex, 抗生物素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物法)
- 十、快速 ABC 法(antibody - avidin - biotin - HRP complex, 抗体 - 亲和素 - 生物素过氧化物酶复合物法)
- 十一、二步 ABC 法
- 十二、SABC 法
- 十三、SP(streptavidin - peroxidase, SP) 免疫组化法
- 十四、Envision I 法
- 十五、CSA 法(catalyzed signal amplification, CSA 催化信号放大法) ...

第六节 内源性酶的消除和血清封闭

第七节 抗原修复

- 一、蛋白酶消化法
- 二、热诱导抗原修复
- 三、蛋白酶消化法与热修复法的联合应用
- 四、抗原热修复应注意的问题

第八节 抗体孵育

第九节 免疫组化切片的显色

- 一、辣根过氧化物酶标记的免疫组化试剂盒的显色

二、碱性磷酸酶标记的免疫组 化试剂盒的显色..... (51)	一、设计策略 (60)
三、免疫组化显色中的注意事项 (51)	二、制备方法 (61)
第十节 免疫组化切片的复染和 封固..... (52)	三、组织芯片的检测..... (62)
一、常用的复染方法..... (52)	四、组织芯片与基因芯片、蛋白 芯片的区别 (62)
二、常用的封固方法..... (53)	第三节 组织芯片技术的优点..... (62)
三、常见免疫组化标记酶的种类和显 色剂、复染剂、封片剂间的匹配... (53)	一、可提高组织学实验的效率..... (62)
第十一节 免疫组化染色结果的 判断..... (54)	二、有助于减少实验误差..... (63)
一、免疫组化对照的设置..... (54)	三、便于设置实验对照..... (63)
二、特异性染色和非特异性染色 的鉴别 (55)	四、有利于原始存档蜡块的保存 (63)
第十二节 免疫组化常见问题及其 处理方法..... (55)	五、有利于节约实验试剂..... (63)
一、对照切片和待检测组织 切片均无着色 (55)	第四节 组织芯片的应用..... (63)
二、阴性对照没有染色,而 阳性对照标本和待检测组 织切片呈弱阳性..... (56)	一、组织芯片的应用方式..... (63)
三、切片染色太深或整张切 片均出现染色 (56)	二、组织芯片技术的应用领域 (63)
四、切片上有许多杂质..... (57)	第五节 组织芯片存在的问题..... (64)
五、没有复染色或复染色太浅 (57)	一、组织芯片的制备问题..... (64)
六、复染色太深或复染和 DAB 反差太小 (57)	二、组织芯片分析的自动化问题 (64)
七、染色标本未按所期望的表 达(浆以及核) (57)	三、建立组织库的问题..... (64)
八、所有切片包括阴性对照切 片均呈现弱阳性反应..... (58)	第六章 染色体分析技术 (65)
九、所有切片均出现非特异性 背景染色 (58)	第一节 人体外周血细胞培养 及染色体标本制备..... (65)
十、阳性对照染色良好,待检测切 片均无阳性反应,呈现假阴性 ... (59)	一、实验原理 (65)
十一、切片着色不匀..... (59)	二、实验用品 (66)
第五章 组织芯片技术 (60)	三、分析步骤 (66)
第一节 概述..... (60)	第二节 染色体 G 显带技术 (67)
第二节 组织芯片的制备..... (60)	一、实验原理 (67)
	二、实验用品 (67)
	三、分析步骤 (67)
	第三节 染色体核型分析..... (67)
	第四节 染色体荧光原位杂交 技术..... (68)
	一、实验原理 (68)
	二、实验用品 (69)
	三、分析步骤 (69)
	第五节 微核检测方法..... (70)
	一、实验原理 (70)
	二、实验用品 (70)
	三、分析步骤 (70)
	四、结果分析 (70)

第六节 人体染色体脆性位点检测

方法..... (70)

一、实验用品..... (70)

二、分析步骤..... (71)

第七节 人类体细胞 X 染色质检测

方法..... (71)

一、实验用品..... (71)

二、分析步骤..... (71)

第八节 姐妹染色单体分化染色

法(SCE)..... (71)

一、实验原理..... (71)

二、器材与试剂..... (72)

三、分析步骤..... (72)

第七章 蛋白质研究技术..... (73)

第一节 蛋白质的提取和溶解..... (73)

一、蛋白质的破碎和溶解..... (74)

二、包涵体蛋白质的溶解..... (75)

第二节 蛋白质浓度的测定..... (75)

一、紫外吸收法..... (76)

二、Lowry 法(Folin-酚法)..... (76)

三、Bradford 法(考马斯亮蓝 G-250 染色法)..... (77)

第三节 蛋白质分离纯化技术..... (77)

一、蛋白质样品的浓缩..... (77)

二、离子交换层析..... (80)

三、疏水作用层析..... (86)

第四节 蛋白质的分析鉴定..... (93)

一、电泳分析..... (93)

二、蛋白质免疫印迹分析..... (97)

三、蛋白质变性和复性分析..... (100)

第五节 蛋白质的双向凝胶电泳

技术..... (102)

一、样品的制备..... (103)

二、第一向电泳(等电聚焦, IEF)..... (104)

三、凝胶的平衡..... (105)

四、第二向电泳(SDS-PAGE)..... (105)

五、染色..... (105)

六、图像捕获与分析..... (107)

七、注意事项..... (107)

第八章 核酸研究技术..... (108)

第一节 限制性内切酶消化 DNA..... (108)

一、材料..... (109)

二、单酶消化 DNA 样品反应..... (109)

三、多限制性内切酶消化 DNA 样品..... (110)

四、注意事项..... (110)

第二节 核酸探针标记..... (111)

一、放射性核素 α - ^{32}P 随机引物延伸标记方法..... (111)

二、光敏生物素标记方法..... (112)

三、地高辛标记的 DNA 探针..... (113)

第三节 斑点/狭缝杂交技术..... (113)

一、仪器及试剂..... (114)

二、方法..... (114)

三、注意事项..... (115)

第四节 Southern 印迹技术..... (116)

一、仪器与试剂..... (117)

二、方法..... (117)

三、注意事项..... (118)

第五节 Northern 印迹技术..... (119)

一、材料与试剂..... (119)

二、方法..... (119)

三、注意事项..... (120)

第六节 原位杂交技术..... (120)

一、材料与试剂..... (121)

二、方法..... (122)

三、注意事项..... (122)

第九章 PCR 技术及其应用..... (125)

第一节 PCR 技术的基本原理..... (125)

第二节 PCR 反应体系的组成及影响扩增效率的因素..... (126)

一、PCR 反应体系的组成..... (126)

二、基础 PCR 及最佳条件..... (127)

三、耐热性 DNA 聚合酶..... (130)

四、引物的设计合成..... (133)

第三节 模板 DNA 的制备..... (136)

一、模板 DNA 制备的基本方法..... (136)

二、临床标本制备模板 DNA	(138)	十三、微量 DNA 变异的检测	(171)
三、穿刺细胞 DNA 的提取	(139)	十四、变性梯度凝胶电泳	(173)
四、石蜡包埋标本 DNA 的提取	(140)	十五、限制性片段长度多态性	(174)
五、唾液标本的 DNA 的提取	(140)	十六、用 PCR 分析大范围的 DNA 变异—— 差异显示分析法(DDA)	(175)
六、RNA 模板的制备	(141)	十七、用 PCR 分析大范围的 DNA 变异—— 代表性差异显示分析法(RDA)	(175)
第七节 常用的 PCR 产物检测		十八、mRNA 差异显示 PCR	(176)
方法	(142)	十九、随机扩增的多态性 DNA	(180)
一、琼脂糖凝胶电泳	(142)	二十、AP-PCR	(181)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(142)	二十一、PCR 克隆	(183)
三、PCR 产物的核酸杂交检测	(142)	二十二、PCR 产物的碱基测序	(184)
第八节 影响 PCR 扩增效率的		二十三、用 λ 核酸外切酶测定碱 基序列	(186)
因素	(143)	二十四、用 PCR 导入基因突变	(188)
第九节 非同位素探针的 PCR 标		二十五、同源重组子的 PCR 筛 选法	(189)
记法	(144)	二十六、cDNA 末端快速扩增	(189)
一、标记的相关因素	(144)	二十七、cDNA 文库的构建及筛选	(193)
二、标记的步骤	(144)	二十八、利用 PCR 技术建立染色 体探针池	(193)
三、注意事项	(145)	二十九、用连接酶介导的 PCR 进行 DNase 足迹分析	(194)
第十节 定量 PCR	(145)	三十、柄式 PCR (Panhandle)	(200)
一、DNA 的定量	(145)	三十一、表达 PCR (E-PCR)	(201)
二、RNA 的定量	(146)	三十二、用 SNUPE 分析法定量分 析等位基因特异性序列 中单一核苷酸差异	(203)
第十一节 PCR 中常出现的问题及		三十三、应用连接介导 PCR 进行基 因组 DNA 测序和足迹分析	(204)
解决方法	(150)	三十四、应用任意引物 PCR 进行 DNA 指纹分析	(206)
一、PCR 中常出现的问题	(150)		
二、PCR 中出现的问题及解决			
方法	(152)		
第十章 PCR 衍生技术	(153)		
一、热启动 PCR	(153)		
二、LA PCR	(154)		
三、套式 PCR	(158)		
四、反转录 PCR	(158)		
五、锚定 PCR	(158)		
六、PCR-ELISA	(162)		
七、免疫 PCR	(162)		
八、原位 PCR	(164)		
九、序列特异性引物 PCR	(166)		
十、单链构型多态性(一个碱基 置换的简便检出法)	(167)		
十一、PCR-SSOP 法	(169)		
十二、RNase 保护法	(170)		
		第十一章 药理学常用研究	
		方法	(209)
		第一节 新药临床研究的盲法 设计	(209)
		一、盲法设计的目的和原则	(209)
		二、简单设盲法	(210)
		三、平行随机设盲法	(210)

第二节 受体动力学研究·····	(210)	的方法·····	(241)
一、药物-受体结合的定量关系·····	(211)	八、几种转基因动物制作方法	
二、量-效关系的运算过程·····	(213)	比较·····	(242)
第三节 药物动力学研究·····	(217)	九、展望·····	(242)
一、概述·····	(217)	十、应用·····	(242)
二、单室模型·····	(218)	第五节 动物克隆技术进展·····	(243)
三、两室模型·····	(220)	一、动物克隆的理论依据·····	(243)
四、多次口服给药·····	(221)	二、动物克隆的技术可行性·····	(244)
五、生物利用度·····	(222)	三、动物克隆存在的问题·····	(245)
第四节 生物等效性检验的计		四、转基因克隆技术·····	(246)
算及计算程序·····	(223)	五、讨论与建议·····	(246)
一、生物等效性检验与显著性		六、动物克隆技术应用前景·····	(246)
检验·····	(223)	第六节 卵巢移植和体外受精·····	(248)
二、生物等效性检验的理论根据·····	(223)	一、卵巢移植·····	(248)
三、常用生物等效性检验方法·····	(224)	二、体外受精·····	(248)
第十二章 实验动物和动物		第七节 常用动物实验方法·····	(249)
实验·····	(226)	一、抓取和固定的方法·····	(249)
第一节 实验动物学的基本概念		二、性别判定·····	(252)
和基本内容·····	(226)	三、动物编号的标记方法·····	(252)
一、实验动物·····	(226)	四、给药方法·····	(254)
二、实验动物微生物质量控制·····	(227)	五、麻醉法·····	(256)
三、实验动物遗传质量控制·····	(228)	六、采血·····	(258)
第二节 动物实验·····	(229)	七、安乐死法·····	(259)
第三节 人类疾病动物模型·····	(231)	八、交配和妊娠的确认·····	(261)
一、动物模型的含义·····	(231)	九、动物实验室的消毒·····	(261)
二、人类疾病动物模型的设计			
原则·····	(232)	第十三章 临床实验研究常用	
第四节 转基因动物·····	(232)	统计学方法·····	(263)
一、转基因(transgenic animal)		第一节 概述·····	(263)
动物的概念·····	(233)	一、统计学在临床实验研究中的	
二、基因的结构和调控·····	(233)	作用·····	(263)
三、用显微注射法制作转基因		二、统计学方法应用的基本步骤·····	(264)
小鼠·····	(233)	三、统计方法的选用·····	(265)
四、利用胚胎干细胞制作转基因		第二节 临床实验研究设计·····	(266)
小鼠·····	(237)	一、实验研究的分类及其基本	
五、复制缺陷型反转录病毒作为		要素·····	(266)
载体的方法·····	(240)	二、实验设计的基本原则·····	(268)
六、精子作为载体的方法·····	(241)	三、随机化分组方法·····	(269)
七、整合外源基因体细胞核移植		四、样本含量估计方法·····	(270)
		五、临床实验中常用的设计方法·····	(271)

六、实验中的盲法	(273)	四、讨论	(279)
七、剂量和量效关系设计	(273)		
第三节 临床实验研究常用统计		第十四章 常用器械消毒与	
分析方法	(274)	处理	(281)
一、计数资料的统计方法	(274)	一、清洗	(281)
二、计量资料统计方法	(275)	二、灭菌法	(282)
第四节 临床研究论文写作的统计		三、消毒法	(284)
要求	(277)	附录 I 常用词汇中英文对照	(285)
一、摘要	(277)	附录 II 常用单位	(292)
二、材料与方法	(277)	参考文献	(293)
三、结果	(277)		

第一章

组织细胞培养技术

在体外模拟体内生理环境等特定条件下,将组织或细胞进行孵育培养,使之生存并维持其结构和功能的方法统称为组织细胞培养(tissue and cell culture)。

第一节 培养室的基本条件

(一)培养室设置

包括无菌操作区、清洗准备区、消毒无菌区、物品储藏区、培养孵育区、观察研究区。

无菌操作区包括操作间和缓冲间。进行感染和正常的操作应在不同的操作间,因此操作间又可分为正常培养操作间和感染操作间。缓冲间是进入操作间所经过的缓冲区,能保护无菌操作间的无菌环境,缓冲间还可兼有更换无菌衣帽等功能。无菌操作区的陈设不宜过多。

(二)培养室仪器、器械及器皿

1. 仪器 超净工作台、无菌操作箱、物品

柜、实验台、CO₂ 培养箱、恒温水浴箱、电热干燥箱、转鼓培养架、培养盘、试管架、倒置显微镜、普通显微镜、实体解剖显微镜、照相系统、普通及低温冰箱、水纯化装置、高速及超速离心机、天平、蠕动泵、液氮罐、搅拌器、酸度计、高压消毒锅、滤器、紫外线灯等。

2. 器械 常用的有手术剪、手术刀、虹膜剪(直、弯头)、眼科镊(直、弯头)、中号尖镊、持针器、止血钳、80~200目尼龙网或不锈钢网、细胞计数板、微量移液器等。

3. 器皿 各种培养瓶、培养皿、细胞培养板(4、8、16、24、48、96孔)、试管、离心管、冻存管、玻璃瓶、吸管等,可根据具体情况选用(见表1-1)。用于组织培养的玻璃器皿需经过严格选择,均以中性硬质玻璃为好,其具有耐酸、耐高压、透明度好等优点,且应规格一致、光滑平整无痕。由于玻璃培养器皿易碎、清洗消毒费时费力,目前更多采用经过消毒灭菌的塑料制品,打开密封包装即可使用。

表 1-1 常用的培养器皿

培养器皿	底面积(cm ²)	加培养液量(ml)	可获细胞量
96孔培养板	0.32	0.1	1×10 ⁵
24孔培养板	2	1	5×10 ⁵
12孔培养板	4.5	2	1×10 ⁶
6孔培养板	9.6	2.5	2.5×10 ⁶
4孔培养板	28	5	7×10 ⁶
3.5cm培养皿	8	3	2×10 ⁶

(续)

培养器皿	底面积(cm^2)	加培养液量(ml)	可获细胞量
6cm 培养皿	21	5	5.2×10^6
9cm 培养皿	49	10	12.2×10^6
10cm 培养皿	55	10	13.7×10^6
25 cm^2 塑料培养瓶	25	5	5×10^6
75 cm^2 塑料培养瓶	75	15 ~ 30	2×10^7
25ml 玻璃培养瓶	19	4	3×10^6
100ml 玻璃培养瓶	37.5	10	6×10^6
250ml 玻璃培养瓶	78	15	2×10^7
2 500ml 旋转培养瓶	700	100 ~ 250	2.5×10^8

第二节 培养试剂

(一)水、平衡盐液

1. 蒸馏水 细胞培养用水必须经纯化处理。实验室常用的纯化水装置有两种。

(1)离子交换水装置 制取去离子水不用燃料、成本低、水质好、操作简便,但不能去除非离子物质或有机物质,所以一般在细胞培养中使用不多,多用于冲洗玻璃器皿等。

(2)蒸馏水装置 外购或自制蒸馏水大部分为金属蒸馏器所制备,往往会混有金属离子,需经玻璃蒸馏器重新蒸馏。组织培养液要用三

蒸水配制。蒸馏水应现用现制,存放时间不宜太长。因空气中的杂质和有毒气体能污染水质, CO_2 也会溶解于水中,故存放时要将蒸馏水装满贮存器,密封瓶口防止空气混入。

2. 平衡盐液 平衡盐液以 Hanks 液、Eagle 液、PBS 液、D - Hanks 液、HEPES 液为多用(见表 1-2)。平衡盐溶液可作为配制培养液的基础溶液,配制各种试液和用作洗涤组织和细胞。

配制时为防止钙的沉淀,应将其中的 CaCl_2 、 NaHCO_3 单独配制,并将平衡盐溶液配制成浓缩液,使用时现加。Hanks 液和 Eagle 液都需一定量的 CO_2 平衡,因此应将瓶盖(橡皮塞)盖紧,以防瓶中 CO_2 逃逸,使溶液 pH 增高。配制好的平衡盐液分装于盐水瓶内,68.95kPa 10 ~ 20min 高压蒸汽消毒灭菌。

表 1-2 常用的平衡盐溶液(g/L)

	Ringer	PBS	Eagle	Hanks	Dulbecco	D - Hanks
NaCl	9.00	8.00	6.80	8.00	8.00	8.00
KCl	0.42	0.20	0.40	0.40	0.02	0.40
CaCl_2	0.25		0.14	0.14	0.10	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$					0.10	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.20	0.20		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		1.56		0.06		0.06
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			1.14		1.42	
KH_2PO_4		0.20		0.06	0.20	0.06
NaHCO_3			2.20	0.35		0.35
葡萄糖			1.00	1.00		
酚红			0.02	0.02	0.02	0.02

(二)培养基

1. **天然培养基** 天然培养基主要是取自动物体液或从动物组织中分离提取。有动物血清、血浆、组织浸出液、水解乳蛋白等。细胞培养中最为常用的是动物血清,其中牛血清用途更广泛。牛血清分为胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和小牛血清(Calf Serum, CS)两种。FBS是经剖腹从牛子宫中取出的胎牛中分离得到的血清,价格贵;CS是从刚出生但尚未哺乳的小牛中分离得到的血清。血清在用前常需进行灭活处理(加温至 56℃, 30min)。

2. **合成培养基** 合成培养基主要含有氨基酸、维生素、碳水化合物和无机离子等,应用十分方便。目前市售合成培养基种类很多,如 MEM、DMEM、199、RPMI 1640、F12 等均较常用,但不同种细胞培养所用的最适培养基也有差别,需注意选择,如 DMEM 常用于骨髓瘤细胞和 DNA 转染的转化细胞的培养;RPMI 1640 适用于淋巴细胞和肿瘤细胞的培养等。合成培养基不加血清或加低浓度(2%)血清,仅能维持细胞生存,称为维持液。因此在使用时尚需添加 10%~20% 血清,才能有利于细胞生长,称为生长液。

MEM(minimum essential medium, 低限量 Eagle 培养基)成分简单,适合于各种已建成细胞系的培养,同时宜于添加或减少某些成分,也特别适于特殊研究的细胞培养工作。

DMEM(Dulbeccos modified essential medium, Dulbecco 改良的 Eagle 培养基)增加了各种成分的用量(加倍),葡萄糖用量可选择低糖或高糖,对于生长速度较快、附着性较差的肿瘤细胞生长有利。特别应用在附着性较差,但又不希望它脱离原来生长点的克隆培养时,采用高糖的培养液效果较好。所以常用于杂交瘤技术中骨髓瘤细胞和 DNA 转染的转化细胞的培养。

RPMI 1640 是一种常用的培养液,最初是针对淋巴细胞培养而设计的,现广泛应用于多种正常细胞和肿瘤细胞的培养。

3. **无血清培养基** 由于血清成分复杂,常

影响对培养细胞分泌的微量物质的研究,难以分析培养基内成分,而且血清中也含有细胞毒性物质和抑制物质,对细胞有分化作用,影响细胞的正常表达,所以多种无血清培养基受到人们的重视。无血清培养基主要由基础培养液和附加成分两部分组成。常用 F12 和 DMEM 培养基,二者按 1:1 混合补加 15 mmol/L HEPES 等作为基础液,根据不同细胞的要求,附加特异性生长因子、激素、细胞附着蛋白、金属离子转移蛋白、细胞结合蛋白、脂蛋白、脂肪酸、酶抑制剂和微量元素等成分。无血清培养基种类已日渐增多,如 Neurobasal - SFM 等,可根据具体实验进行购买。但应注意是否有与无血清培养基一起使用的添加剂,如有应一并购买。

(三)底物溶液

鼠尾胶原、多聚赖氨酸、人羊膜基酸、层粘连蛋白、多聚鸟氨酸等常用作培养底物。胶原是细胞生长的良好基质,主要用于组织块和细胞的固定附着,并改善细胞生长的性质以适应细胞的生长。大鼠尾胶原是实验室常用的胶原。使用时取少许胶原涂于无菌培养瓶皿的内壁上,不宜太厚,以倾斜瓶皿时不流动为准。向培养瓶内通以氮气后封上瓶盖,作用 30min,待胶原凝固,然后用无菌生理盐水冲洗,晾干后即可使用。

(四)培养基添加剂

1. **一般添加剂** 葡萄糖、各种氨基酸、胰岛素等。分别溶于三蒸水,经过过滤除菌,分装, -20℃ 保存。

2. **合成添加剂** 常同各种无血清培养基一起按比例购买,如 Neurobasal - SFM 培养基 100ml 中需添加 N2 添加剂 1 ml 或 B27 添加剂 2 ml,此种完全的无血清培养基使用便利,培养效果也很满意。

(五)消化液

1. **胰蛋白酶溶液** 胰酶粉末 1g,加入平衡盐溶液调成糊状,再加至 100ml 搅拌均匀,室温

或冰箱保存过夜,并不时搅拌振荡。滤器过滤除菌、分装,低温冰箱保存。用时将其稀释,按1份胰酶加3份平衡盐配制,即成0.25%的胰蛋白酶溶液,再用碱性溶液将其调整到pH 7.2左右,降低其酸性。

2. 二乙胺四乙酸溶液(EDTA 溶液) 用无钙、镁盐溶液溶解后,高压灭菌,分装小瓶, -20℃保存,使用浓度为0.02%。

3. 胶原酶溶液 配成10倍贮存液,使用浓度一般为1~5mg/ml。

(六)pH调整液

可调节培养液的pH。为了维持营养成分的稳定和延长贮存时间,在配制营养液时都不预先加入pH调整液。pH调整液都是单独配制,在培养液使用前加入。 NaHCO_3 是最常用的pH调整液。

NaHCO_3 溶液常用的浓度有7.4%、5.6%、3.7%三种。三蒸水溶解后,过滤除菌,分装小瓶,于4℃或室温保存。调节pH时, NaHCO_3 要逐滴加入,并不时摇动培养液,以防止加入过量。为了较长时间维持培养液恒定的pH,以利于细胞的生长和增殖,还可使用强缓冲液HEPES。

(七)抗生素液

培养液中加入适量抗生素,可预防操作不慎而产生的污染。

1. 双抗溶液(100×) 青霉素G 10 000 $\mu\text{g/ml}$ 、链霉素 10 000 $\mu\text{g/ml}$ 。主要预防细菌污染。

2. 庆大霉素溶液(200×) 10 000 $\mu\text{g/ml}$ 。主要预防细菌污染。

3. 四环素溶液(100×) 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 。主要预防支原体污染。

4. 两性霉素B溶液(100×) 500 $\mu\text{g/ml}$ 。主要预防真菌污染。

上述贮存液配制后,分装小瓶,冷冻保存。使用前按100倍或200倍稀释加入到培养液内,每小瓶最好一次用完。

(八)清洁液的配制和使用注意事项

1. 清洁液 见表1-3。

由于清洁液的腐蚀性极强,配制及应用时必须小心,并做好防护。选用耐酸塑料桶或不锈钢桶配制为宜。先将重铬酸钾溶于水(用玻棒搅拌助溶,有时不能完全溶解)。缓缓加入浓硫酸,切忌过急,否则将产热而发生危险(绝不可将重铬酸钾液倒入浓硫酸中)。清洁液配好呈棕红色,待变绿色时表明失效。

2. 矽酸钠洗液 贮存液(100×)。

矽酸钠80g、偏磷酸钠9g,加热溶在1 000ml水中存放。

使用时用水100倍稀释,将器皿放入后煮沸20min,冷却后冲洗,再用2% HCl浸泡2h后,自来水冲洗。矽酸钠洗液较清洁液安全,但价格较贵。

表1-3 清洁液配方

配方成分	常用方	弱液	次强液	强液
重铬酸钾(g)	100	50	100	60
清水(ml)	800	1 000	1 000	200
浓硫酸(ml)	200	90	160	800
硫酸浓度	20%	8%	14%	80%

第三节 细胞培养的基本技术

(一) 清洗

新采用和重新使用的培养器皿,都要严格清洗,以防各种有害物质对培养细胞产生损害作用。培养用的塑料器皿目前主要依靠进口,均已无菌密封包装,可直接使用。对于塑料瓶盖或胶塞等,水中浸泡后用2%NaOH煮沸10~20min,自来水中浸泡和蒸馏水漂洗2~3次,晾干备用。

细胞培养中的绝大部分器皿系玻璃制品,其清洗过程如下:

1. 浸泡 新使用或重复使用的玻璃器皿经5%盐酸溶液或自来水浸泡过夜,或煮沸30min,水洗,以去除新购进玻璃器皿所带有灰尘、铅、砷等物质,并消除其弱碱性。

2. 刷洗 浸泡后用软毛刷和优质的洗洁精进行刷洗。

3. 酸浸 刷洗后的玻璃制品酸浸前须适当晾干或烘干,以免造成酸浸液稀释,影响效果。将玻璃制品完全浸泡入清洁液中24h,清洁液具有极强酸蚀作用,操作过程需戴防护用品。清洁液配制方法见第二节。

4. 冲洗 浸酸后的玻璃器皿先用自来水充分冲洗,吸管需冲洗10min,瓶皿需每瓶灌满自来水、倒掉反复10次以上,不留任何酸浸液残迹,然后用蒸馏水漂洗2~3次,烘干备用。

所有培养器皿要求干净透明、无油烟、不能残留任何有害物质及化学药品等。

(二) 包装及消毒

1. 包装 器材经清洗烤干或晾干后,应严格包装后再行消毒灭菌处理。以防止消毒灭菌后再次遭受污染。包装材料常用包装纸、牛皮纸、硫酸纸、棉布、铝饭盒、玻璃或金属制吸管筒、纸绳等。

2. 消毒 消毒灭菌随物品的不同,而采用不同的方法。

- (1) 紫外线 主要用于消毒实验室空气、工作台面和一些不能使用其他方法消毒的培养器皿。进无菌室前或做完试验后,均应开灯照射30min进行消毒。紫外线照射60min可以消灭空气中大部分细菌。

- (2) 消毒剂 操作者皮肤、培养瓶盖和外壁常用碘酒、酒精消毒。无菌室内桌椅和物体的消毒可用0.1%新洁尔灭、过氧乙酸、来苏水等擦拭或浸泡。实验室、无菌室的消毒可用甲醛熏蒸:高锰酸钾5~7.5g,加40%甲醛10~15ml,混合放入一开放容器内,即可见白色甲醛烟雾出现,然后密闭房间24h即可。

- (3) 干热消毒 多用于玻璃器皿消毒,180℃干烤45~60min。

- (4) 湿热消毒 培养液、橡胶制品、塑料器皿等用68.95kPa(115℃)高压灭菌10min;布类、玻璃制品、金属器械等用103.43kPa(121℃)高压灭菌15~20min。

- (5) 滤过消毒 用孔径200~450nm大小的滤板可除去培养液和试剂中的细菌和霉菌等。用200nm孔径的滤板通过两次,可使支原体达到某种程度的去除,但不能除去病毒。

滤器分为负压和加压式两种。过滤的液体量很少时,可选用注射器微量滤膜滤器。

- (6) 钴照射 不耐热的塑料制品或一次性用品的灭菌可经包装后,用 γ 射线照射消毒。

(三) 无菌操作

是防止污染、决定培养是否成功的首要条件。由于体外培养细胞缺乏抗感染能力,在一切操作中要努力做到最大限度的无菌。工作前对手部须清洗消毒,进无菌操作室时戴口罩和穿工作服。不能用手直接接触及已消毒器皿内部。打开培养瓶前或封闭瓶口前须火焰烧灼瓶口等。

(四) 取材

成年组织成活和增殖困难,培养的生存期限常较短。从幼体组织特别是来源于胚胎组织以及肿瘤组织的材料易于培养。但是要注意胚