



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

国家示范性高职院校建设项目成果系列教材

细胞培养

(修订版)

兰蓉 主编 章静波 主审

XIBAO
PEIYANG

随书附光盘



化学工业出版社



普通高等教育“十五”国家级规划教材

国家示范性高职院校建设项目成果系列教材

细胞培养

(修订版)

兰蓉 主编 章静波 主审

XIBAO
PEIYANG



化学工业出版社

·北京·

本书为国家示范性高职院校一线教师和企业专家共同开发的教改成果教材。本教材打破传统的学科体系,以项目为载体,让学生在完成项目的过程中学习知识,训练技能,提升职业综合素质。教材中的项目主要取材于企业(或行业)的真实工作任务,包括 CHO 细胞的培养、CHO 细胞的冻存和复苏、鸡胚成纤维细胞的培养、VERO 细胞的大规模培养、抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的建立、胡萝卜悬浮细胞系的建立。每个项目都附有与之配套的实训音像资料。

本书适合高职高专院校生物技术相关专业的学生使用,也可供有关技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞培养(修订版)/兰蓉主编. —北京:化学工业出版社, 2011.5

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
国家示范性高职院校建设项目成果系列教材
ISBN 978-7-122-07868-1

I. 细… II. 兰… III. 细胞培养-高等职业教育-教材 IV. Q813.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 054670 号

责任编辑:李植峰

文字编辑:周 倜

责任校对:宋 玮

装帧设计:张 辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷:北京云浩印刷有限责任公司

装 订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 11 $\frac{3}{4}$ 字数 286 千字 2011 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:28.00 元

版权所有 违者必究

前 言

细胞培养技术是生物技术的重要组成部分，是生物学各研究领域的基本技术和技能，现已广泛应用在生物学、医学、生物制药等各个领域。目前，全国开设生物相关专业的高等职业院校共有 200 多所，绝大多数学校都开设细胞培养方面的课程，但有关细胞培养技术方面的书籍或教材，大部分都不适合高职院校的基于工作过程的教学改革需求。本教材以普通高等教育“十一五”国家级规划教材《细胞培养技术》为基础，融入“工学结合”的办学思路，聘请一批企业一线专家参与教材建设，开发企业真正用得上的教学内容，充分体现项目教学、行为引导式教学、任务驱动式教学等现代教法和学法。

教材中的项目均取材于企业（或行业）的真实工作任务，包括 CHO 细胞的培养、CHO 细胞的冻存和复苏、鸡胚成纤维细胞的培养、VERO 细胞的大规模培养、抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的建立、胡萝卜悬浮细胞系的建立。每个项目都附有与之配套的实训音像资料，时长约 1 小时，为教材使用者的自主学习提供了方便。

本书在编写与出版过程中，得到化学工业出版社与北京协和医学院的大力支持。北京协和医学院的章静波教授审阅了全部书稿，并对本书的构架和内容提出了许多建设性意见。北京协和医学院细胞中心的刘玉琴教授在配套音像资料的拍摄上做了大量工作。在此，作者谨向化学工业出版社、北京协和医学院等单位致以诚挚的感谢。

由于作者的经验和水平有限，书中难免会有不足之处，敬请广大读者与同仁批评指正。

编者
2010 年 2 月

目 录

项目一 CHO 细胞的培养	1	一、细胞的冻存	63
项目介绍	1	二、细胞的复苏	64
项目实施	2	三、细胞活性检查	65
任务一 CHO 细胞培养前的准备	2	四、细胞计数	65
一、培养用品的准备	2	项目拓展知识	66
二、培养用液的配制	6	一、细胞的运输	66
任务二 CHO 细胞的传代	10	二、骨髓瘤细胞的冻存	66
任务三 CHO 细胞培养的常规检查	11	三、细胞冻存的注意事项	67
项目思考	13	理论难点自测	67
项目知识链接	13	项目三 鸡胚成纤维细胞的培养	68
项目必备知识	13	项目介绍	68
一、动物细胞培养的概念	13	项目实施	68
二、培养细胞的生长类型和形态特征	14	任务一 组织块法培养鸡胚成纤维细胞	68
三、培养前的准备	16	任务二 消化法培养鸡胚成纤维细胞	70
四、动物细胞传代培养技术	32	项目思考	72
五、培养细胞的观察和检测技术	34	项目知识链接	72
项目拓展知识	39	项目必备知识	72
一、动物细胞培养发展史	39	一、组织块培养法	72
二、动物细胞培养的应用	42	二、消化培养法	74
三、动物细胞培养工作的基本要求和		项目拓展知识	74
工作方法	43	一、不同组织的取材	74
四、培养细胞分化状态的变化	44	二、组织材料的分离	75
五、培养细胞的生长特点	45	三、上皮细胞培养	77
六、培养细胞的生长和增殖过程	47	四、神经细胞培养	79
七、培养细胞的生长条件	49	五、肿瘤细胞培养	80
八、动物细胞培养实验室	52	理论难点自测	84
理论难点自测	56	项目四 VERO 细胞的大规模培养	86
项目二 CHO 细胞的冻存和复苏	58	项目介绍	86
项目介绍	58	项目实施	87
项目实施	58	项目思考	88
任务一 CHO 细胞的冻存	58	项目知识链接	88
任务二 CHO 细胞的复苏	59	项目必备知识	88
任务三 CHO 细胞的活性检查	60	一、动物细胞大规模培养技术概述	88
一、染色法	60	二、动物细胞大规模培养的方法	89
二、四唑盐 (MTT) 比色法	62	项目拓展知识	95
项目思考	63	一、动物细胞大规模培养技术的应用	95
项目知识链接	63	二、动物细胞生物反应器	95
项目必备知识	63	三、大规模培养技术的操作方式	100

理论难点自测	101	一、MS 培养基母液的配制和保存	123
项目五 抗人血白蛋白杂交瘤细胞系		二、MS 培养基的配制和灭菌	124
的建立	103	三、配制记录	125
项目介绍	103	任务二 胡萝卜愈伤组织的诱导	126
项目实施	104	任务三 胡萝卜细胞的悬浮培养	127
任务一 人血白蛋白免疫小鼠的准备	104	项目思考	127
任务二 骨髓瘤细胞和脾细胞的融合	104	项目知识链接	128
一、主要试剂的配制	104	项目必备知识	128
二、操作过程	105	一、植物组织与细胞培养	128
任务三 抗人血白蛋白杂交瘤细胞		二、植物细胞培养的培养基	131
的筛选	108	三、外植体的选择和预处理	137
一、试剂的配制	108	四、植物愈伤组织培养的一般程序	139
二、可溶性抗原的酶联免疫		五、植物细胞的悬浮培养	139
吸附试验 (ELISA)	109	六、植物细胞培养的环境条件	141
任务四 抗人血白蛋白杂交瘤细胞的		项目拓展知识	143
克隆培养	109	一、植物细胞培养的发展史	143
一、有限稀释法	109	二、植物细胞培养的应用	145
二、软琼脂法	110	三、植物细胞培养的实验室条件	147
任务五 杂交瘤细胞的冻存和复苏	110	四、植物细胞的固定化培养	152
一、杂交瘤细胞的冻存	110	五、单细胞培养	153
二、杂交瘤细胞的复苏	111	六、原生质体培养	156
项目思考	111	七、植物细胞的大规模培养	161
项目知识链接	111	理论难点自测	169
项目必备知识	111	附录 1 常用设备标准操作规程	172
一、单克隆抗体的概念	111	一、三洋 MCO-15AC 型二氧化碳培养	
二、杂交瘤技术制备单克隆抗体的基本		箱标准操作规程	172
原理	111	二、SZ-93 的双重纯水蒸馏器标准	
三、杂交瘤技术制备单克隆抗体的		操作规程	173
主要过程	112	三、37XB 型倒置显微镜标准	
项目拓展知识	117	操作规程	173
一、杂交瘤技术的诞生	117	四、高压灭菌锅标准操作规程	174
二、单克隆抗体的大量制备和纯化	117	五、超净工作台标准操作规程	174
三、细胞的基因转染技术	118	六、电热接种灭菌器标准操作规程	174
理论难点自测	121	七、气浴恒温振荡器标准操作规程	174
项目六 胡萝卜悬浮细胞系的建立	122	附录 2 细胞培养技术常用术语中	
项目介绍	122	英文对照	175
项目实施	123	参考文献	179
任务一 MS 培养基的制备	123		

项目一

CHO 细胞的培养^{【1.1】}

项目介绍

一、项目背景

中国仓鼠细胞（Chinese hamster ovary cell）是工程抗体和重组蛋白等生物技术药物生产的最为重要的表达系统。与其他表达系统相比，CHO 表达系统具有以下优点：具有准确的转录后修饰功能，表达的蛋白在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然蛋白分子；既可贴壁生长，又可以悬浮生长^{【1.2】}，且具有较高的耐受剪切力和渗透压能力；具有重组基因的高效扩增和表达能力，外源蛋白的整合稳定；具有产物胞外分泌功能，并且很少分泌自身的内源蛋白，便于下游产物分离纯化。目前已有越来越多的药用蛋白在 CHO 细胞中获得了高效表达，其中部分药物已投放市场，例如促红细胞生成素（EPO）、细胞集落刺激因子（GCSF）等。

假设你是一名刚分配到××生物制药公司细胞车间的细胞操作人员，你所在的公司通过培养 CHO 细胞生产促红细胞生成素，CHO 细胞的日常换液与传代工作是细胞车间的常规工作。你的部门领导要求你尽快熟悉 CHO 细胞日常换液与传代工作的标准操作规程，掌握细胞传代的准备方法、操作方法和细胞培养的常规观察方法，会正确填写工作记录，能解决传代培养过程的常见问题，能按时提交质量合格的 CHO 细胞。

二、项目目标

1. 能解释动物细胞培养的概念并说出其应用领域；能概述细胞生长方式；能归纳动物细胞的营养需求和生存环境；能概述动物细胞传代培养的方法。
2. 会配制细胞培养用液；会正确使用设备和器材完成 CHO 细胞的传代培养。
3. 能严格按程序办事，初步形成无菌意识。

三、项目任务

1. CHO 细胞培养前的准备。
2. CHO 细胞的传代培养。
3. CHO 细胞的常规检查。

【1.1】见项目知识链接：P13-P15。

【1.2】见项目知识链接：P16-P17。

项目实施

任务一 CHO 细胞培养前的准备^{【1.3】}

一、培养用品的准备^{【1.4】}

（一）玻璃器皿的清洗、包装和灭菌

1. 清洗

（1）浸泡 将上次实验后的玻璃器皿及时浸泡在清水中，注意让水完全浸泡，不要留有气泡。如果是新购置的玻璃器皿，先用自来水简单刷洗，再用 2% 盐酸溶液浸泡过夜后用自来水冲洗干净，其后处理步骤和重复使用的玻璃器皿相同。

（2）刷洗 收集浸泡后的器皿泡在洗衣粉液中，用优质软毛刷刷洗容器内外壁，尽量不要遗漏瓶底、边角等死角；对培养皿、烧杯等瓶口较宽的容器也可以用纱布擦洗。对培养有特殊要求的也可在浸泡洗衣粉液之前在电炉上用水煮沸，在水温上升到约 70℃ 时可加入少量化学纯 NaOH 以除去玻璃上残留的脂质成分。注意，洗衣粉最好选择质软、去污效果好的，不要选用溶解后还留有颗粒的劣质洗衣粉，以免划伤玻璃面。

（3）泡酸 用自来水充分冲洗玻璃上的洗衣粉液，在 10% 硝酸中浸泡过夜。配制酸液时应注意安全，泡酸之前尽量甩干器皿内的水，以延长清洁液的使用寿命。

（4）冲洗 手戴橡胶手套，小心取出酸缸中的玻璃器皿，用自来水充分清洗洗去酸液后，依次在去离子水、一蒸水和三蒸水中润洗 5~6 次。注意不要有酸液残留，防止酸液烧伤皮肤、衣物等；在去离子水等中润洗时可佩戴一次性塑料手套，以免皮肤中的脂质进入所洗玻璃容器。

2. 包装

（1）收集润洗后的玻璃容器于医用托盘中，置烘箱 50℃ 左右烘干。

（2）取出托盘，佩戴一次性塑料手套，先用硫酸纸（或铝箔）包住细胞瓶、烧杯、容量瓶、三角瓶及青霉素瓶等玻璃容器的瓶口（局部包装），再套一层牛皮纸，用线绳包扎。培养皿采用全包装，6~8 个一起叠放起来后用硫酸纸和牛皮纸包成筒状。吸管则先用少许脱脂棉将接口端堵塞，注意松紧适宜，过松易脱落，过紧不透气妨碍使用；然后装入玻璃消毒筒中封口。

3. 灭菌

将包装好的玻璃器皿放在托盘上送入电热鼓风干燥箱中，密闭箱门，160~170℃ 高温灭菌 90~180min，待烘箱温度降至室温后，取出托盘送入细胞培养室储物柜中存放。

4. 记录

玻璃器皿清洗、包装和灭菌工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-1。

【1.3】见项目知识链接：P16。

【1.4】见项目知识链接：P16-P26。

表 1-1 玻璃器皿清洗、包装和灭菌记录

清洗	浸泡用溶液	浸泡时间
	刷洗工具	冲洗流程
	三蒸水浸洗次数	烘干温度
包装	包装材料	包装方式
灭菌	灭菌方式	灭菌温度
操作人： 复核人： 日期：		

(二) 金属器械的清洗、包装和灭菌

1. 清洗

手术刀、解剖剪、止血钳、镊子等金属器械用后及时在清水中浸泡 5~10min，用纱布沾取洗涤液洗去表面血污、残余组织块及其他杂物等后，用自来水冲洗 10~15 次，再佩戴一次性塑料手套，用三蒸水漂洗 3~5 次，甩干，用酒精棉球擦拭。

2. 包装

将清洗后的金属器械用 2~3 层纱布简单包裹后，放入铝饭盒中准备灭菌。

3. 灭菌

将铝饭盒送入高压蒸汽灭菌锅中 121℃ 灭菌 30min。

高压蒸汽灭菌锅的使用方法如下。

- (1) 先在锅中加水，让水漫过产热的电阻丝，再放入装有灭菌物品的金属内胆，盖上锅盖，对称拧紧螺丝，关闭安全阀，打开放气阀。
- (2) 通电按下加热按钮，待放气阀处有热气冒出时关闭放气阀门，加热升温至所需温度。注意，一定要让锅内冷空气排尽，即要等到放气阀处有热气冒出时再关闭放气阀，否则，若锅内冷空气未排尽就关闭放气阀门继续升温过程中，灭菌锅容易发生爆炸等危险。
- (3) 待温度上升至 121℃ 时开始计时，实验者要守在灭菌锅旁及时关掉、打开加热开关，使温度维持在 121~126℃ 范围内 30min。
- (4) 关闭加热开关，待温度缓慢降至室温时打开放气阀放气，松开灭菌锅螺钉，打开锅盖，取出铝饭盒，送入无菌储物存放柜即可。

4. 记录

金属器械的清洗、包装和灭菌工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-2。

(三) 塑料制品、橡胶制品的清洗、包装和灭菌

1. 塑料制品的清洗、包装和灭菌

- (1) 实验用完后的塑料细胞瓶、培养皿、多空培养板等及时浸入清水中 6~8h 以上。如残留有较大附着物，可先用脱脂棉擦拭掉，再用流水冲洗干净浸入清水中浸泡。
- (2) 将在清水中浸泡好的塑料细胞瓶、培养皿等取出，自来水简单冲洗后，在 2% NaOH 液中浸泡过夜。

表 1-2 金属器械清洗、包装和灭菌记录

清洗	擦拭用溶剂	烘干温度
包装	包装材料	包装方式
灭菌	灭菌方式	灭菌温度
操作人： 复核人： 日期：		

- (3) 佩戴塑料手套取出浸泡过夜的用品，用自来水冲洗 8~10 次，再用 5% 盐酸溶液浸泡 15~30min。
- (4) 从盐酸中取出用具后用自来水冲洗多次，最后在三蒸水中漂洗 5~6 次，倒净器皿内的水，置 37℃ 恒温箱内晾干。
- (5) 紫外灯下照射 3h 以上。照射后，无菌存放于储物柜中。
- (6) 记录。塑料制品的清洗、包装和灭菌工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-3。

表 1-3 塑料制品清洗、包装和灭菌记录

清洗	自来水浸泡时间	清洗工具	流水冲洗次数
包装	包装材料	包装方式	
灭菌	灭菌方式	灭菌温度	
操作人： 复核人： 日期：			

2. 橡胶制品的清洗、包装和灭菌

- (1) 收集每次用后的橡胶制品，先在清水中浸泡 5h 以上，避免附着物干固。
- (2) 取出橡胶制品，用 2%NaOH 煮沸 10~20min，以除掉可能残留的蛋白质。
- (3) 佩戴塑料手套取出碱液中的橡胶制品，自来水充分冲洗后，1% 稀盐酸浸泡 30min。
- (4) 自来水冲洗 5~10 次后，用三蒸水润洗 3~5 次，晾干后准备灭菌。

如果是新购置的橡胶制品，往往先用自来水简单冲洗后，在 0.5mol/L 氢氧化钠溶液中煮沸 15min，自来水充分洗涤后再于 4% 盐酸溶液中煮沸 15min，自来水充分冲洗后，再用三蒸水漂洗 5 次以上，温箱中晾干后准备灭菌。

(5) 将晾干后的橡胶制品放在盒底铺有纱布的铝饭盒中，68947.6Pa (10 lbf/in²，115℃) 高压蒸汽灭菌 20min 后于储物柜中存放。

(6) 记录。橡胶制品的清洗、包装和灭菌工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-4。

(四) 滤器的清洗、包装与消毒

1. 正压除菌滤器的清洗、包装和消毒

- (1) 将用过的正压除菌滤器拆开并去除滤膜，放到含稀洗涤剂的水中，反复刷洗后，流

水冲洗 15min，沥干水，蒸馏水浸泡 24h，三蒸水浸泡 24h，晾干或 50℃ 烘干备用。

表 1-4 橡胶制品清洗、包装和灭菌记录

清洗	2% NaOH 煮沸时间	1% HCl 煮沸时间	蒸馏水煮沸时间
包装	包装材料	包装方式	
灭菌	灭菌方式	灭菌温度	
操作人： 复核人： 日期：			

(2) 在包装前应将正压除菌滤器滤膜装好，注意滤膜在使用前需经三蒸水浸泡过夜。为保证过滤效果，安装时在 0.22 μ m 滤膜（光面朝上）的上下各垫一层定性滤纸。然后用铝箔或牛皮纸包好正压除菌滤器的出液口和进气口，再用棉布将整个正压除菌滤器团团裹住，并捆好。

(3) 将正压除菌滤器于 121℃ 高压湿热灭菌 20min，注意灭菌时旋钮不要扭太紧，消毒后 50℃ 烘干备用，使用前在无菌环境中将旋钮扭紧。

(4) 记录。正压除菌滤器的清洗、包装和灭菌工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-5。

表 1-5 正压除菌滤器清洗、包装和灭菌记录

清洗	流水冲洗时间	蒸馏水浸泡时间	三蒸水浸泡时间
包装	包装材料	包装方式	滤膜安装方式
灭菌	灭菌方式	灭菌温度	
操作人： 复核人： 日期：			

2. 针头滤器的清洗、包装与消毒

针头滤器的清洗、包装与消毒同塑料制品，但包装前应将滤膜装好，安装滤膜的注意事项和要领同正压除菌滤器。

【注意事项】

① 取、放浸泡在 10% 硝酸中的实验用品时应戴橡胶手套，防止酸液溅到衣物、皮肤而造成伤害。

② 刷洗细胞瓶、培养板等细胞需贴壁生长的器皿时，应注意防止玻璃面的划伤，影响显微镜下细胞生长情况的观察，可以用纱布沾优质洗涤剂小心擦洗。

③ 电热鼓风干燥箱干热灭菌结束后，不要立即打开箱门，以免玻璃突然遇到冷空气炸裂，应让其温度降至 80℃ 以下方可打开烘箱。

④ 高压蒸汽锅湿热灭菌时注意应先将锅中冷空气排尽后再升温至所需温度，灭菌结束后待温度回落至室温时再开启放气闸取灭菌物品。

⑤ 塑料制品紫外灭菌时，应打开塑料容器的塞子（细胞瓶）、盖子（培养皿）等，灭菌

物品之间也不要互相叠放，以充分暴露灭菌部位位于紫外灯下。

二、培养用液的配制【1. 5】

(一) Hanks 液的配制和无菌处理

表 1-6 Hanks 液的配方

成分	含量/(g/L)	成分	含量/(g/L)
NaHPO ₄ · 2H ₂ O	0. 06	葡萄糖	1. 00g
KH ₂ PO ₄	0. 06g	NaCl	8. 00g
KCl	0. 4	CaCl ₂	0. 14g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0. 20g		

- ① 准确称取 0. 14g CaCl₂ 先溶解在装有 100ml 三蒸水的烧杯中。
- ② 准确称取 0. 20g MgSO₄ · 7H₂O 溶解在装有 100ml 三蒸水的另一烧杯中。
- ③ 按配方（见表 1-6）准确称取其他试剂依次溶解在盛有 650ml 三蒸水的烧杯中，注意应待前一种试剂完全溶解后，再溶解下一种成分，混匀。
- ④ 将①和②液缓慢倒入③中，并不时搅动，防止出现沉淀。
- ⑤ 将 0. 35g NaHCO₃ 溶解在 37℃100ml 三蒸水中。
- ⑥ 用数滴 NaHCO₃ 液溶解 0. 01g 酚红。
- ⑦ 将⑤和⑥液逐滴、搅拌加入到④液中。
- ⑧ 将⑦液移入容量瓶中，补加三蒸水定容至 1000ml，然后充分混匀。
- ⑨ 0. 22μm 微孔滤膜过滤除菌后分装，4℃冰箱内保存；或者先分装后，再 55158. 08Pa 高压蒸汽灭菌 10min，贴上标签 4℃冰箱内保存。
- ⑩ 记录。Hanks 液配制工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-7。

表 1-7 Hanks 液配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
NaCl		
KCl		
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O		
KH ₂ PO ₄		
葡萄糖		
NaHCO ₃		
酚红		
MgSO ₄ · 7H ₂ O		
CaCl ₂		
三蒸水至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

【1. 5】 见项目知识链接：P26-P32。

(二) D-Hanks 液的配制和无菌处理

① D-Hanks 液不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，配制方法简便；此外，D-Hanks 不含葡萄糖，配制好后可采用高压蒸汽灭菌法灭菌。D-Hanks 液的配制方法如下。

② 准确称取所需成分（表 1-6 中除 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖、 CaCl_2 以外的成分）依次溶解在盛有 750ml 三蒸水的烧杯中，混匀；与 Hanks 液的配制过程一样，D-Hanks 配制时也要注意应待前一种试剂完全溶解后，再溶解下一种成分。

③ 将烧杯中溶解充分的溶液转移到容量瓶中，补加三蒸水定容至 1000ml。

④ 分装后，经高压蒸汽锅 68947.6Pa 高压灭菌 20min，贴上标签 4℃ 冰箱内保存。

⑤ 记录。D-Hanks 液配制工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-8。

表 1-8 D-Hanks 液配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
NaCl		
KCl		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		
KH_2PO_4		
NaHCO_3		
酚红		
三蒸水至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

(三) 血清的灭活处理

① 选用与血清瓶同规格的对照瓶一个。

② 对照瓶内放入与血清等体积的水。

③ 对照瓶内插入准确的温度计，放入水浴锅中，接通电源，调节温度控制钮，使温度计温度保持在 56℃。

④ 血清瓶与带温度计的对照瓶一齐放入水浴锅中，待温度计所示温度上升至 56℃ 时，定时 30min。

⑤ 大瓶血清灭活后，进行分装。

⑥ 分装后，抽样做无菌试验，-70~-20℃ 保存。

(四) 0.25% 胰蛋白酶液的配制和无菌处理

① 准确称取胰蛋白酶干粉 250mg 于无菌烧杯中，先用灭菌的 D-Hanks 调成糊状，然后再补足灭菌的 D-Hanks 至 100ml，搅拌混匀，置磁力搅拌器上搅拌至溶解（室温和 4℃ 间断进行，室温高于 30℃ 要减少酶液在室温中的搅拌时间）。

② 过滤除菌，分装入青霉素瓶中（每瓶 1~5ml），低温冰箱（-20℃）保存备用。

③ 配好的胰蛋白酶溶液往往偏酸，在使用前可用无菌 7.4% NaHCO_3 溶液调 pH 至 7.2 左右。

④ 记录。0.25% 胰蛋白酶液配制工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记

录内容具体见表 1-9。

表 1-9 胰蛋白酶液配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
胰蛋白酶		
D-Hanks 液至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

(五) DMEM 培养基的配制和无菌处理

1. DMEM 基础培养基的配制

① 溶解培养基：将干粉培养基溶于 800ml 左右的三蒸水中，再用水洗包装袋内面 2~3 次，倒入培养液中。磁力搅拌或超声助溶，一般不要加热助溶。

② 补加试剂：干粉培养基充分溶解后，根据包装袋说明和试验需要加入 2.0g NaHCO₃、谷氨酰胺、丙酮酸钠、HEPES 等其他试剂。

③ 调 pH 值：补加试剂充分溶解后，根据实际情况用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.1，加水定容到 1000ml。

④ 过滤除菌：培养基边过滤边分装于小瓶中。

⑤ 记录。DMEM 基础培养基的配制工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-10。

表 1-10 DMEM 基础培养基配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
DMEM		
NaHCO ₃		
三蒸水至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

2. 完全培养基的配制

① 加小牛血清：根据基础培养基配制的量将小牛血清分装，冷冻保存（-20℃）。临用前加入小牛血清（10%~20%）。

② 加抗生素：一般抗生素终浓度青霉素为 100U/ml，链霉素为 100U/ml。市售青霉素为 80×10⁴U/瓶，可溶于 4ml 无菌三蒸水，每一升培养液中加 0.5ml 即可。市售链霉素为 100×10⁴U/瓶，可溶于 5ml 无菌三蒸水，每一升培养液中加 0.5ml 即可。无链霉素的情况下，用庆大霉素代替，终浓度调为 50~200U/ml。

如配制 100ml 的完全培养基：

基础培养基	90ml
小牛血清	10ml
青霉素	100U/ml
链霉素	100U/ml

③ 记录。DMEM 完全培养基的配制工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，

记录内容具体见表 1-11、表 1-12 和表 1-13。

表 1-11 10×10^4 U/ml 青霉素母液配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
青霉素		
无菌三蒸水至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

表 1-12 10×10^4 U/ml 链霉素母液配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
链霉素		
无菌三蒸水至		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

表 1-13 DMEM 完全培养基配制记录

试剂名称	理论用量/(g/L)	实际用量/(g/L)
DMEM 基础培养基		
小牛血清		
青霉素母液		
链霉素母液		
除菌方式为		
操作人： 复核人： 日期：		

【注意事项】

① Hanks 液配制时，为避免形成钙盐、镁盐的沉淀，含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 试剂要单独溶解。此外，因 Hanks 液含有葡萄糖成分，无菌处理最好采用滤过除菌；如果要用高压蒸汽灭菌法进行灭菌，可适当降低温度压力值、减少灭菌时间，一般 68947.6Pa（115℃）灭菌 15min 即可。

② 称取试剂时，要注意看清楚试剂分子式与要求是否相符，许多试剂是含有水分的水化物，与不含水分者的称量不同，应当先加以换算。

③ 血清在冷冻保存前最好分装成小瓶储存，解冻后尽量在短时间内用完，以免反复冻融造成血清质量的下降。血清从 -20°C 冰箱取出解冻时，应先在 4°C 冰箱中等其融化后再移入室温，以免温度的突然变化破坏血清中的某些营养成分；解冻后应参照血清供应商产品说明书，看是否需要灭活处理，如需要， 56°C 处理 30min 即可。

④ 新鲜三蒸水应储存于棕色磨口试剂瓶中，三蒸水存放时间不要超过 2 周，最好现制现用。

⑤ 培养液配好后，应先抽取少许放入培养瓶内，于 37°C 温箱内置 24~48h，以检测培养液是否有污染。

⑥ 每次配液量以使用 2 周左右为宜，一次配液不要太多，防止营养成分损失或者污染。

任务二 CHO 细胞的传代^{【1.6】}

1. 传代前准备

传代前先把培养基和 0.25%胰蛋白酶液从冰箱放到室温 1~2h，因为冰箱中的培养基温度与无菌室的温差很大，这样做可以防止细胞“感冒”。

2. 传代

① 倒弃陈旧培养液：取 80%或接近汇合的培养细胞，使培养瓶的细胞面向上，将培养液倒入盛污物三角瓶内（或用吸管吸出培养液），用约 2ml Hanks 液（或 D-Hanks 液）清洗 2~3 次。

② 加消化液：向培养瓶内加入消化液约 2ml，室温（37℃）下消化。

③ 观察消化细胞，掌握好消化时间：将培养瓶置于倒置显微镜下观察，当发现细胞胞质回缩，细胞与细胞之间相互接触松散、间隙增大、细胞变圆或出现蜘蛛网状结构时，立即将培养瓶直立终止消化（约需 3min）。用肉眼观察时可见培养瓶的细胞面出现类似水汽的一层结构，即出现发雾现象，这是因为细胞被消化后部分细胞回缩，细胞与细胞间出现间隙，有细胞的地方透光性降低，无细胞的地方透光性增加，使得细胞面透光性变得不均匀，产生水汽样结构。

④ 终止消化：向培养瓶内加入等量含小牛血清的培养液终止消化。拍打培养瓶，促使已松动的细胞从瓶壁脱落。然后用吸管将细胞从瓶壁吹打下来，1000r/min 离心 10min 去除胰蛋白酶。

⑤ 制作细胞悬液：离心完毕，加培养液约 5ml，用吸管吸取培养液轻轻反复吹打细胞，使细胞混匀形成细胞悬液。吹打勿用力过猛，以免伤害细胞。

⑥ 接种和培养：细胞悬液按 1：2 或 1：3 的比例分配，接种到 2~3 个培养瓶内，再向各瓶补加培养液到 5ml，作标记后置培养箱中培养。此后每 3 天换液 1 次，并注意观察细胞传代培养后的形态变化。

⑦ 记录。CHO 细胞的传代工作完成后，操作人员应及时完成相应记录工作，记录内容具体见表 1-14。

表 1-14 CHO 细胞的传代记录

1. 去废液	去废液的方式			
2. 漂洗	漂洗用溶液	漂洗次数	漂洗目的	
3. 消化	消化液的用量	消化温度	消化时间	终止消化的溶液
4. 离心和计数	离心速度	离心时间	细胞浓度	细胞计数工具
5. 接种培养	每瓶接种量	每瓶培养液用量	标记	培养条件
6. 观察	培养液颜色	培养液清亮度	污染与否	
操作人：_____ 核人：_____ 日期：_____				

【1.6】见项目知识链接：P32-P34。

任务三 CHO 细胞培养的常规检查^{【1.7】}

1. 营养液 pH 值的检查

新鲜培养液呈红色或橙红色 (pH7.2 左右), 适合多数细胞生长。细胞生长旺盛或细胞接种量过大, 代谢产生酸性物质积累增多, 营养液酸化变黄, pH 值下降; 若培养瓶瓶塞刷洗不洁, 残留碱性物质, 或细胞接种量过少, 细胞生长缓慢, 致营养液 pH 值升高, 颜色变紫红色。上述两种情况对细胞都将产生不利影响, 严重时细胞脱落死亡, 要及时更换营养液。更换营养液的时间可依营养物消耗而定, 一般情况下, 每周换液 2 次, 每次换半量或 1/3 量。

(1) 培养液全换方法

- ① 无菌操作翻转培养瓶, 使细胞面朝上。
- ② 火焰消毒瓶口后, 倒去原培养液。
- ③ 从培养瓶侧面加入新培养液。
- ④ 再翻转培养瓶, 使培养液覆盖细胞面, 瓶口消毒加塞。

(2) 培养液换半量方法

- ① 瓶口消毒。
- ② 从瓶侧面吸去原培养液量的一半。
- ③ 从瓶侧面补加等体积新培养液。
- ④ 翻转培养瓶, 使培养液覆盖细胞面, 瓶口消毒加塞。

2. 细菌污染的检查

培养液变混浊, 常由细菌污染所致。污染的培养物在显微镜下可见大量细菌, 细胞出现死亡, 并有大量细胞碎片 (图 1-1)。

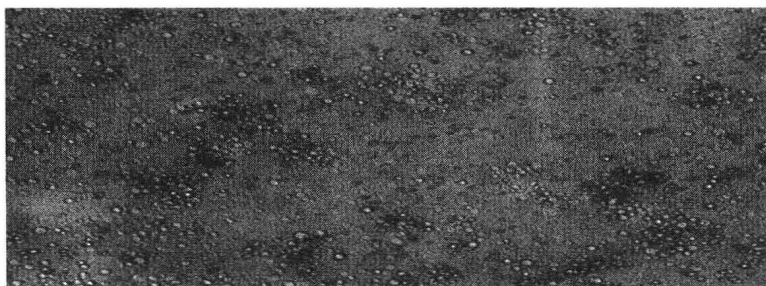


图 1-1 被细菌污染的细胞眼观及镜检所见 (镜检见细胞死亡, 背景不清晰, 密布小黑点)

(引自: 周珍辉, 动物细胞培养技术, 2006)

3. 真菌污染的检查

霉菌污染时易于发现, 用肉眼观察即可见到生长的霉菌菌落。菌落大多为白色或浅黄色小点, 漂浮于培养液表面, 有的散在生长。镜检时可见纵横交错的丝状、瘤状或树枝状菌丝, 穿行于细胞之间。念珠菌或酵母菌形态呈卵圆形, 散在于细胞周边和细胞之间 (图 1-2, 图 1-3)。

【1.7】见项目知识链接: P34-P39。