



细胞工程 模块实验教程

詹亚光 齐凤慧 滕春波 编



科学出版社



细胞工程 模块实验教程

陈建忠 吕凤娟 陈建忠 编

科学出版社

细胞工程模块实验教程

詹亚光 齐凤慧 滕春波 编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书为高等学校细胞工程实验教学用书,由7个模块组成。第一模块为细胞工程的基础技术;第二模块为植物组织培养及快速繁殖技术;第三模块为植物细胞悬浮培养技术;第四模块为植物体细胞胚发生;第五模块为植物原生质体的分离与融合;第六模块为植物细胞生物反应器与细胞次生代谢;第七模块为动物细胞工程。本书体系完整合理、内容成熟新颖,大部分实验内容结合教师的科研成果,力求图文并茂、简明直观地勾勒出一些细胞工程实验的基本原理和方法,便于读者学习和掌握。

本书可供林学、生物学、生物工程、生物技术等专业学生使用,也可供相关领域的教学和科研人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程模块实验教程/ 詹亚光, 齐凤慧, 滕春波编. —北京: 科学出版社, 2012

ISBN 978-7-03-032923-3

I. ①细… II. ①詹…②齐…③滕… 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(2011)第247859号

责任编辑: 丛楠 张琬/责任校对: 张怡君

责任印制: 张克忠/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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年1月第一版 开本: 720×1000 1/16

2012年1月第一次印刷 印张: 10 1/4

字数: 210 000

定价: 25.00元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

细胞工程是现代生物工程技术中最具生命力的组成部分之一，其应用领域广泛，涉及农业、食品、医药、化工和能源等许多方面。因此，细胞工程课程在生物工程与生物技术人才培养中具有重要的作用。目前越来越多的科技工作者开始或正在从事细胞工程领域的开发工作，一些高校的生命科学或医学等专业也开始重视这方面的教育。但是目前关于细胞工程实验教学的书籍极少，尤其是以木本植物为主要试材的更为少见。虽然近几年来出现了一些关于植物细胞或组织培养方面的实验书籍，但其范围难以全面体现细胞工程技术的知识体系。鉴于上述原因，需要有一本系统反映细胞工程基本原理、技术方法、注意事项和最新研究发展，突出介绍操作难度较大的树木细胞工程技术的书籍作为高校实验教材或供科研工作参考。本书就是在这样的指导思想下产生的，希望能起到抛砖引玉的作用。

本书以模块的形式组成，共包括 7 个模块，每个模块又由几个相互衔接的实验组成，包括实验目的、实验原理、实验准备、实验方法、实验结果、注意事项等内容。第一模块为细胞工程的基础技术；第二模块为植物组织培养及快速繁殖技术；第三模块为植物细胞悬浮培养技术；第四模块为植物体细胞胚发生；第五模块为植物原生质体的分离与融合；第六模块为植物细胞生物反应器与细胞次生代谢；第七模块为动物细胞工程。

本书具有以下特色：

(1) 以细胞工程的关键技术和应用为主线，将全书分为 7 个模块，每个模块的实验内容相互联系，力争全面系统地介绍基本的和最新的内容，使学生通过实验能够理解并掌握研究内容，提高学生的研究能力。

(2) 大部分实验内容结合教师的科研成果，将最新的科研成果和技术引入实验教学中，对培养学生的创新能力、创业意识和创业方向都很有帮助。

(3) 每个模块都没有注意事项、建议及知识点，能够提高学生实验操作中的成功率，并丰富学生的实践经验，使他们尽快掌握技巧。

(4) 本书力求图文并茂、简明直观地勾勒出一些基本原理和方法。

本书的第一模块、第二模块由詹亚光编写；第三模块至第六模块、第七模块的 7.1 至 7.3 和附录由齐凤慧编写；第七模块的 7.4 至 7.8 由滕春波编写。全书由詹亚光统稿。本书成书过程得到了科学出版社编辑的帮助，在此深表谢意。同时，非常感谢东北林业大学生命科学学院由香玲副教授的支持，她为本书提供了精美的图片。此外，本书引用和参考了一些文字资料和图片，在此向有关作者表示衷心的感谢。

限于编者的学识和水平，本书在内容和形式上难免有疏漏的地方，我们殷切希望使用本书的师生和其他读者指正。

编 者

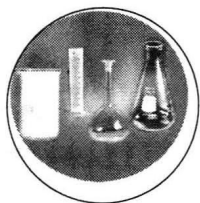
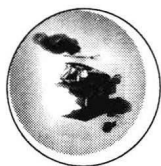
2011 年 6 月于东北林业大学

目 录

前言

1. 模块一 细胞工程的基础技术	1
1.1 细胞培养实验室常用仪器及设备	2
1.2 细胞培养用品的清洗、消毒与灭菌	8
1.3 细胞工程实验报告的书写	14
2. 模块二 植物组织培养及快速繁殖技术	16
2.1 植物培养基母液的配制与保存	19
2.2 培养基的配制与灭菌	23
2.3 植物外植体消毒、接种及愈伤组织诱导	27
2.4 植物器官分化与植株再生	33
2.5 植物无菌苗的生根培养	36
2.6 植物组培苗的移栽与驯化	39
3. 模块三 植物细胞悬浮培养技术	44
3.1 植物细胞悬浮培养与生长量的测定	45
3.2 植物单细胞的分离	50
3.3 植物单细胞的培养	52
3.4 植物悬浮培养细胞计数和活力测定	59
3.5 植物悬浮培养细胞的植板率和有丝分裂指数测定	62
3.6 植物细胞的超低温保存	65
4. 模块四 植物体细胞胚发生	68
4.1 植物的体细胞胚发生	69
4.2 植物体细胞胚植株再生	73
5. 模块五 植物原生质体的分离与融合	76
5.1 植物原生质体分离与纯化	78
5.2 植物原生质体活力测定	84
5.3 植物原生质体培养	87

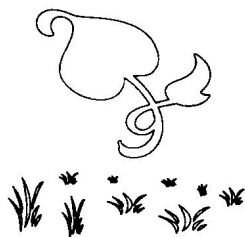
5.4 植物原生质体融合.....	90
6. 模块六 植物细胞生物反应器与细胞次生代谢	95
6.1 植物体细胞胚生物反应器大规模培养.....	96
6.2 HPLC 法检测植物细胞次生代谢产物含量	99
6.3 植物细胞诱导过程中相关酶活力变化检测	104
7. 模块七 动物细胞工程	114
7.1 动物细胞培养的基本无菌操作	117
7.2 动物细胞培养基本用液的配制与保存	119
7.3 动物细胞计数与存活实验	125
7.4 原代小鼠胚胎成纤维细胞的制备及培养	127
7.5 哺乳动物细胞的传代培养	131
7.6 动物细胞冻存与复苏	134
7.7 磷酸钙沉淀法介导细胞转染	138
7.8 小鼠骨髓间充质干细胞分离培养	141
主要参考文献.....	145
附录.....	147



1. 模块一

细胞工程的基础技术

细胞工程研究的主要内容是细胞的培养和细胞的遗传操作，因此，需要建立一个能够开展细胞培养工作的实验室。同时，细胞培养要求在无菌条件下进行，所以，还要掌握实验仪器设备的使用、器械消毒和外植体灭菌方法，以保证细胞培养的顺利进行。



1.1 细胞培养实验室常用仪器及设备

1.1.1 实验目的

了解细胞培养实验室仪器设备，掌握各种仪器的使用方法。

1.1.2 细胞工程实验室的设置

细胞工程实验室一般要包括图 1-1 所示的准备室、培养室、无菌操作室、显微镜室和精密仪器室等部分，还须有鉴定室和驯化移栽室等。

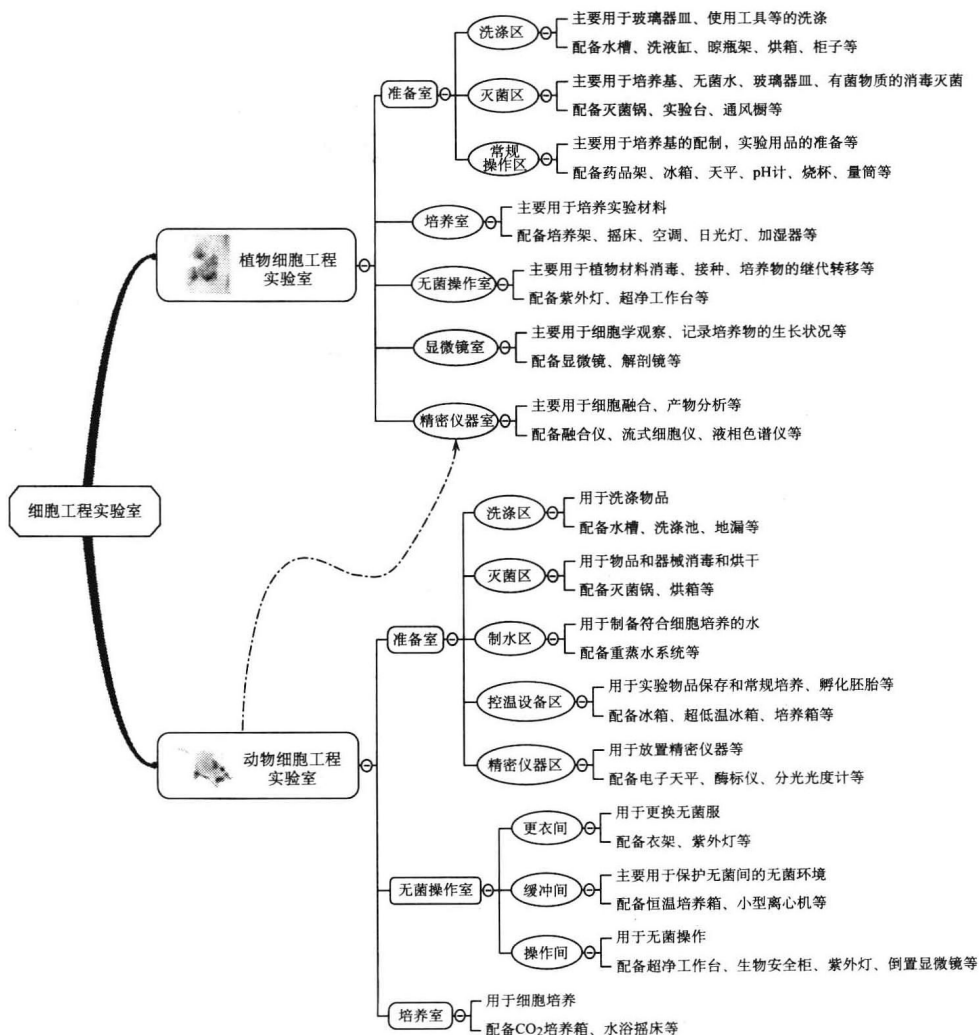


图 1-1 细胞工程实验室组成示意图

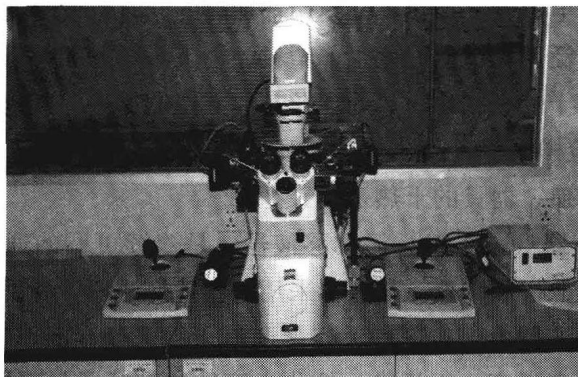
细胞工程常用的仪器设备有：

(1) 高压灭菌锅。高压蒸汽灭菌法是目前灭菌效果最好、应用范围最广的灭菌方法。该方法是在一个密闭蒸锅——高压灭菌锅（图 1-2）内进行的。加热时蒸汽不能外溢，容器内温度随蒸汽压的增加而升高，杀菌力也大为增强。通常在 0.15MPa 的压力下，其温度可达 121℃，维持该温度 15～30min，可杀死包括细菌芽孢在内的所有微生物。此法适用于耐高温和不怕潮湿物品的灭菌。高压灭菌锅是目前实验室最常用的灭菌仪器，广泛用于培养基、玻璃及金属器皿和带菌废弃物的灭菌。



图 1-2 高压灭菌锅

(2) 显微镜。显微镜（图 1-3）和放大镜起着同样的作用，就是把近处的微小物体成一放大的像，以供人眼观察，只是显微镜较放大镜可以具有更高的放大率。物体 AB 位于物镜前方，离物镜的距离为物镜焦距的 1～2 倍。所以，它经物镜以后，形成一个倒立的放大实像 A'B'。A'B' 位于靠近两倍焦距的位置上，再经目镜放大为虚像 A''B'' 后供人眼观察。目镜的作用与放大镜一样，不同的是人眼通过目镜看到的不是物体本身，而是物体经物镜后形成的放大了一次的像。显微镜通常用来观察细胞形态、结构、细胞密度等。



A



B

图 1-3 显微镜

A. 倒置显微镜；B. 正置显微镜

(3) 恒温水浴锅。恒温水浴锅(图 1-4) 传感器将水槽内水的温度转换为电阻值, 电阻值经过集成放大器的放大、比较后, 成为输出控制信号, 有效地控制电加热管的平均加热功率, 使水槽内的水保持恒温。恒温水浴锅在细胞工程实验中通常用于细胞次生代谢产物的提取。



图 1-4 三孔电热恒温水浴锅

(4) 电热鼓风干燥箱。电热鼓风干燥箱(图 1-5) 主要由箱体、电加热器、温控仪、风机、风对流循环风道、进风风道、出风风道和出风口大小调节装置等组成。电加热器进行加热; 温控仪控制和显示温度; 风机的作用是使干燥箱内的空气水平或垂直地对流循环, 箱内空气被吹送到电加热器上加热后回到工作室, 然后由工作室吸入风机再吹到电热管上加热, 不断循环加热的同时也使箱内温度更加均匀。电热鼓风干燥箱广泛用于机电、化工、塑料、轻工等行业和科研单位对各种产品、试品进行烘培、干燥、固化、热处理及其他方便的加热。其具体用途有: 玻璃器皿的干燥; 实验样本、食品、化学物质的热变性、热硬化、热软化、水分排除; 生物工程器皿、器具的干热杀菌。

(5) 移液器。可调式移液器(图 1-6), 简称移液器, 是连续可调的通用微量移液器, 适用于液体的精确取样和转移。移液器采用空气置换原理, 利用可拆卸的一次性吸头转移液体。移液器由定位部件、容量调节指示部分、推顶装置、活塞套和吸液嘴等组成, 采用高强度、无污染、抗化学腐蚀的高分子材料制成。移液器的常用量程为 $10 \sim 1000 \mu\text{L}$ 。

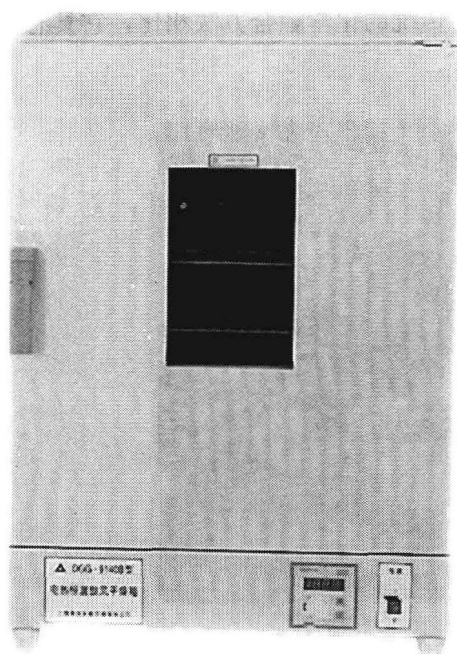


图 1-5 电热鼓风干燥箱

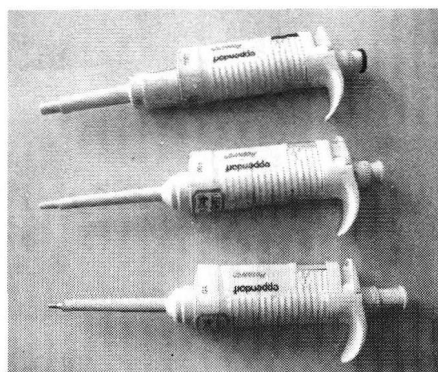


图 1-6 不同量程的移液器

(6) 电子分析天平。电子分析天平(图 1-7)可按称量范围和最小分度值分为常量电子分析天平(100~200g 和 0.01~1mg)、半微量电子分析天平(30~100g 和 1~10g)、微量电子分析天平(3~30g 和 0.1~1g)和超微量电子分析天平(3~5g 和 0.1g 以下)。

(7) 细胞融合仪。细胞融合仪(图 1-8)是利用一定值的频率、电压的交流电场,使处于一定间隔的、平行的两电极间的原生质体排列成串珠状。再利用定值的高压



图 1-7 电子分析天平

直流脉冲电场对细胞膜造成可逆击穿,从而诱导相互接触的细胞发生融合。它可以满足所有体外和体内电穿孔研究的需要,并可对预处理的动、植物细胞进行融合。该仪器适用于细胞杂交,可在倒置显微镜下直接进行观察,可用于微生物

学、动物医学、生物工程等方面的研究。与传统的化学融合方法相比，它具有对细胞无毒性、融合效率高、方便快捷等特点。

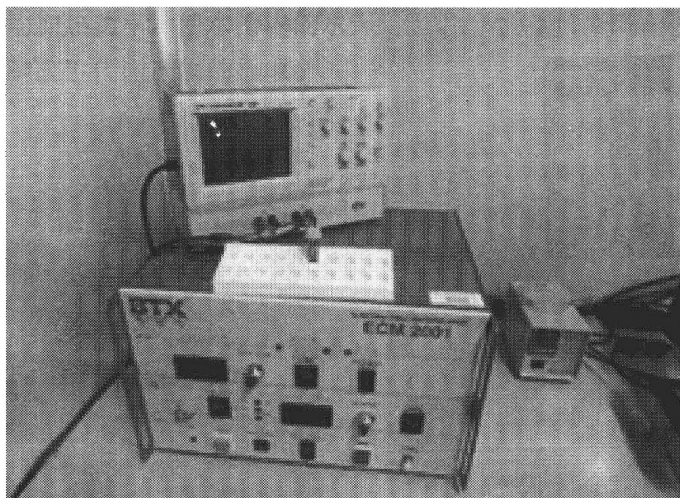


图 1-8 细胞融合仪

(8) 高效液相色谱仪。高效液相色谱仪的系统由储液器、泵、进样器、色谱柱、检测器、记录仪等几部分组成(图 1-9)。储液器中的流动相被泵入系统,样品溶液经进样器进入流动相,被流动相载入色谱柱(固定相)内,由于样品溶液中的各组分在两相中具有不同的分配系数,在两相中做相对运动时,经过反复多次的吸附-解吸的分配过程,各组分在移动速度上产生较大的差别,被分离成单个组分依次从柱内流出,通过检测器时,样品浓度被转换成电信号传送到记录仪,数据以图谱形式打印出来。高效液相色谱仪具有高分辨率、高灵敏度、速度

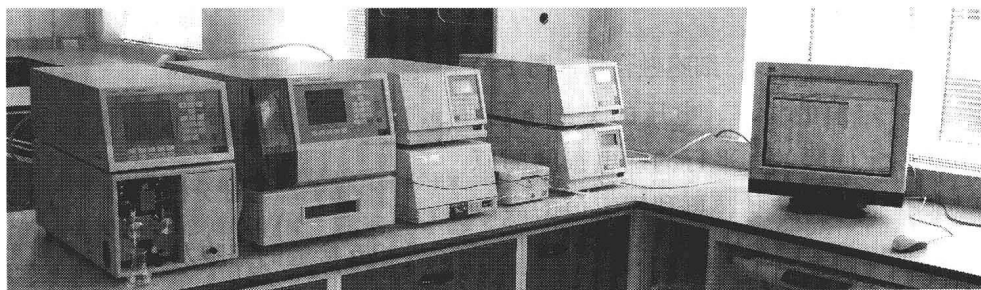


图 1-9 高效液相色谱仪

快、色谱柱可反复利用、流出组分易收集等优点，因而被广泛应用于生物化学、食品分析、医药研究、环境分析、细胞工程等各种领域，在细胞工程领域主要用于细胞产物的分析。

(9) 流式细胞仪。流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 包括流动室及液流驱动系统, 激光光源及光束成形系统, 光学系统, 信号检测与存储、显示、分析系统和细胞分选及浓缩系统 5 个部分。流动室是仪器核心部件, 被测样品在此与激光相交。流动室由石英玻璃制成, 中央有一长方形小孔, 供单个细胞通过。FCM 用于免疫组织化学研究, 关键是对细胞进行免疫荧光染色, 将待测细胞染色后制成单细胞悬液。用一定压力将待测样品压进活动室, 不含细胞的磷酸缓冲液在高压下从鞘液管喷出, 鞘液管进口方向与待测样品形成一定角度, 这样, 鞘液就能够包绕着样品高速活动, 组成一个圆形的流束, 待测细胞在鞘液的包被下单行排列, 依次通过检测区域, 从而得到准确的细胞荧光信息。

(10) 二氧化碳培养箱。二氧化碳培养箱 (图 1-10) 是通过在培养箱箱体内模拟形成一个类似细胞/组织在生物体内的生长环境, 如稳定的温度 (37°C)、稳定的 CO_2 水平 (5%)、恒定的酸碱度 ($\text{pH}7.2 \sim 7.4$)、较高的相对饱和湿度 (95%), 来对细胞或组织进行体外培养的一种装置。二氧化碳培养箱广泛应用于细胞、组织培养和某些特殊微生物的培养, 是开展免疫学、肿瘤学、遗传学及生物工程所必需的关键设备, 在细胞工程领域主要应用于哺乳动物细胞分泌物的收集, 各种物理、化学因素的致癌或毒理效应, 体外授精 (*in vitro fertilization*, IVF), 干细胞药物筛选等。

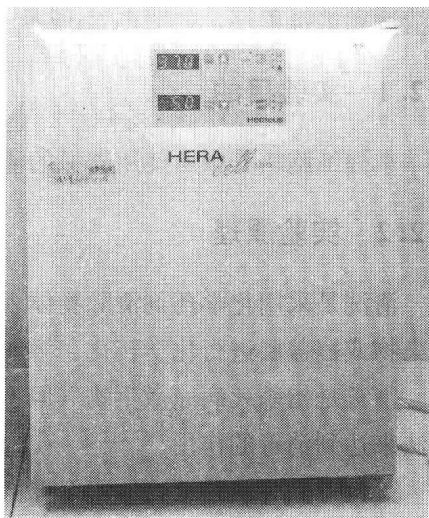


图 1-10 二氧化碳培养箱

细胞工程常用的仪器设备还包括摇床、分光光度计、超净工作台等一些常规的设备。

1.1.3 实验内容

在老师的指导下, 进行各仪器的操作训练, 熟练掌握各仪器的使用技术。

1.1.4 注意事项与建议

(1) 认识和熟悉各种设备和仪器，在老师的示范下掌握各仪器的用法后，才可以自己动手操作。

(2) 按照仪器的用途进行分类，有利于记忆并较快地掌握本实验内容。

1.2 细胞培养用品的清洗、消毒与灭菌

体外人工培养的细胞缺乏抗感染能力，所以能否防止污染是决定培养成败的关键。即便使用设备完善的实验室，若实验者粗心大意，技术操作不规范，也会导致细胞污染。无菌技术的原理是阻止无菌的、未被污染的物体与任何有菌的、被污染的物体相接触。任何直接或间接地与培养细胞相接触的物体必须经过严格的清洗和消毒程序，如图 1-11 所示。

1.2.1 实验目的

掌握细胞培养中所使用器械的清洗与消毒方法。

1.2.2 实验原理

清洗是采用化学药剂清除物体表面污垢的方法，它是借助清洗剂对物体表面污染物或覆盖层进行化学转化、溶解、剥离以达到脱脂、除锈和去污的效果。

消毒是指杀死病原微生物（但不一定能杀死细菌芽孢）的方法。通常用化学方法来达到消毒的作用。

灭菌可除去或杀灭物体中全部微生物。应根据微生物的种类、污染状况、被污染物体的性质与状态，选择单独或组合灭菌方法。能否达到灭菌的目的，通常要采用无菌实验法进行判定。对灭菌操作时采用的温度、压力等是否适合灭菌的条件，必须得到十分的确认。在灭菌条件选定后，还要进行灭菌效果的确认，以保证使用的各种灭菌条件适合于要杀灭的目标菌。灭菌的程度受灭菌时间与灭菌剂强度的制约。灭菌常用的方法有化学试剂灭菌法、射线灭菌法、干热灭菌法、湿热灭菌法和过滤除菌法等。可根据不同的需求，采用不同的方法，如培养基灭菌一般采用湿热灭菌法，空气灭菌则采用过滤除菌法。

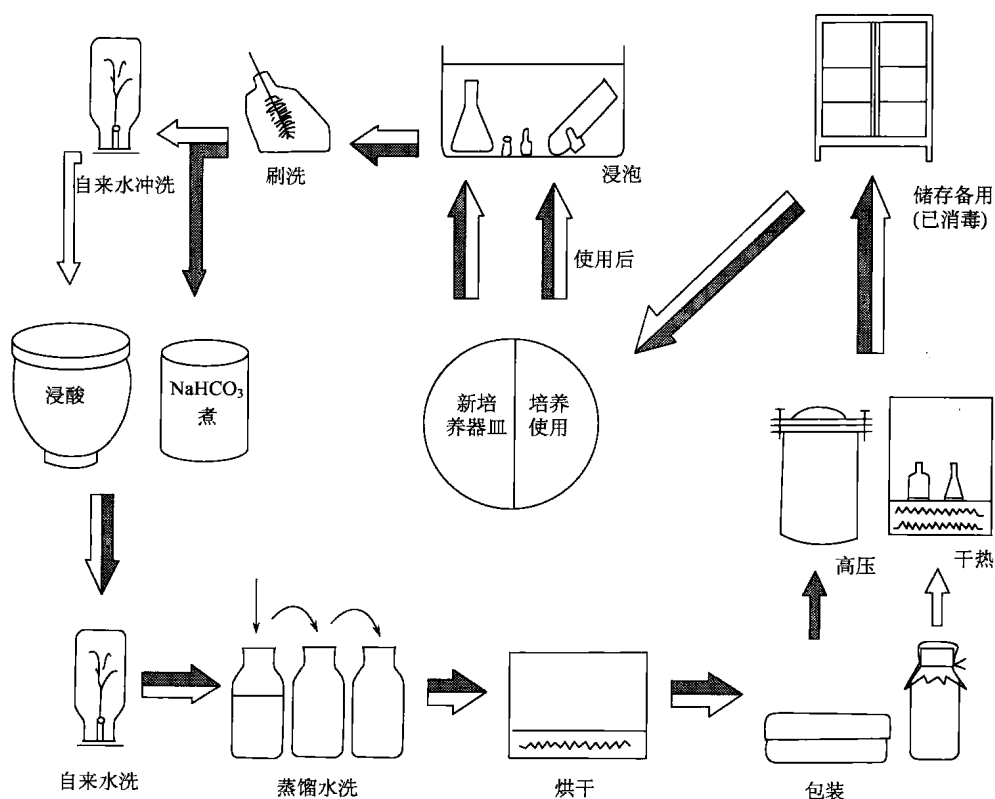


图 1-11 无菌培养用品清洗和消毒程序 (鄂征, 2001)

白箭头：玻璃制品；黑箭头：橡胶制品

1.2.3 实验准备

1.2.3.1 仪器设备

超净工作台、超声波清洗器、高压灭菌锅、干燥箱、过滤器、紫外灯、0.22 μ m 微孔滤膜、电磁炉、电子分析天平、铝箔、试管刷等。

1.2.3.2 实验材料

玻璃器皿（三角瓶、烧杯、量筒、血清瓶、试剂瓶、血清瓶的螺口盖等）、橡胶塞、塑料器皿（离心管、吸头等）、眼科剪刀、眼科镊、金属饭盒、纱布等。