

[英] D. O. 霍尔 S. E. 霍金斯 编

细胞生物学 实验指导

科学出版社

内 容 简 介

本书比较全面而详细地介绍了细胞生物学各个领域常用的实验方法。书中包括由 32 个实验室提供的 88 个实验方法。全书共分十四章，每章中的实验由简单的开始，继之以较复杂的。每一个实验均由长期从事这方面教学和科研工作的专家执笔，资料丰富，为实验的成功提供了可靠的保证。可供从事细胞生物学的科研工作者和有关大专院校教师、学生阅读参考。

D. O. Hall and S. E. Hawkins

LABORATORY MANUAL OF CELL BIOLOGY

The English Universities Press LTD. 1975

细胞生物学实验指导

【英】D. O. 霍尔 S. E. 霍金斯 编

李申德 施秉仪 译

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1985 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1985 年 1 月第一次印刷 印张：20 3/4

印数：0001—6,000 字数：474,000

统一书号：13031·2794

本社书号：3835·13-10

定价：4.85 元

译 者 的 话

细胞生物学是一门比较年青的学科。七十年代以来,国外大专院校的生物系才把它作为独立的学科进行讲授。为了深入领会和掌握课程的内容,必须进行有关的实验。有鉴于此,英国细胞生物学协会邀请多年从事这方面教学和科研工作的专家集体编写了这本细胞生物学实验指导。

本书比较全面而详细地介绍了细胞生物学各个领域中最常用的实验方法。由于作者都具有丰富的理论知识和实践经验,而且编写时力求详尽,从而为实验的成功提供了可靠的保证。每一实验都包括理论基础,必需的设备、操作规程、记录结果、讨论、范围和应用以及对教师的提示等,并附有参考文献,使学生们不仅可掌握实验方法,而且可把实验结果同理论知识紧密地联系起来。

我国大专院校的有关专业特别是生物系目前已普遍开设细胞生物学的课程,所以迫切需要一本细胞生物学实验指导。其他有关的科研单位也广泛地开展细胞生物学的科研工作,需要掌握有关的实验方法。因此,我们把这本书推荐给读者,希望能为促进我国细胞生物学的发展贡献微薄的力量。

本书第十一十四章由施秉仪译、章静波校。由于内容涉及的范围很广,而我们的学识有限,译文中错误和不妥之处在所难免,敬希广大读者批评指正。

中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室

李申德

前 言

在许多学校、甚至是学院或大学里,细胞生物学被看作是一门理论的而不是实验的课程。事实上,设置细胞生物学课堂实验这一想法,看来是为了满足某些感到困惑的教师们的需要。对于广大从事细胞生物学这门重要学科的实验基础工作者来说,这本实验指导将会受到特别的欢迎。本书的出版,特别应该归功于编者戴维·霍尔 (David Hall) 教授和 S. 霍金斯 (Shirley Hawkins) 博士,以及各位作者。在介绍这本细胞生物学实验指导时,我有幸代表英国细胞生物学协会对他们表示感谢。

M. G. P. Stoker, M. D., F. R. S.

英国细胞生物学协会名誉主席

皇家癌研究基金实验室

林肯法学会广场

伦敦 WC2A 3PX

引 言

最近五到八年以来,不论在生物学还是医学科学中,细胞生物学已成为一门独立的课程,对大学生进行讲授。但是为了讲授得好,教师们必须大量地依赖各种较简单和较复杂的实验技术。学生必须面对经常不同于生物化学的方法学,而且为了充分了解细胞功能,这种方法学还需要不同的操纵技术。

目前,缺少一本细胞生物学的实验方面的书籍,因此教师们不得不煞费苦心地准备不同的实验教材。有鉴于此,英国细胞生物学协会委托编写了这本实验指导,其目的在于扩展现有课程,并鼓励为大学生和进修学生开设新的课程。

所有协会的成员都被邀请来提供他们行之有效的实验方法,并用标准的格式书写,以便提供最大量的信息,即便其中有些过多的内容也好。我们感到,过多的信息要比过少的信息好一些。我们在编写每一篇原稿时都本着这一原则,这样,教师、技术员和学生能够很方便地找到进行各种实验的方法。

本书的全貌取决于收集到的实验方法。我们把它们分成14个大章,而在每一章中,我们试着从较简单的实验开始,继之以较为复杂的实验。这种区分完全是主观的,但要设置对学生既有益而又有兴趣的简单实验,是比较困难的。

我们乐于从应用这些实验方法的读者中听取肯定或否定的意见,因为这将有助于我们改进教学和改进本协会未来的出版工作。本协会还设置了一个教育委员会,从事有关细胞生物学教学方面的一切工作。本书的一切收入将用于教育委员会推进教学的工作。

D. O. HALL

SHIRLEYE. HAWKINS

伦敦皇家学院大学

1973年5月

目 录

前言	(vii)
引言	(viii)
第一章 细胞和组织培养技术	(1)
1. 细胞系的传代: 在瓶中进行单层细胞培养 (A. M. Whitaker)	(1)
2. 细胞系的传代: 在试管中进行单层细胞培养 (A. M. Whitaker)	(4)
3. 细胞系的传代: 盖玻片培养物的制备 (A. M. Whitaker)	(6)
4. 甘油和二甲亚砜对细胞冻存的保护作用的比较 (R. I. Freshney)	(7)
5. 细胞培养中细胞行为和形态的特点 (A. S. G. Curtis)	(11)
6. 蛙细胞培养 (P. M. Godsell & M. Balls)	(15)
7. 植物(小无花果树, sycamore)细胞悬浮培养的生长型及其在植物生长激素作用下的变化 (H. E. Street)	(18)
8. 两栖类心脏的器官培养 (M. Balls & R. S. Worley)	(23)
第二章 示踪技术	(26)
1. 测定放射性方法的比较。大肠杆菌对 1-(^{14}C) 和 2-(^{14}C) 乙酸盐的氧化作用 (J. M. Ashworth)	(26)
2. DNA 前体的研究 (R. L. P. Adams)	(29)
3. 器官培养中 DNA 合成与 ^3H - 胸苷摄取之间的相互关系 (J. D. Simnett)	(32)
4. 在鸡红细胞中氘标记的亮氨酸和尿苷的掺入 (N. Maclean)	(37)
5. 用放射性同位素示踪技术进行 ATP 合成的测定: 叶绿体的光合磷酸化作用 (R. Cammack)	(41)
6. 应用放射性二氧化碳对 Calvin 循环的观察 (D. M. Hacraft)	(44)
7. 应用放射自显影术进行双翅目幼虫唾腺细胞的 RNA 和 DNA 合成的研究 (J. Jacob)	(50)
第三章 相差显微镜和测量技术	(58)
1. 相差显微镜的调试: 口腔上皮细胞的检查和折射率的测量 (H. G. Davies)	(58)
2. 细胞大小和细胞计数的变化 (T. R. Ricketts)	(61)
3. 用点计数技术来测量核和胞质的容量分部 (S. Bradbury, G. Wiernik & Mary Plant)	(63)
第四章 细胞化学	(69)
1. 组织切片中的碱性磷酸酶 (D. O. Hall)	(69)
2. 用一系列方法进行细胞化学型的重建 (J. Boss)	(71)
3. 对在大鼠肾细胞分化过程中所发生的某些改变的观察 (J. Boss)	(76)
4. 对有丝分裂周期的放射自显影研究 (P. B. Gahan)	(79)

5. 细胞增殖和分化的放射自显影研究 (P. B. Gahan)	(81)
6. 应用变形虫和其他原生动物进行荧光显微镜观察 (Shirley E. Hawkins)...	(82)
第五章 染色体细胞学	(85)
1. 培养的动物细胞的染色体 (E. Sidebottom)	(85)
2. 哺乳动物染色体分带类型的显示 (N. P. Bishun, D. C. Williams & P. Doyle)	(87)
3. 蜗牛 (<i>Cepaea nemoralis</i>) 的细胞学, 着重记录交叉频率 (C. R. Bantock & D. J. Price)	(90)
第六章 病毒	(100)
1. 用蔗糖梯度离心法分离病毒 (M. L. Fenwick & D. Kay)	(100)
2. 在细菌层上噬菌体的生长 (N. Maclean)	(103)
3. 萝卜黄花叶病毒 (TYMV) 的纯化 (M. A. Mayo)	(105)
4. 烟草花叶病毒 (TMV) 的感染性分析 (M. A. Mayo)	(108)
5. 烟草花叶病毒 (TMV) RNA 的制备 (M. A. Mayo)	(109)
6. 烟草花叶病毒 (TMV) 和烟草响尾病毒颗粒长度的测量 (M. A. Mayo) ...	(112)
第七章 膜和表面	(114)
1. Gorter-Grendel 实验: 红细胞的脂类含量 (C. W. F. McClare)	(114)
2. 红细胞的通透性 (Shirley E. Hawkins)	(119)
3. 纤毛虫的麻醉 (Shirley E. Hawkins)	(121)
4. 变形虫的胞饮作用 (Pinocytosis) (Shirley E. Hawkins)	(122)
5. 通过海绵细胞的凝集来证明细胞的粘着特性 (A. S. G. Curtis)	(125)
6. 在刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, Con A) 作用下培养的动物细胞的凝集 (J. G. Edwards)	(128)
第八章 细胞的动力	(133)
1. 从分子水平来观察: 布朗运动 (Brownian motion), 颗粒的大小和藻类的运动 (C. W. F. McClare)	(133)
2. 丽藻、绒泡菌和变形虫的胞质流动 (Shirley E. Hawkins)	(145)
3. 四膜虫纤毛的再生 (Shirley E. Hawkins)	(148)
4. 肌原纤维的结构和收缩的机理 (E. Jean Hanson)	(151)
第九章 亚细胞细胞器	(157)
1. 打碎细胞的方法 (J. M. Ashworth)	(157)
2. 大鼠肝亚细胞组分的分离和鉴定 (D. O. Hall)	(160)
3. 大鼠肝不同分部中琥珀酸脱氢酶的活性 (D. O. Hall)	(163)
4. 大鼠肝线粒体中的电子传递 (J. M. Palmer)	(166)
5. 植物线粒体中的电子传递 (J. M. Palmer)	(170)
6. 分离的大鼠肝细胞核的制备及平均每个核中 DNA 量的测定 (T. R. Ricketts)	(173)
7. 从高等植物中分离叶绿体 (M. C. W. Evans)	(177)
8. 菠菜叶绿体中由光合作用引起的氧释放以及电子传递与 ATP 合成之间的	

关系 (M. C. W. Evans)	(180)
第十章 生理化学	(185)
1. 酵母的呼吸和发酵 (T. ap Rees)	(185)
2. 用氧电极测量酵母和大肠杆菌对氧利用的动力学 (D. O. Hall)	(193)
3. 一种简单的极谱法——用于研究温度和 CO ₂ 分压对氧合血红蛋白解离曲线的影响 (V. A. Knight & W. Barry)	(197)
4. 卷心菜中抗坏血酸含量的测定 (T. ap Rees)	(199)
5. 胡萝卜细胞对磷酸盐和葡萄糖的摄取 (T. ap Rees)	(202)
6. 光合细胞分化期间,果糖-1,6-二磷酸酶活性的变化 (T. ap Rees)	(206)
7. 离体叶绿体对染料的还原作用 (D. O. Hall)	(209)
8. 大鼠肝线粒体的氧化磷酸化 (J. M. Palmer)	(211)
9. 蛋白质的分离 (J. M. Ashworth)	(214)
10. 植物和细菌中铁氧还蛋白的部分提纯和测定 (M. C. W. Evans)	(216)
11. 柱层析提纯蛋白质——从真菌提取物中分离过氧化氢酶和葡萄糖氧化酶 (R. Cammack)	(220)
12. 吸附和薄层层析 (J. M. Ashworth)	(222)
第十一章 生长	(225)
1. 细菌的生长以及氯霉素和青霉素对它们的作用 (E. Sidebottom, K. G. H. Dyke & D. G. Wild)	(225)
2. 抗菌物对培养的人细胞某些作用的检查 (Mary Dawson)	(228)
3. 大肠杆菌及其突变体的生长实验 (J. M. Ashworth)	(230)
4. 细菌的接合;重组体的分离 (M. L. Fenwick)	(234)
5. 细胞周期和同步诱导 (R. L. P. Adams)	(237)
6. 热休克引起四膜虫属培养物(<i>Tetrahymena</i> Culture) 的同步分裂 (Shirley E. Hawkins)	(240)
7. 裂殖酵母——粟酒裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) 的异步和同步培养物的生长 (J. Creanor and A. H. Maddy)	(243)
8. X线照射后,体外具有繁殖能力的哺乳动物细胞的存活 (R. J. Berry) ..	(246)
9. 用蕨类孢子证实电离辐射对细胞的杀伤 (A. Howard, M. V. Haich. & F. G. Cowie)	(252)
第十二章 酶诱导	(257)
1. 细菌中 β -半乳糖苷酶合成的诱导 (N. Maclean)	(257)
2. 赤霉素诱导大麦胚乳的淀粉酶活性 (W. Cockburn)	(259)
第十三章 分化	(263)
1. 胡萝卜培养物的胚胎发生 (H. E. Street)	(263)
2. 烟草愈伤组织中器官发生的激素控制性诱导 (H. E. Street)	(266)
3. 在培养的根片段中维管形成层的诱导及其功能 (H. E. Street)	(270)
4. 酵母内线粒体的发生 (D. O. Hall)	(273)
5. 离子对葛鲁氏两鞭变形虫 (<i>Naegleria gruberi</i>) 由变形虫型转变为鞭毛虫型	

的作用 (Shirley E. Hawkins)	(276)
6. 乳酸脱氢酶的同功酶: 电泳分离和比色测定 (Shirley E. Hawkins)	(279)
7. 在体外刺激红细胞生成 (R. I. Freshney)	(283)
8. 在一连续细胞株中诱导血红蛋白的合成 (R. I. Freshney)	(290)
9. 在器官发生过程中次级诱导相互作用的特异性 (R. I. Freshney)	(294)
第十四章 免疫学	(300)
1. 配血型 (F. E. G. Cox)	(300)
2. 病毒的血凝作用 (F. E. G. Cox)	(302)
3. 免疫扩散 (F. E. G. Cox)	(304)
4. 分泌抗体细胞的 Cunningham 空斑测定 (S. V. Hunt)	(307)
5. 淋巴细胞功能的区分和评价 (P. J. L. Holt)	(313)
参考书目	(319)

C
B

第一章 细胞和组织培养技术

1. 细胞系的传代：在瓶中进行单层细胞培养

所需时间

20 分钟。

要求掌握的知识

病毒学中所用的标准无菌技术(除避免细菌污染的一些措施外,必须用橡皮乳头来操纵吸管,以免操作者和细胞培养受到病毒或枝原体感染)。

理论基础

在任何传代程序中,第一步是制备细胞悬液。细胞同基质结合的本质还没有完全弄清楚,但它很容易被蛋白水解酶和螯合剂破坏,后者对钙、镁离子有亲和力,而这两种离子是保持结合的完整性所必需的。这里描述的方法中使用了胰蛋白酶和乙二胺四乙酸盐(EDTA、Versene)的混合物。这种混合物的优点是,其作用比两种成分单独使用时约快50倍。这样就把暴露于可能损害细胞膜的化学药品的时间,减至最低限度。把细胞悬浮于含血清的生长液中,就可抑制酶和螯合剂的进一步作用。这一阶段的要点在于制成含单个细胞的悬液,因为细胞团块可反过来影响下代细胞培养的质量。

从一个原始培养物接种的新培养物的数目,取决于细胞株系,传代频率和培养所需的时间。通常认为,接种率为 5×10^4 细胞/厘米² 比较适宜。这里述及的传代方法要求能在三天内产生健康而致密的培养物。

必需的设备

设备/培养液等	每个学生所需数量	设备/培养液等	每个学生所需数量
1. 生长液: Eagles ¹ 最低必需培养液内含 10% 小牛血清, 0.1% 碳酸氢钠(最终浓度), 200 iu/毫升青霉素, 100 iu/毫升链霉素 来源: Wellcome 试剂公司	50 毫升	来源: Biocult	
2. 消化液: Versene (1:5000) 内含胰蛋白酶(5%), 使其最终浓度为 0.125% 来源: Wellcome 试剂公司	10 毫升	4. 4 英两医用扁瓶(灭菌) 来源: 国际玻璃容器公司	3
3. HEp-2 细胞(人喉癌) ²	4 英两医用扁瓶培养 1 瓶	5. 500 毫升烧杯	1
		6. 10 毫升吸管(灭菌)	2
		7. 2 毫升吸管(灭菌)	1
		8. 10 毫升吸管橡皮乳头	1
		9. 2 毫升吸管橡皮乳头 来源: Esco 橡胶公司	1
		10. 显微镜(物镜×5, 目镜×8)	3 个学生 1 台
		11. 37°C 恒温箱	全班 1 个

1 Eagles, H.

1959 Science 130, 432

2 Moore, A. E. Sabachewsky, L. and Toolan, H. W.

1955 Cancer Res. 15, 598

注意: 可用其他细胞系代替 HEp-2 细胞。如指定学生自行配制生长液时,需另准备吸管。

表 1 (引自 Whitaker, 1972)

通常用于细胞培养的容器的面积					
容 器	玻璃的类型	面积 (厘米)	培养区 (厘米 ²)	总容积 (毫升)	培养液量 (毫升)
4 英寸×1.2 英寸 试管	Pyrex 钠	4.7×1.2	2	8	1
6 英寸×5/8 英寸 试管	Pyrex 钠	7.0×1.4	10	20	2
2 英两医用瓶	钠	3.0×7.5	22.5	60	10
喂奶瓶	Pyrex	3.0×11.0	33	250	20
4 英两医用瓶	钠	4.0×9.0	36	120	10—20
12 英两医用瓶	钠	6.5×14.0	91	360	40
20 英两医用瓶	钠	7.0×16.0	112	600	75
Roux 瓶	Pyrex	10.0×20.0	200	1200	100
Thompson 瓶	Pyrex	15.0×25.0	375	4000	250
Povitski 瓶	Pyrex	16.0×37.0	600	5000	500

玻璃器皿的洗涤

1. 用 1% Pyroneg (Diversey 公司), 在 100℃ 使之自由蒸发处理 1 小时, 趁热刷去细胞碎片, 然后用热自来水冲洗。

2. 用 1:100 或 1:200 Decon 75 处理过夜。

用上述两种方法洗涤后, 再用冷自来水冲洗若干次, 继之以蒸馏水冲洗至少 6 次。

分组形式

这一实验适合于在大班中工作的各个学生。

学生操作规程

1. 取 HEP-2 培养物, 弃去培养液, 在细胞层上覆盖 10 毫升预热至 37℃ 的消化液, 放置 30 秒钟。

2. 倾出消化液至它开始一滴一滴地流出为止 (此时瓶中大约留下 0.5 毫升)。将瓶放置于工作台上 1 分钟。

3. 把三个新培养瓶的瓶盖拧松, 直立放置于工作台上。

4. 在原来的培养瓶中加入 3.5 毫升生长液, 用一支吸管将细胞从瓶壁冲洗下来, 并用力吹打若干次, 以打散细胞团块。

5. 每一新培养瓶中加 1 毫升上述细胞悬液, 原来的瓶中留下 1 毫升。

6. 每个培养瓶中再加上 9 毫升生长液, 盖紧瓶盖。

7. 在每个瓶子上做标记 (细胞接种瓶上标明的代数加 1 即为新的代数)。

8. 在 37℃ 培养 2~3 天。

记录结果

1. 观察每个培养物的培养液中酚红指示剂的颜色, 并粗略估计其 pH。pH 过高 (紫红色) 可能由于细胞生长不良, 或由于瓶塞不紧使 CO₂ 逸出所致。

2. 注意细胞层的致密程度。

3. 描述占优势的细胞形态。

范围和应用

传代培养是操作细胞系的基本过程, 它可产生大量细胞或许多细胞培养瓶, 以便用于

表 2 细胞培养中应用抗菌素的资料(引自 Whitaker, 1972)

抗菌素	商品名	制造者	报道过的抗菌谱	报道过的对多数污染物的抑制浓度*	无细胞毒性的最大浓度**†	细胞培养中适用的抗菌素浓度**†
硫酸卡那霉素 ⁺	Kanasig	Sigma	广 谱	0.6—50	1,000	10
两性霉素 B ⁺	Fungizone	Squibb	酵母, 霉菌	0.2—2	4—8	2—4
制霉菌素	Mycostatin	Squibb	酵母, 霉菌	10—100	75—100	25—50
氯霉素 ⁺	氯霉素	Parke-Davis	广 谱	0.2—20	10—15	5—10
盐酸氧化四环素 (带有抗坏血酸)	土霉素	Pfizer	革兰氏阴性杆菌	0.4—50	10—20	10
青霉素 G 钠		Beecham	革兰氏阳性微生物	0.005—20	900—1000	100—200
硫酸链霉素		Glaxo	革兰氏阴性微生物	1—50	900—1000	50—100
硫酸双氢链霉素		Glaxo	革兰氏阴性微生物	1—50	1000	50—100
新霉素 ⁺		Andrews	广 谱	0.1—25	800—1000	10—100
多粘菌素 ⁺ B		Burroughs	革兰氏阴性杆菌	0.5—50	50—75	20—50
杆菌肽		Wellcome & Co	革兰氏阳性球菌		750—1000	100
		Andrews	革兰氏阳性杆菌			
紫霉素		Parke-Davis	革兰氏阴性球菌	0.7—100	700—1000	100
氯化四环素	金霉素	Lederle	广谱及分枝细菌	0.1—10	30—50	20—40

* 青霉素和制霉菌素的浓度以国际单位/毫升表示, 其余均以微克/毫升表示。

† 细胞试验: 人胚皮肤; 猴代猴肾; HEP-2。

‡ 推荐用于消灭大多数微生物。

实验或贮存。

进一步阅读材料

Whitaker, A. M.

1972 "Tissue and Cell Culture". Baillière Tindall, 伦敦

对教师的提示

在开始实验前应保证消化液加温至 37℃。有时一批细胞培养可因偶然的细菌污染而不能用,因此在不同时间准备两批培养物是有用的。

A. M. WHITAKER

Wellcome 研究所

2. 细胞系的传代: 在试管中进行单层细胞培养

所需时间

45 分钟。

要求掌握的知识

同前一个实验,还需具有应用改进的 Neubauer 细胞计数盘的一些知识。

理论基础

本实验中所应用的许多操作均与前述实验类似。在分装大量容器时,细胞悬液很容易沉淀下来,因此必须经常摇动。由于大部分操作是在处于直立位置的试管中进行的,因此有必要小心地摇动试管,使细胞在培养前能形成均匀悬液。

必需的设备

设备/培养液等	每个学生所需数量	设备/培养液等	每个学生所需数量
1. 生长液: Eagles 最低必需培养液内含 10% 小牛血清, 0.1% 碳酸氢钠(最终浓度), 200i.u./毫升青霉素, 100 i.u./毫升链霉素 来源: Wellcome 试制。公司。	150 毫升	固定的不锈钢盖(灭菌), 或 5 英寸×1/2英寸试管——如使用此种试管, 则接种量为 1 毫升。 来源: 国际玻璃容器公司。 (试管架用 Luckham 公司出品)	
2. 胰蛋白酶消化液: Versene (1:5000) 内含胰蛋白酶(5%), 使其最终浓度为 0.125% 来源: Wellcome 试剂公司。	50 毫升	7. 500 毫升烧杯	1
3. HEP-2 细胞(人喉癌) 来源: Biocult	4 英两医用扁瓶 培养 3 瓶	8. 10 毫升吸管(灭菌)	5
4. 4 英两医用扁瓶(灭菌) 来源: 国际玻璃容器公司。	1	9. 2 毫升吸管(灭菌)	5
5. 1/4 英两 Bijou 瓶(灭菌) 来源: 国际玻璃容器公司。	1	10. 10 毫升吸管橡皮乳头	1
6. 6 英寸×5/8 英寸试管放置于试管架上, 每一支试管均带有稍稍	50	11. 2 毫升吸管橡皮乳头	1
		12. 试管用胶塞(灭菌) 来源: Esco 橡皮公司。	50
		13. 台盼蓝染液(0.5% 水溶液) BOH	2 毫升
		14. 带有盖玻片的 Neubauer 计数盘 来源: A. R. Horwell.	3 个学生 1 套
		15. 显微镜(×5×10 物镜; ×8 目镜)	3 个学生 1 台
		16. 37℃ 恒温箱来源: A.R.Horwell.	全班 1 个

分组形式

这一实验适合于在大班中工作的各个学生。

学生操作规程

1. 取一瓶 HEp-2 细胞培养, 倾出废生长液, 细胞层覆以 10 毫升预热至 37℃ 的消化液, 放置 30 秒钟。

2. 倾出消化液至它开始一滴一滴地流出时为止(此时瓶中大约留下 0.5 毫升), 将瓶在工作台上再放置 1 分钟。

3. 用同样方法处理其他两瓶培养物。

4. 用一吸管吸取 2 毫升生长液, 将细胞从瓶壁冲下。充分吹打制成单个细胞悬液。

5. 收集细胞悬液, 调节容积至 10.5 毫升。

6. 将 0.5 毫升细胞悬液移至 1/4 英两瓶中, 加入 1.5 毫升台盼蓝并加以混合。

7. 加 1 滴染色悬液至改进的 Neubauer 计数盘中, 并计算带有 16 方格的四大格中的细胞总数(放大×80)。

注意: 台盼蓝只能透过质膜受损害的细胞, 而正常细胞却能加以排除。尽管这种相互关系不是很严格, 但所有染色细胞可算作死细胞, 而所有不染色细胞都算作活细胞。

8. 应用下列公式计算活的和死的细胞总数:

$$N/4 \times D \times 10000 = \text{细胞数/毫升}$$

其中 N = 四大格中细胞总数

D = 加染液后的稀释倍数

9. 在 4 英两医用扁瓶中, 将 10×10^6 活细胞再悬浮于 100 毫升生长液中。

10. 每一支试管中分装 2 毫升细胞悬液。

11. 去掉金属盖, 代之以胶盖, 小心地塞紧。

(注意: 如试管口有裂纹, 塞盖时试管会破裂而易划破手指)

12. 振动试管架使细胞均匀分散, 并使之与平面成 20° 角进行培养。

记录结果

1. 观察每支试管中指示剂的颜色——见前一实验。

2. 注意细胞层区域。

3. 描述细胞的形态。

范围和应用

试管是可应用的单个培养容器中最小而方便的一种。因此如果需要应用大量复制培养物(例如病毒的滴定)时, 它们是特别有用的。

进一步阅读材料

Whitaker, A. M.

1972 "Tissue and Cell Culture". Baillière Tindall, 伦敦

对教师的提示

为了免除胶塞对细胞培养的毒性, 应将其在肥皂水中煮沸, 随后以自来水及蒸馏水冲洗。最好准备一份细胞悬液保存起来, 因为有时学生从瓶中得不到足够的细胞数。

A. M. WHITAKER

Wellcome 研究实验室

3. 细胞系的传代：盖玻片培养物的制备

所需时间

20 分钟。

要求掌握的知识

见前述实验。

理论基础

除了前述两个实验中讨论过的那些因素外，这里叙述的操作过程中采用了另一种缓冲系统。大多数细胞培养的培养液中采用模仿血浆中天然的 CO_2 -碳酸氢盐系统的缓冲系统。但这一系统有着不少缺点。碳酸氢钠提供的缓冲条件不太适合生理的范围。 CO_2 很容易逸出培养液，导致 pH 升高，而且碳酸氢钠对某些细胞有很大毒性。现在已有了一系列两性离子的生物缓冲液，它们没有毒性，而其最适缓冲范围符合于生理的范围。4-(2-羟乙基)-1-氮六因乙烷磺酸 (HEPES) 就是其中之一。它可以在同空气自由交换气体的条件下，调节培养液的 pH 至接近于中性。

必需的设备

设备/培养液等	每个学生所需数量	设备/培养液等	每个学生所需数量
1. 生长液: Eagles 最低必需培养液内含 10% 小牛血清, 3% HEPES 缓冲液 (1M) 200 iu/毫升青霉素, 100 iu/毫升链霉素 来源: Wellcome 试剂公司	50 毫升	7. 10 毫升吸管(灭菌)	5
2. 胰蛋白酶消化液: Versene (1:5000) 内含胰蛋白酶(5%), 使其最终浓度为 0.125% 来源: Wellcome 试剂公司。	10 毫升	8. 2 毫升吸管(灭菌)	5
3. HEp-2 (人喉癌)细胞 来源: Biocult	4 英两医用扁瓶 培养 2 瓶	9. 10 毫升吸管橡皮乳头 来源: Esco 橡胶公司	1
4. 4 英两医用扁瓶(灭菌) 来源: 国际玻璃容器公司。	1	10. 2 毫升吸管橡皮乳头	1
5. 1/4 英两 Bijou 瓶(灭菌)	1	11. 玻璃盖片 来源: Chance & Propper	6
6. 500 毫升烧杯	1	12. 4 英寸平皿(灭菌)	2
		13. 台盼蓝染液(0.5% 水溶液) BDH	2 毫升
		14. 镊子(灭菌)	1 把
		15. 改进的 Neubauer 计数盘, 带盖玻片 来源: A. R. Horwell	3 个学生 1 个
		16. 显微镜($\times 5$ 及 $\times 10$ 物镜; $\times 8$ 目镜)	3 个学生 1 架
		17. 37°C 恒温箱	全班 1 个

分组形式

这一实验适合于在大班工作的各个学生。学生操作规程

1. 取一瓶 HEp-2 细胞培养，倾出废生长液，细胞层覆以 10 毫升预热至 37°C 的消化液，放置 30 秒钟。

2. 倾出消化液至它一滴一滴地流出时为止（此时瓶中约留下 0.5 毫升）。将瓶子在工作台上再放置 1 分钟。

3. 其他 HEp-2 培养瓶按同法进行处理。

4. 用一支吸有 2 毫升生长液的吸管将细胞自瓶壁冲下。充分吹打使之形成单个细胞悬液。

5. 收集细胞悬液并调节其容积至 10.5 毫升。

6. 将 0.5 毫升细胞悬液移至 1/4 英两瓶中。加入 1.5 毫升台盼蓝染液并混合之。

7. 用 Neubauer 计数盘按前一实验方法计算细胞数/毫升。

8. 将 3×10^6 细胞重新悬浮于 40 毫升生长液中。

9. 在两个平皿中分别用无菌镊子加入 3 条洁净无菌的盖玻片。

10. 向每一平皿中加入 20 毫升细胞悬液。

11. 培养。在温箱中放置一个盛有蒸馏水的打开的平皿，以保证温箱中有足够的湿度。

范围和应用

利用盖玻片培养可制备培养细胞及其所产生病变的永久性染色记录。

进一步阅读材料

1972 Whitaker, A. M. "Tissue and Cell Culture." Baillière Tindall, 伦敦。

对教师的提示

盖玻片应单个地进行灭菌，例如每一盖玻片放置于一封闭的试管中。如放在一起灭菌，往往难于把它们分开。

A. M. WHITAKER

Wellcome 研究实验室

4. 甘油和二甲亚砜对细胞冻存的保护作用的比较

所需时间

第一节 $1\frac{1}{2}$ 小时

第二节 15 分钟

第三节 $1\frac{1}{4}$ 小时

第四节 $\frac{1}{2}$ 小时

第一节与第二节之间应有半小时间隔。在第二节与第三节之间可间隔适当时间。第三节与第四节之间间隔 24—48 小时。

要求掌握的知识

基本的细胞结构。有关分子扩散的粗浅知识。亲水化合物同水分子结合的原则。无菌技术。单层细胞培养的操作与消化。用 Coulter 计数器或血细胞计数器进行细胞计数。

理论基础

在冷保护剂存在的条件下，细胞培养中的动物细胞可无限期地保存于液氮中。冷保护剂(例如甘油或二甲亚砜)可使细胞免受由于冰结晶形成导致的物理损伤，又可使其免

受由于渗透压改变导致的损伤。细胞应缓慢地(1℃/分)冻结,迅速融化,以便获得最大的生存率。上述冻结速率是快的冻结率与慢的冻结率之间的一种折衷方法。为了尽量减少冰结晶的形成,需要快冻;而为了允许水分从细胞中逸出,以免在细胞器中形成冰结晶,则要求慢冻。

必需的设备

第一、二节	所需数量(除另行注明者外均指每个学生所需数量)	第一、二节	所需数量(除另行注明者外均指每个学生所需数量)
1. 0.25% 胰蛋白酶。2.5% (Flow Labs) 稀释于平衡盐溶液或等渗枸橼酸盐溶液	10 毫升	15. -70℃ 低温冰箱或 “Drikold”箱	1 (公用)
2. 未形成单层 (处于对数生长期)的 L-929 细胞(或其他细胞)的 50 厘米 ² 培养瓶	1	16. 吸管: 2 毫升巴氏吸管(在筒内高压灭菌) 来源 Gallenkamp	1 筒
3. 含 Hanks 盐的 Eagle 最低必需培养液, 内含 0.35 克/升碳酸氢钠,10% 小牛血清, 50 微克/毫升庆大霉素 (Flow Labs)	20 毫升	第三节	
4. 二甲亚砜(高压灭菌) (DMSO) 来源: BDH	2 毫升	1. 25 厘米 ² 培养瓶 来源: Falcon, Greiner, Flow Labs	3
5. 甘油(高压灭菌)	2 毫升	2. 带盖的水浴	2 (公用)
6. 1 毫升安瓿 来源: Gallenkamp	3	3. 手套和防护眼镜	3 套
7. 冰浴	1	4. 培养液	20 毫升
8. 封安瓿器 (O ₂ -煤气焰)	1 (公用)	5. 1 毫升注射器	3
9. 隔热冷却箱(膨胀的聚苯乙烯,壁厚约 1.5 厘米, 20~30 厘米长×10 厘米宽×10 厘米高。这一容积是大约的,不必过于拘泥,但壁厚度的改变不应超过 20%)。	1 (公用)	6. 冰槽	1
10. 2 毫升注射器 来源: Gillette Surgical	3	7. 1 毫升吸管 10 毫升吸管 巴氏吸管	1 筒 1 筒 1 筒
11. Bijou 瓶 来源: 通用玻璃容器公司	3	8. 活细胞染液(1% 美黑 [BDH], 溶于平衡盐溶液或等渗盐水)	5 毫升
12. 通用容器 来源: Gallenkamp	1	9. 载玻片与盖玻片	
13. 液氮冻结器(蒸气相) 来源: (Union Carbide, 或 BOC)	1 (公用)	10. 显微镜(10×物镜)	
14. Coulter 或 Celloscope 细胞计数器或血球计数盘及显微镜	1 (公用)	第四节	
		1. 等渗枸橼酸盐溶液(计数液,仅供 Coulter 计数器用)	100 毫升
		2. 通用容器	2
		3. 显微镜	
		4. Leishman 染液(或 May Grunwald & Giemsa) 来源: Gurr	5 毫升
		5. 胰蛋白酶 来源: Flow	10 毫升
		6. 血细胞计数器 来源: Gallenkamp	1

分组形式

6—12 个学生单独进行操作,但分成三组。

学生操作规程

用消化法制备的培养细胞悬液,在保护剂存在下缓慢冻结,并在-196℃ 保存短时间后使之融化。用染料排除法检查细胞活力,同时检查细胞的生长潜能。对甘油和二甲亚