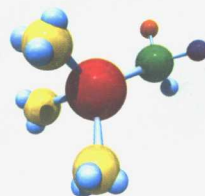


XIANDAI SHIYONG XIBAO YU FENZISHENGWUXUE
SHIYAN JISHU



现代 实用细胞与分子生物学 实验技术

● 主 编 蔡文琴



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PUBLISHER

现代实用细胞与分子 生物学实验技术

XIANDAI SHIYONG XIBAO YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU

主 编 蔡文琴

人 民 军 医 出 版 社

Peoples Military Medical Publisher

北 京

图书在版编目(CIP)数据

现代实用细胞与分子生物学实验技术/蔡文琴主编. 北京:人民军医出版社,2003.1
ISBN 7-80157-529-6

I. 现… II. 蔡… III. ①细胞学—实验 ②分子生物学—实验 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 015500 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

潮河印刷厂印刷

春园装订厂装订

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:35.5·彩页 1 面·字数:825 千字

2003 年 1 月第 1 版(北京)第 1 次印刷

印数:0001~5000 定价:70.00 元

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

目 录

上篇 细胞学与组织学技术

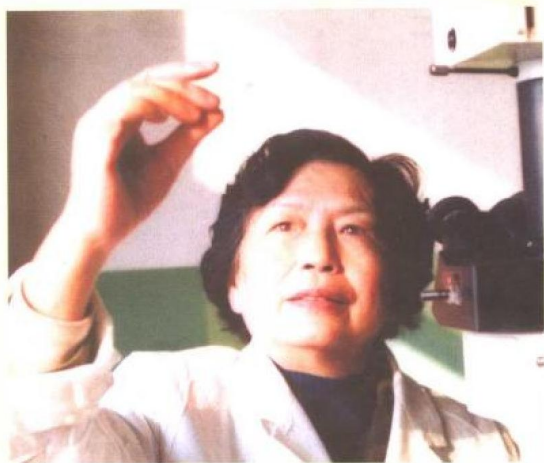
第一章 细胞培养方法	(3)	四、R带	(59)
第一节 细胞培养的基本操作和要求	(3)	五、高分辨显带技术	(60)
一、细胞培养实验室的基本设备	(3)	第三节 染色体的特殊染色	(61)
二、细胞培养的准备	(4)	一、着丝点免疫组化染色	(61)
三、细胞的原代培养	(5)	二、端粒酶染色	(61)
四、细胞的传代培养	(7)	第二章 附录 染色体制作所需试剂的 配制	(63)
五、细胞的冻存和复苏	(8)	第三章 组织制片技术与细胞化学 技术	(66)
第二节 各种细胞的特殊培养方法	(9)	第一节 组织制片技术	(66)
一、人皮肤成纤维细胞培养	(9)	一、取材与固定	(66)
二、人外周血淋巴细胞短期培养	(10)	二、石蜡包埋切片制作程序	(69)
三、琼脂培养法	(12)	三、常用染料和染色方法	(71)
四、血管平滑肌细胞培养	(13)	四、树脂包埋光镜切片技术	(74)
五、血管内皮细胞培养	(15)	五、恒冷箱切片机制片技术	(75)
六、大鼠腺垂体细胞的培养	(17)	六、整封制片技术	(76)
第三节 器官培养方法	(19)	第二节 常用组织化学染色方法	(78)
一、表玻皿器官培养法	(19)	一、糖原染色方法	(78)
二、不锈钢金属网格法	(19)	二、核酸染色技术	(79)
三、Wolff 培养法	(20)	三、酶组织化学染色方法	(79)
四、扩散盒培养法	(20)	四、细胞凋亡检测技术	(83)
第四节 神经细胞及组织培养	(21)	第三节 电镜细胞化学技术	(86)
一、概述	(21)	一、基本原理	(86)
二、神经组织培养与其他组织培养的 差异	(22)	二、样品制备	(87)
三、神经组织细胞培养的简要步骤	(23)	三、常用的电镜酶细胞化学方法	(87)
第五节 干细胞的分离培养与纯化	(25)	第四章 免疫细胞化学技术	(91)
一、胚胎干细胞的分离培养与纯化	(25)	第一节 免疫细胞化学的免疫学及 组织细胞学基础	(92)
二、神经干细胞的分离培养与纯化	(31)	一、抗原	(92)
三、造血干细胞的分离培养与鉴定	(33)	二、抗体	(93)
第二章 染色体制作技术	(56)	三、补体系统	(97)
第一节 染色体的制备	(56)	四、标记物	(98)
第二节 常用染色体显带技术	(58)	五、抗体的制备和配制	(98)
一、Q带	(58)	六、组织材料的处理(取材)	(99)
二、G带	(59)	七、细胞和组织的固定	(101)
三、C带	(59)		



八、组织切片技术	(104)	二、生物素标记 cRNA 探针在 ISHH 中的应用	(193)
九、免疫染色	(106)	三、地高辛标记 cRNA 探针的应用	(194)
十、对照设置	(108)	第五节 DNA 及寡核苷酸探针在原位杂交组织化学中的应用	(196)
十一、免疫细胞化学结果的判断	(109)	一、DNA 探针的应用	(196)
第二节 免疫荧光细胞化学技术	(110)	二、寡核苷酸探针的应用	(200)
一、免疫荧光细胞化学的原理	(110)	第六节 原位杂交组织化学与免疫细胞化学结合法	(201)
二、荧光抗体	(112)	一、核素原位杂交组化与免疫组化 PAP 法的联合程序	(201)
三、荧光免疫细胞化学染色方法	(115)	二、非核素原位杂交组化与免疫组化联合法	(202)
第三节 酶免疫细胞化学技术	(120)	第七节 原位杂交细胞化学技术的一些新进展	(204)
一、酶标抗体法	(120)	一、荧光原位杂交技术	(204)
二、非标记抗体酶法	(126)	二、肽-核酸原位杂交细胞化学技术	(209)
三、结果分析	(131)	第五章 附录一 原位杂交组织化学常用试剂及处理	(210)
四、免疫组织化学的几种特殊应用	(136)	第五章 附录二 全血细胞培养染色体技术常用试剂配制	(220)
第四节 亲和免疫细胞化学技术	(140)	第六章 电子显微镜技术	(222)
一、生物素-抗生物素免疫细胞化学技术	(140)	第一节 透射电镜	(222)
二、葡萄球菌蛋白 A	(145)	一、透射电镜的基本原理	(222)
三、凝集素	(147)	二、超薄切片技术	(223)
第五节 免疫金银及铁标记技术	(154)	三、观察及记录	(230)
一、免疫金技术发展史	(154)	第二节 扫描电镜技术	(232)
二、溶胶的基本概念	(155)	一、扫描电镜概况	(232)
三、免疫胶体金银细胞化学染色的固定剂选择	(156)	二、扫描电镜的生物样品制备	(233)
四、光镜免疫金银细胞化学技术	(157)	三、几种常用的样品制备方法	(236)
第四章 附录 免疫细胞化学常用试剂介绍	(163)	第三节 冷冻蚀刻电镜技术	(240)
第五章 原位杂交组织化学技术	(177)	一、物理固定	(240)
第一节 原位杂交组织化学技术的原理和方法	(177)	二、快速冷冻方法	(241)
一、基本原理	(177)	三、冷冻复型样品制备	(242)
二、基本方法	(178)	四、冷冻置换法	(243)
第二节 核酸探针的种类、制备及标记	(184)	五、冷冻超薄切片法	(244)
一、特异性目的核酸(或基因)的制备	(184)	第四节 免疫电镜技术	(245)
二、目的核酸的扩增	(184)	一、电镜免疫细胞化学技术概述	(245)
三、核酸探针的放射性核素标记	(184)	二、免疫铁蛋白技术	(249)
四、核酸探针的非放射性标记	(186)	三、免疫酶细胞化学技术	(251)
第三节 寡核苷酸探针的制备和标记	(190)	四、免疫电镜胶体金标记法	(252)
第四节 cRNA 探针在原位杂交组织化学(ISHH)中的应用	(191)	第五节 电镜原位杂交技术	(256)
一、核素标记 cRNA 探针在 ISHH 中的应用	(191)		

主编简介

蔡文琴



1957年毕业于解放军第七军医大学医疗系，1983年获英国伦敦大学解剖及发育生物学系细胞生物学博士学位。现任第三军医大学组织胚胎学教研室主任、神经生物学教研室主任、教授、博士生导师，中国解剖学会常务理事，全国组织胚胎学专业委员会主任委员，中国神经科学学会常务理事，全国发育神经生物学专业委员会副主任委员，国家自然科学基金委员会学科评审组成员，重庆神经科学学会理事长，重庆解剖学会理事长，国际组化委员会委员。

蔡文琴教授是我国著名的组织胚胎学家，长期致力于内脏神经生物学、发育神经生物学和无神经支配血管调配机制等领域的研究。其研究工作在国际及国内期刊发表文章百余篇。主编《发育神经生物学》、《实用免疫细胞化学及核酸分子杂交技术》等专著7部，参编专著11部。获国家科技进步三等奖2项，军队科技进步一等奖1项、二等奖7项，重庆直辖市科技进步一等奖1项、二等奖2项。1995年被评为全军优秀教师和全国优秀教师。

内 容 提 要

本书是实用性细胞与分子生物学实验技术专著,上篇全面论述细胞学与组织学技术,包括细胞培养、染色体制作、组织制片、染色,免疫细胞化学、原位杂交、电子显微镜技术、激光扫描共聚焦、细胞定量分析、膜片钳、细胞内注射、基因剔除等技术方法;下篇系统介绍分子生物学实验技术,包括核酸分离与电泳、基因重组、基因转移、基因定位与克隆、基因治疗实验、基因芯片、核酸蛋白数据库等操作技术。本书汇集了国内外先进技术成果,总结了作者成功的实践经验,内容新颖,可操作性强。可供医学实验人员、生物科学研究人员,临床医师、进修生、研究生阅读参考。

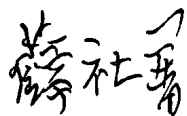
责任编辑 张怡泓 余满松

编著者名单

- 主 编 蔡文琴
- 副 主 编 毛裕民 谢 毅
- 编 委 刘 昕 周德山
- (按文中出现先后排列)
- 蔡文琴 第三军医大学
- 刘 昕 第三军医大学
- 周德山 第三军医大学
- 王 燕 第三军医大学
- 吴 康 第三军医大学
- 章静波 协和医科大学
- 汪维伟 重庆医科大学
- 相正伟 川北医学院
- 夏潮涌 暨南医科大学
- 王春梅 第四军医大学
- 韩 骅 第四军医大学
- 毛裕民 复旦大学遗传学研究所
- 谢 毅 复旦大学遗传学研究所
- 应 康 复旦大学遗传学研究所
- 郭凌晨 复旦大学遗传学研究所
- 李 瑶 复旦大学遗传学研究所
- 参加编写人员 杨 忠 李 巍 秦茂林 周燕虹 蔺 颖
- 陈菊祥 黄达嵩 杨家骥 王冀姝 李 楠
- 张 雷 黄晓峰 张 宏 刘玉琴 顾少华
- 唐 榕 黄青山 吴 海 付旭华 徐伟文
- 王 兆 倪晓华 程海鹏 陈金中 郭朝华
- 邓迎峰 姜 民 方国洪 吴超群 田立峰
- 陈 敏 陶 嘉

序

科学技术是 21 世纪经济发展的特征和动力,一个国家的综合国力决定于她所拥有的科技实力(科技人才的数量和质量)。我国实现科教兴国的目标之一将是培养一支强大和质量优秀、涵盖各门学科的科学队伍。解剖科学是包括解剖学、神经解剖学、人类学、组织学、胚胎学和细胞学等从宏观到微观的生命基础学科,是生命科学和高科技发展中的一个重要组成部分。要发展我国解剖科学要靠先进的科学技术,一方面要培养一支有能力参与国际学术竞争的队伍;另一方面要培养能掌握细胞与分子生物学技术,在交叉学科之间能钻研创新的人才。现在是交叉学科优势互补时代,从事生命科学研究工作免不了要深入到分子生物学水平,而要解释生命现象最终总要回到解剖单位的有机体,跳不出“如来佛手掌”的细胞水平。因而同时掌握细胞生物学和分子生物学实验技术对科研人员非常重要。编写出版一套适应于 21 世纪科技发展需要,涵盖细胞和分子生物学前沿领域使用的新技术方法,体现我国解剖学科特色的教材和参考书,便成为当务之急。《现代实用细胞与分子生物学实验技术》一书的编写出版是向这一目标发展的第一部著作和新的尝试,值得庆贺。本书组织了全国在解剖学科细胞与组化前沿工作,同时具有实践经验的专家参与撰写编辑而成。分上下二篇,上篇为细胞及组织学技术,包括组织细胞、干细胞和器官培养,染色体及端粒酶、色度组化、原位杂交、激光共聚焦扫描、GFP 及 AFP 荧光标记等新技术;下篇为分子生物学技术,包括基因重组,克隆、定位、敲除、转基因、基因芯片以及核酸、蛋白质数据库和生物信息分析技术等。内容新颖,体现了现代性、科学性和实用性。除对实验技术原理阐述外,详细叙述实验方法操作过程、步骤、分析、评价指标,使读者从中掌握了技术方法应用的知识 and 经验,是一部具有工具书性质,适合于从事生命科学基础科研人员和研究生阅读和应用的参考书。谨予以推荐。



中国医学科学院基础医学研究所,中国
协和医科大学细胞生物学系教授、院士

2002 年 2 月 15 日

前 言

在实验目的及设计确定以后,技术路线便成为实现实验目的的重要手段,因此,对实验技术的了解和掌握是科技工作者尤其是研究生所必需的,作者与合作者曾先后主编和出版了《实用免疫细胞化学》(1984)和《实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术》(1994),受到广大科技工作者特别是研究生的欢迎,不少学校将其确定为研究生教材。近年来,新的细胞与分子生物学实验技术不断涌现,原有的专著已跟不上形势发展的需要。因此,应人民军医出版社的约请,作者组织了全国有实践经验的专家编写了《现代实用细胞与分子生物学实验技术》一书。本书分为上、下篇,共十九章,约80万字。上篇细胞学与组织学技术由协和医科大学等全国多所高校十余名专家教授参加编写,他们都是相关领域的著名专家,有丰富的实践经验。下篇分子生物学实验技术,有幸得到中科院上海复旦大学遗传学研究所和第三军医大学分子遗传学教研室的大力支持,不仅参加了编写而且参与审阅。他们在分子生物学方面的造诣,使本书的学术质量达到了相当高的水平。

本书特别强调了先进性和实用性。先进性体现在尽量收入近年来国际上涌现的各种新的细胞与分子生物学实验技术。上篇为细胞学和组织学实验技术,除了介绍常用的细胞培养、染色体技术、组织学和细胞化学技术、免疫细胞化学技术、原位杂交技术和电子显微镜技术外,还对多种干细胞培养、分离、纯化、鉴定技术,激光共聚焦显微技术,PNA原位杂交技术,FISH技术,细胞内注射和膜片钳技术、转基因与基因敲除技术等做了详细论述。下篇为分子生物学实验技术,系统介绍了核酸操作常用技术、基因重组技术、基因分析技术、基因定位与克隆的相关技术、基因转移技术、未知基因的获得、基因治疗、DNA芯片技术及核酸蛋白质数据库及生物信息分析等最新分子生物学实验技术。本书的实用性体现在能给实验者以实际操作的具体指导,参加编写者均为在本学科有实践经验的专家。本书除对实验原理进行简要的叙述外,主要指导实验者如何操作、如何判断实验结果及实验注意事项,文中不乏实验者在实验过程中的亲身体会及经验教训。附录对一些特殊的试剂的配制、仪器的型号、产地等进行了介绍,供读者参考。实用性强还体现在本书结合我国国情,适用于在我国现有实验室条件下开展实验。

本书着力反映国内外最新的基础理论,更注重介绍国内外最新的细胞与分子生物学实验技术,对生物科学和医学科技工作者有重要的参考价值,也可作为进修生和研究生的教材。

本书编写过程中得到各校、研究所和人民军医出版社领导的大力支持,在此,一并致以深切的谢意。感谢薛社普院士在百忙中为本书作序。由于细胞与分子生物学实验技术发展神速,虽然在本书编写过程中作者已尽力反映国内外最新发展,但由于水平及信息的限制,难免有错误和疏漏之处,恳切希望各界同行及广大读者予以批评指正。

蔡文琴

2001年10月11日

原书缺页



- ③去上清液后,再重复用培养液洗一次。
- ④用培养液适当稀释后,装入培养瓶,

37℃培养。次日更换培养液,以后按常规进行培养。

第二节 各种细胞的特殊培养方法

一、人皮肤成纤维细胞培养

在研究人体细胞生物学、体细胞遗传学和疾病诊断时,皮肤成纤维细胞培养日渐成为不可缺少的手段。如在鉴定患者是否有性染色体结构异常,两性畸形及嵌合体时,除了用外周血淋巴细胞做染色体检查外,还要做皮肤成纤维细胞培养物的染色体检查,方能使诊断更为准确。对某些先天性代谢异常的病人则可取皮肤成纤维细胞进行组织化学及生物化学的试验或鉴定。为了制作人类染色体图,建立人体细胞库,积累具有各种不同的酶缺陷和易位染色体的细胞株系是必不可少的先决条件。为了研究人体细胞在体外培养条件下的恶性转化(malignant transformation),建立皮肤成纤维细胞株系也是最常用的手段之一。

(一)材料和方法

外科手术切下的皮肤组织立即放入有培养液的小瓶或平皿内。门诊活检取材时,要在病人痛觉小、血管少、不影响活动的部位(如前臂、臀部),用肥皂洗净,70%乙醇消毒皮肤(忌用碘酊),皮下注入1%盐酸普鲁卡因行局部麻醉,再用灭菌的皮肤钻钻取皮肤,放入有培养液的小瓶内。伤口用无菌纱布压迫1~2min即可止血,然后包扎好伤口。得到标本后便可进行无菌操作接种,若不能立即进行培养,或需要过夜时,将标本放入4℃冰箱保存,第2天再进行培养。培养液可用McCoy-5A培养液(有市售),加入20%灭活的小牛血清,每毫升培养液含100U青霉素和100μg的链霉素,用5.6%碳酸氢钠调pH至6.7~7.0。其具体操作程序如下:

1. 先将皮肤组织用每毫升含300U青霉

素和300μg的链霉素的磷酸缓冲液(PBS)或Hanks液洗2次。

2. 用锋利的眼科剪,将附在皮肤上的脂肪和结缔组织去除干净。

3. 用PBS或Hanks液洗2~3次。

4. 用锋利的眼科弯剪将皮肤组织剪碎,使成为约0.5mm³大小的小块。

5. 用PBS或Hanks液洗多次,直至液体不混浊、无油滴、清亮为止。

6. 用含20%小牛血清的McCoy-5A培养液洗1次后,将皮肤小块浸没在5ml的McCoy-5A培养液内,准备进行组织块接种。

7. 将皮肤小块按适当间隔放置在涂有大鼠鼠尾胶原(见附录)的25ml无菌培养瓶内,使其固定。然后翻转培养瓶,使有皮肤小块的一面向上。

8. 加入1.5ml含20%小牛血清的McCoy-5A培养液。注意勿使培养液与组织块接触,塞紧瓶塞。

9. 将有皮肤小块的一面向上放入37℃温箱,静置3~4h后,轻轻将培养瓶翻转过来,使培养液与组织块接触,切勿晃动。3~4d内不要观察和翻动,以免影响组织块的贴壁及生长。

10. 约1周后每天换液1次。

(二)细胞生长的观察

组织块接种后第4~7d开始长出细胞,有些组织块长出成纤维细胞,有些组织块长出上皮细胞。上皮细胞一般会在1个月左右自行退化,然后再长出成纤维细胞。当成纤维细胞长成若干大片时,密集细胞成为集落,或是当成纤维细胞铺满瓶底即完全汇合时,便可进行传代。传代时将瓶内的培养液



弃去,用 PBS 洗 1 次,加入胰蛋白酶-EDTA 消化液 0.5ml,轻轻摇动,使整个瓶底湿润,置 37℃ 温箱内消化 3~5min,加入新鲜配制的上述培养液 3ml,用滴管把细胞从瓶壁上轻轻地吹打下来,使其成细胞悬液,稍静止以后使组织块沉入瓶底,根据细胞的数量,将细胞悬液分传到新的培养瓶内,25ml 的培养瓶大约接种 25 万个细胞。留在瓶底的组织块便可弃去。从细胞开始生长到第 1 次传代,大约要经历 1~2 个月。以后视细胞生长的快慢,大约每 7~10d 传代 1 次,每 3~4d 换液 1 次。

(三)注意事项

1. 由于外科手术的皮肤标本带有脂肪,在操作过程中使用的器皿上也都被涂上了一层脂肪油滴,这些油滴若洗不干净,就会污染培养液及培养瓶,使组织难以贴瓶,即使贴瓶也很少生长。因此必须用 PBS 或 Hanks 液将油滴彻底洗净。

2. 要尽可能地剪去皮下结缔组织,因为结缔组织不易长出细胞。组织碎块上带的结缔组织多了,就会包绕组织块的切面,使组织块的切面不能直接贴附瓶壁,影响细胞的生长。

3. 在接种组织块时,要将组织块的切面贴在瓶底上,这样,有活力的细胞层才能很快长出细胞。

4. 外科手术或是活检皮肤时,若用碘酊消毒,要用 PBS 或 Hanks 液洗净,尽可能除去碘,因碘对细胞有毒性,使细胞不易生长。

5. 过去在组织块培养过程中,通常加入两性霉素,易抑制真菌生长,作者的经验表明两性霉素固然能抑制真菌的生长,但对组织的生长也有抑制作用,而且使长出的细胞发生固缩、脱落、破碎等。为此,作者不再使用这种制霉菌剂,只要按上述的操作步骤进行接种,注意无菌操作,就能减少或避免污染。

6. 组织块接种后,避免经常翻动和振动,否则组织块不易附着在瓶壁上,或是附着

后又会脱落。

7. 加入的培养液也不宜过多,不然浸泡的组织块受液体轻微的波动便会脱落下来。

8. 皮肤细胞培养一般能传 30~60 代,在此期间,可按实验的要求选择不同代的细胞进行各种细胞生物学分析乃至突变、转化、癌变等研究。

二、人外周血淋巴细胞短期培养

外周淋巴细胞在体内外一般是不分裂的,但在适宜的培养条件及植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)等的刺激下,能转化为幼稚的、原始细胞样的(blast-like)细胞而具有重新分裂的能力。研究证实,这些细胞是胸腺依赖细胞,即 T 细胞。当人胸腺有缺陷时,淋巴细胞对 PHA 无反应,在切除胸腺的照射的实验动物中亦得到证明。外周血淋巴细胞由于具有取材方便,容易培养,短时间培养即可得到大量有丝分裂相细胞等优点,是目前细胞遗传学中广泛采用的一种方法。

按容器是否密闭,培养方法可分两种:一种是使用二氧化碳孵箱,培养容器不需要密闭,用循环的 5%CO₂ 调节培养基 pH; 另一种是使用普通的恒温箱,培养瓶口要密封或用瓶塞塞紧。后一种在一般实验室内即可做到。此外,按培养的血量或淋巴细胞数目,可分血浆法(或称标准法)和半微量全血法(whole blood microculture)两种。后一种方法采血量少,尤其对小儿、新生儿的研究中更为适用。在需要大量染色体标本(如进行 G、Q 显带的研究)以及需要积累大量有丝分裂细胞,特别是早期分裂细胞(如高分辨染色体的研究)时,标准培养法仍然适用。

淋巴细胞培养及染色体标本制作方法简述如下:培养基中加入适量的小牛血清、PHA、肝素及青霉素和链霉素。再加入一定量的血浆或全血。培养基 pH 约为 7.1~7.2。将瓶塞盖紧,置 37℃ 恒温箱中 48~72h,即可收获细胞,在收获细胞前加入一定



量的秋水仙素或秋水仙胺,将细胞阻止于有丝分裂中期。然后将细胞悬液离心,进行低渗、固定处理,最后将细胞悬液滴于湿冷清洁的玻璃片上(常将玻片事先放置在4℃冰水中)。空气中自然干燥即得中期染色体标本,用于各种研究。

(一)器材和试剂

1. 仪器设备 带有照相装置的光学显微镜,隔水式恒温培养箱(附温控仪)或二氧化碳孵箱,恒温水浴箱,电热干燥箱,分析天平(1/万),普通天平或电子天平,离心机,手提式高压消毒锅,普通冰箱,超净工作台或无菌室,小型真空抽气泵或玻璃抽气泵,pH计,放大机及有关暗室设备,荧光显微镜,水质仪,定时钟,秒表、血细胞计数板。

2. 器材 G6型玻璃漏斗或蔡斯漏斗(细菌滤器);不同容量的蒸馏水瓶及蒸馏水桶及蒸馏水器;注射器(1、2、5、10ml)若干及微量注射器(50~100 μ l);10ml锥形刻度离心管;吸管(5、10ml);滴管(直头,弯头);烧杯;量筒;锥形瓶;25ml培养小瓶或青霉素;链霉素小瓶(带瓶塞);标本缸;染色缸;棕色试剂瓶;血浆瓶;盐水瓶;带盖搪瓷盘或铝饭盒;酒精灯;钻石笔;橡皮乳头;洗耳球;试管架;载玻片;盖玻片以及包布等。

3. 试剂 RPMI 1640、TC199、Eagle等培养基干粉任选1种,目前RPMI 1640使用较普遍;小牛血清;肝素;青链霉素;秋水仙胺;PHA;KCl;NaCl;CaCl₂;MgSO₄·7H₂O;MgCl₂·6H₂O;KH₂PO₄;Na₂HPO₄·12H₂O₃;NaOH;葡萄糖;重铬酸钾;胰蛋白酶;酚磺酞;甲醇;冰醋酸;无水乙醇及工业乙醇;工业硫酸;分析纯硫酸;D72或D76显影粉;F5酸性定影粉;Giemsa染液;甘油。

(二)操作程序

1. 实验准备 各种玻璃器皿、培养瓶、细菌滤器及瓶塞等清洗消毒备用。用三蒸水配制RPMI 1640 500~1 000ml,分装于血浆瓶中,三蒸水电度应不小于30万。小牛血

清需灭活(56℃,30~45min)以破坏补体。配肝素溶液浓度为500U/ml或4 μ g/ml;8磅15mim高压灭菌。青、链霉素分别配制为10 000 U/ml及10 000 μ g/ml的溶液备用。按下列比例混合(以每瓶含此种混合液10ml为例):

RPMI 1640	80%~85%(8~8.5ml)
培养液	
小牛血清	20%~15%(2~1.5ml)
肝素	0.08ml
青霉素	100U/ml
链霉素	100 μ g/ml

混合后用5% NaHCO₃调pH至7.0~7.2,分装于小瓶中,密闭瓶塞,置低温冰箱或普通冰箱冰盒中备用。临用前温化至37℃。

2. 操作步骤 以半微量全血法为例,在严格无菌条件下,以肝素液湿润容积为2ml的注射器,推出多余的肝素液,取静脉血1~12ml,在无菌室内或经用乙醇灭菌的翻口瓶塞插入针头,注入全血(7号针头)40滴,血量约为0.6ml,轻轻摇匀,静置37℃恒温箱培养,根据研究需要可培养48~72h。在8h已有相当数量的有丝分裂相,有丝分裂的峰大约在培养60~72h之间。

标准培养法由于用血量大,不易为受检者所接受。虽然各种显带技术以及染色体高分辨显带技术不断发展,但多数都是在Moorhead方法基础上的改良。一般的程序是:取静脉血5~10ml,室温下静置1~2h,或低速离心(400~500r/min)数分钟。此时可见血浆及介于血浆及红细胞层之间的灰白色白细胞层,将血浆及此层吸出混匀,以0.6~0.8ml接种到已配制的混合培养液5ml中,或接种到4ml上述混合培养液中(不含小牛血清)。剩余红细胞层仍可按上述全血法进行培养。

3. 积累中期细胞及染色体标本的制备 在培养终止前4~6h加入秋水仙素或秋水仙胺,一般在5ml培育液内加入3.125 μ g/ml



的秋水仙素 1 滴(4 号针头),以抑制纺锤体丝的形成,使细胞分裂停止在中期。秋水仙素剂量及作用时间,各实验室条件不同,经验不一,如剂量过多或作用时间过久,会使染色体变得粗短,不易进行分析。因此,每个实验室最好事先试验性地确定加入的剂量及时间,以得到适宜的形态及足量的中期分裂相。下列步骤则不须无菌操作:

(1)低渗:培养 72h,将细胞混悬液移入刻度离心管内,1 000r/min 离心 8min,弃去上清液,留 0.5ml,加入已温浴达 37℃ 的 0.075mol/L KCl 溶液 5~6ml,轻轻混匀,置 37℃ 水浴中 20min,离心,吸去上清液。

(2)固定:沿离心管壁缓缓加入新配制的甲醇冰醋酸(3:1)固定液 4~5ml,用滴管轻轻吹打,使液体混匀,放置 20min,离心,吸去上清液。如此固定 3 次。如由于某种原因,不能立即制片时,可将离心管口盖好,置冰箱中过夜或更长时间。

(3)制片:将上述细胞混悬液离心,弃上清液,留 0.2~0.3ml,混匀,立即取 1 滴细胞悬液滴于清洁湿冷的玻片上,静置并空气干燥。此时可只制 1 张片子,将显微镜聚光镜降低,置低倍镜下观察细胞分裂相,主要是观察染色体的分散情况,如由于低渗不足造成染色体分散不佳,可加大冰醋酸在固定液内的比例,再固定 1 次,以改善染色体分散的程度。

(4)染色:用常规方法配制 Giemsa 原液以 pH6.8~7.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液稀释(1:20),染色 10min。

(三)注意事项

外周血淋巴细胞短期培养及制备染色体标本并不困难,但如操作不严或试剂质量不好则可能使培养结果及标本制作不佳或失败。

1. 培养失败的常见原因

(1)水质不合格:各种培养过程中所使用的溶液必须用三蒸水配制,或导电度至少在

30 万 Ω 以上;

(2)玻璃器皿,尤其是培养瓶洗涤不干净,有酸残留;

(3)植物血凝素(PHA)失效;

(4)血清质量不佳;

(5)pH 过高或过低,或培养过程中瓶塞不紧,CO₂ 逸出,导致 pH 值上升;

(6)细菌污染,尤其在夏季是常见的失败原因。如污染不太严重,在 72h 收获时仍可获得一定数量的有丝分裂相细胞;

(7)接种的细胞数目过少或过多;

(8)个体功能状况不佳:在相同条件下,某一受试者的血培养不成功,而对照实验培养结果正常,其原因有时无法查出。

2. 染色体标本质量不佳的常见原因

(1)秋水仙素浓度过高或作用时间过长,使染色体形态粗短以及单体离散;

(2)培养条件不适,分裂相过少,染色体亦较小,而且不易显带;

(3)低渗处理不足或过度,造成染色体分散不佳(重叠、聚积、细胞核质仍保留)以及染色体分散过度甚至丢失;

(4)离心、吹打等操作不当,造成分裂相或染色体的丢失;

(5)固定液不新鲜,以及玻片不够清洁湿冷也影响标本的质量。

目前一些实验室采用所谓预固定的方法,应指出的是,如低渗不充分,或于低渗液中加入固定液过多,造成残留的核质较多,不仅影响染色体的展开,而且会直接影响染色体显带的质量。

三、琼脂培养法

正常上皮或成纤维细胞在体外培养时,必须附着于坚硬而平坦的表面(如玻璃,塑料等)才能生长,这种现象通常称为附着依赖性(anchorage dependence)。恶性转化细胞则往往失去这种附着依赖性,所以能在半固体琼脂培养基中生长成为团块,或能在琼脂固



体培养基表面生长。一般认为琼脂培养法可作为鉴别正常和恶性转化细胞的较为可靠的指标之一。

(一) 器材和试剂

1. 器材 恒温水浴箱;低速离心机及离心管;细胞计数板;培养瓶及各种刻度吸管。

2. 试剂 琼脂(difco);McCoy-5A 综合培养液(5倍浓缩);56℃ 30min 灭活的小牛血清;青、链霉素(青霉素1万U/ml 链霉素1万μg/ml);三蒸水。

(二) 操作程序

1. 半固体琼脂培养法

(1) 营养琼脂的配制:分下层琼脂(0.5%)及上层琼脂(0.3%)。下层琼脂配制方法如下:琼脂 0.25g,三蒸水 32ml,高压灭菌或在 100℃ 水浴煮沸 30min 至融化,待冷却至 50℃ 时依次加入如下成分:McCoy-5A 5倍浓缩液(预热至 50℃)8ml,小牛血清(预热至 50℃)9.5ml,抗生素 0.5ml,8% NaHCO₃ 0.2ml,混合均匀后分装培养液,每瓶加 1.5ml,盖上胶塞后水平放置于室温下,待其凝固。上层琼脂配制方法如下:琼脂 0.15g,三蒸水 32ml,高压灭菌或在 100℃ 水浴煮沸 30min 内融化,待冷却至 50℃ 时,按制备下层琼脂同样的方法,加入各种成分,混合均匀后放置于 40℃ 水浴待用。

(2) 细胞悬液:细胞按常规方法消化,计数并悬浮于 McCoy-5A 培养液中,制成 10 万个细胞/ml 的细胞悬液。

(3) 培养方法:取保温于 40℃ 的上层琼脂 5ml,加入细胞悬液 0.1ml,混匀,上层琼脂中细胞的最终浓度为 2 000 个细胞/ml,迅速地将 1.5ml 含细胞的上层琼脂加至已铺有下层琼脂的培养瓶中,在室温环境放置 10min。然后在保持水平的条件下移置 37℃ 温箱中培养。

(4) 观察:在 37℃ 温箱中培养 14d 后,在倒置显微镜下用低倍镜观察,如细胞能生长成由 50 个以上细胞组成的团块,则称为集

落,为阳性结果。正常细胞在半固体琼脂中不生长。

2. 固体琼脂培养法 营养琼脂的配制方法与半固体琼脂培养法的下层琼脂完全相同,即配成 0.5% 营养琼脂,配毕分装培养瓶,每瓶加 3ml,用胶塞密闭,在室温下水平放置,待凝固后即可使用。如当天不加细胞,可将培养瓶置 4℃ 冰箱待用。细胞悬液同样配成 10 万个细胞/ml,每个培养瓶中加入 1 滴(约含 5 000 个细胞),用弯头滴管轻轻地将其铺开,注意不要划破琼脂。如琼脂颜色偏碱,可通入 CO₂,使其颜色呈橘黄色(pH7.0~7.2),密闭瓶塞,置 37℃ 温箱中培养 4h 后将瓶倒置,使琼脂层位于培养瓶的上方,继续培养。

培养 14d 后,取出培养瓶,先以肉眼观察有否集落形成,然后在普通光学显微镜低倍下观察。如有由 50 个以上细胞组成的集落形成,则判定为阳性。正常细胞在固体培养基表面不能生长。

(三) 注意事项

1. 琼脂与培养液及小牛血清混合液的温度不得超过 50℃,与细胞混合的温度不得超过 40℃,以免损伤细胞及破坏营养成分。

2. 向培养瓶内分装细胞时注意不要产生气泡。

3. 营养琼脂的 pH 不可太偏碱。

4. 若有 CO₂ 孵育箱,可用塑料培养皿代替培养瓶。

5. 有的实验室以 2% 的甲基纤维素半固体培养基替代琼脂培养法,方法基本相同。

四、血管平滑肌细胞培养

鉴于心血管系统发病率、病死率高,严重威胁人类的生命,近年来,开展了平滑肌细胞的培养,在心血管疾病特别是在动脉粥样硬化研究中得到了广泛应用。下面介绍两种细胞培养方法。



(一) 胶原酶消化法

1. 器材与试剂 超净工作台; 37℃ 恒温箱; 电导率仪; 摇摆仪; 离心机; 虹膜剪; 钟表镊; 眼科镊; 止血钳; 单面刀片; 培养瓶; 平皿; 刻度吸管; 滴管; 离心管; 小木板 (0.2cm × 3cm × 5cm); Eagle 培养基 (或 TC199); 小牛血清; 胰蛋白酶; 谷氨酰胺; 胶原酶 I 型; 水解乳蛋白; Hanks 液。

2. 操作程序 胶原酶消化法

① 动物经颈动脉放血处死, 在无菌条件下, 迅速取出主动脉。

② 立即放入含预置 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 液的平皿中漂洗, 需换液 2~3 次, 直至将凝血洗净。

③ 用弯头小镊小心剥除外膜的纤维脂肪层, 并用虹膜剪沿血管外侧纵向剪开, 在 Hanks 液中漂洗 2 次。

④ 将血管内膜面向上, 铺于小木板上, 用单面刀片自上而下刮 1~2 次, 以去除内皮细胞。

⑤ 用钟表镊细心地撕下中膜内、中层, 宽 1mm 以内的小条, 并浸泡在含 10% 小牛血清的 Eagle 培养液的小瓶内。

⑥ 倾去浸泡液, 换入 2~3ml 0.2% 胶原酶液, 盖紧瓶塞, 置摇摆仪上 (37℃ 每分钟 25 次) 振摆 12~18h。

⑦ 待小块血管组织完全消化溶解后, 移入离心管内离心 (1 000r/min) 7min。

弃上清液, 于细胞沉淀中加入新鲜配制的 Eagle 培养基 (含 20% 小牛血清, 青霉素 100/ml 和链霉素 100μg/ml, 并以 5.6% NaHCO₃ 调至 pH7.2), 轻轻吹打, 然后按每瓶 (25ml) 含 25~30 万个活细胞接种在培养瓶内, 放入 37℃ 温箱内静置培养。

3. 细胞的生长和传代

(1) 细胞接种 3d 后, 贴壁的细胞呈放射形伸展, 部分区域已融合生长, 培养基的 pH 偏酸, 需立即换新鲜培养基, 以去掉没有贴壁的细胞及破碎的细胞。

(2) 6~7d 后, 细胞长成单层和多层交错的致密细胞层, 即可传代。传代时, 倾去原有液体, 加 Hanks 液并翻转清洗细胞面, 然后倾去清洗液, 再加 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 混合消化液浸泡 30s~1min, 当镜下可观察到细胞成片地收缩时, 立即倾去消化液, 加入 Hanks 液慢慢翻转洗一遍, 防止细胞随液体倾出。最后加入含 10% 小牛血清的 Eagle 液, 用弯头滴管将细胞自瓶壁上吹打下来, 以 1:2 分装接种。5d 后可再传代。

4. 注意事项

(1) Eagle 培养液须用无离子双蒸水配制, 其水质纯度以电导率仪指示在 0.3μU/cm 内为合格。制成的培养液 (含小牛血清) 的 pH 值在普通温箱内培养不超过 7.2, 在 CO₂ 箱内培养不超过 7.4 为宜。

(2) 合格小牛血清的筛选至关重要, 一般可采用集落形成率试验。即把骨髓瘤细胞以有限稀释法接种在 96 孔板内, 5d 后, 每个瘤细胞增殖到 80 个以上的细胞群的集落达 70% 以上者则为合格的血清。原代培养时, 用 20% 血清; 传代细胞培养时, 可改用 10% 血清。

(3) 胶原酶需用 Eagle 液配制成最终浓度 0.2%, pH 调到 7.2。各种型号的胶原酶均能使用, 但一般均含有不等量的胰蛋白酶成分, 故临用时应加入含量为 10% 的血清以减弱胰酶对细胞的长时间消化损伤作用。

(4) 动物取材与细胞接种量: 一般选择幼年动物的动脉为材料。因平滑肌细胞是大、中动脉中膜惟一的细胞成分, 为得到平滑肌细胞的纯培养, 取材时必须严格分离动脉壁中膜的内、中层作为培养材料。内膜表面的内皮细胞虽经刀片刮后仍难以彻底清除, 而在消化液中内皮细胞经长时间 (10h 以上) 消化就难成活。一条兔主动脉消化下来的细胞以接种 3~4 瓶 (25ml) 为宜。大鼠、豚鼠、树鼩等小动物则需要 4~5 条主动脉方够接种一瓶。接种量一般 15 万~20 万个细胞/ml,