

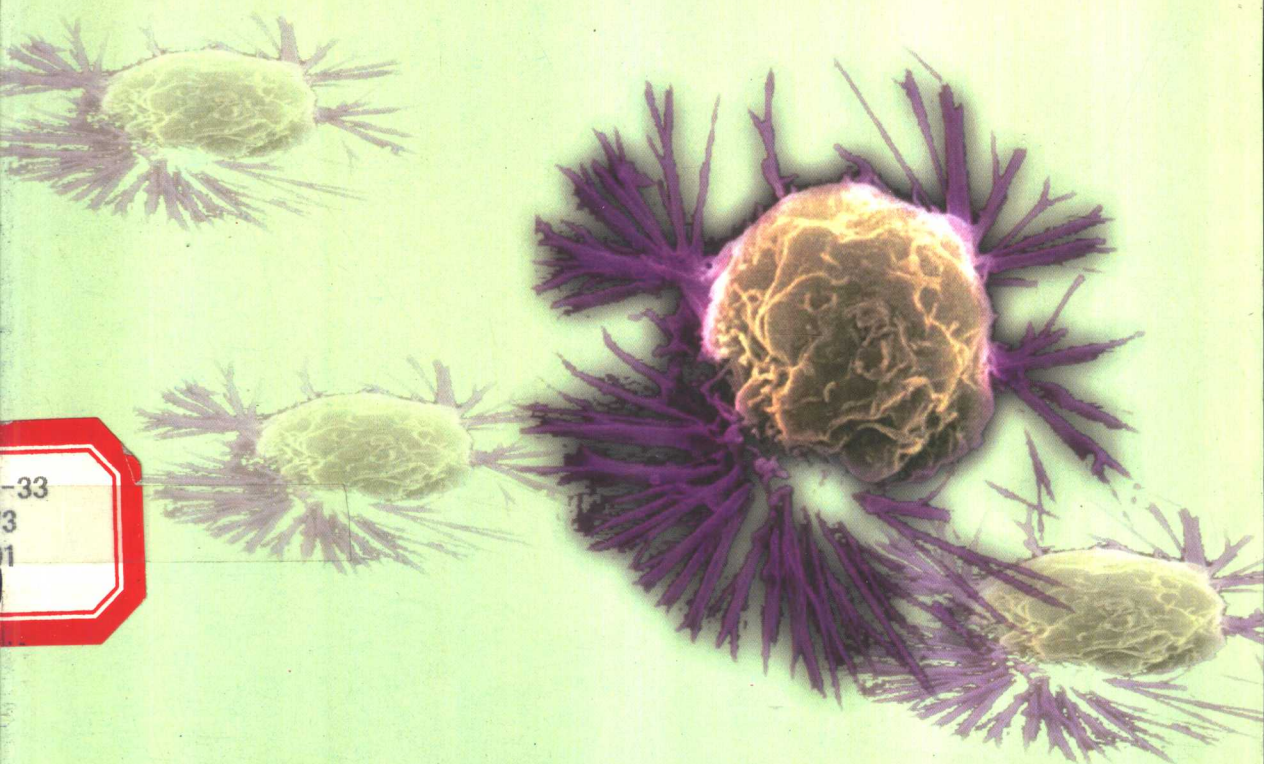


面向21世纪课程教材

现代医学生物学实验基础教程

(供高等医学院校基础、临床、检验、预防专业使用)

主编 周建新



-33
3
1

中国协和医科大学出版社

• 面向 21 世纪课程教材 •

现代医学生物学实验基础教程

(供高等医学院校基础、~~临床~~、检验、预防专业使用)

主 编 周建新

副主编 ~~甘立霞~~ 白云 张放鸣

编 者

细胞生物学部分：张放鸣 闫小美 连小华

生物化学与分子生物学（分子遗传学）部分：

周建新 甘立霞 叶治家 周长保

李渝萍 李蓉芬 康运生 陈 彬

倪 兵 刘 昕 王 燕

免疫学部分：白 云

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代医学生物学实验基础教程/周建新编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2000.10

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-81072-159-3

I. 现… II. 周… III. 医药学: 生物学-实验-医学院校-教材
IV. R31-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 52028 号

·面向 21 世纪课程教材· 现代医学生物学实验基础教程

主 编: 周建新
责任编辑: 陈保林 谢 阳

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65228583)

经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 787 × 1092 毫米 1/18 开
印 张: 12 $\frac{12}{18}$
字 数: 250 千字
版 次: 2001 年 1 月第一版 2001 年 1 月第一次印刷
印 数: 1—3 000
定 价: 21.50 元

ISBN 7-81072-159-3/R·154

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书涵盖了细胞生物学、生物化学与分子生物学、免疫学的基本实验，这些基本实验技术有的也可用于遗传学实验的教学。全书分三部分，第一部分主要介绍了细胞培养和细胞与亚细胞器分离的基本技术；第二部分介绍蛋白质及某些糖、脂、维生素及其他代谢产物测定的基本方法，对酶活性及胰岛素这样的细胞信号分子的分析方法，也作了简单的介绍。这一部分中特别介绍了一些常用的核酸分析及分子生物学实验基本技术，以适应目前对分子生物学知识的要求。此外，还介绍一些实用性的研究方法，第三部分介绍了免疫学研究中的常用方法。

前 言

现代生物学发展迅速，对医学产生了很大影响，研究成果及相应的新技术、新方法，精彩纷呈，令人有目不暇接之感。许多实验技术对现在与未来都正在或将产生深远影响。

根据教育部有关加强学生素质教育的要求，“面向二十一世纪医学院校课程体系改革”课题组在仔细分析我国医学院校基础课教学现状的基础上，结合我们教学实践，将医学细胞生物学、生物化学与分子生物学、遗传学、免疫学等几门课程的实验教学内容整理成这本书，推荐给高等医学院校基础、临床、检验、预防本科生使用，旨在加强学科的渗透交叉，减少教学内容上的重复，提高学生的实验技能。这些学科新的实验技术与方法不断涌现，加之成书仓促，难以揽全，如有关遗传学的实验内容在细胞生物学与分子生物学实验部分散在收集了一些，未能单独列出。只能在修订中逐步跟踪与完善。

本书强调利用有限的教学时间，加强基本知识与技能的训练，为便于自学，采用了较多的插图。收集的实验内容较多，使教学人安排教学时有选择余地，也希望借此拓宽学生的知识面，所选的方法很多具有实用性，可直接用于科研工作。

本书承黎海蒂教授提出了许多宝贵意见，李渝萍、李蓉芬等同志承担了校对工作，所引用的国内外文献恕未列出，特此致谢。

周建新

2000年11月30日

实验须知

科学实验必须具备正确的科学态度和思维方法,运用严密的实验方法,才能得到可靠的实验结果。

(一) 实验前的准备

实验前必须认真预习,明确实验目的和要求,弄懂基本原理,了解操作要点,做好实验安排,以便有计划有步骤地严格按实验操作规程进行实验。

事先做好必要的预习才能独立操作和主动思考,并且获得良好的结果。

(二) 实验时注意事项

1. 实验时必须严肃认真,正规操作,仔细观察,深入思考,客观记录实验现象和结果。

2. 公用试剂用毕后立即盖好瓶塞放回原处,公用仪器应尽快使用,不得随意移动,以免影响他人实验。

3. 使用贵重仪器时,应严格遵守操作规程。初次使用或使用中出现故障,应请教师指导。使用玻璃器皿应轻拿轻放,避免损坏,如有破损应向教师报告,并填写“损耗报销单”,经指导教师签字后,到准备室换取。

4. 实验室内一切器材设备应加爱护,使用试剂、水、电和蒸馏水等,应注意节约。要防止污染试剂。用过的滤纸片等投入污物缸。强酸、强碱用水稀释后再倒入水池,防止水道堵塞和腐蚀。

5. 实验进行过程中应保持肃静,随时注意保持环境、台面及仪器等的清洁整齐。

6. 注意安全,实验室内严禁吸烟。乙醇、乙醚、丙酮等易燃品使用时必须远离火源。要防止强酸、强碱和有毒物质吸入口内或腐蚀皮肤、衣物等。应用放射性核素做实验时应注意防护和防止污染,并要严格遵守操作规程。

7. 如某一实验未得到满意结果,在未进行重复实验前应先找出产生错误的可能原因,再重复进行。

(三) 实验后注意事项

1. 实验结束后,应洗净玻璃仪器放回原处。

2. 整理台面、放好凳子和打扫实验室,检查水、电等是否安全。

(四) 实验报告

每次实验完毕,须及时整理实验记录,依照规定格式写出实验报告,交指导教师评阅。实验记录和报告的要求是:

1. 真实 现象和结果是怎样就怎样写,真正反映客观事实。
2. 完整 观察要连续,记录要完全,不要忽视偶然现象。
3. 原始 要及时记录原始数据和现象,不能凭记忆补写。
4. 条理 记录要清楚有顺序,以便整理和总结。

实验记录和报告的内容除实验日期和题目外,包括:

- (1) 目的要求。
- (2) 原理(简述)。
- (3) 方法 简单叙述实验过程,不要抄录讲义。
- (4) 结果 详细记录实验中的现象和计算的结果。
- (5) 讨论 分析实验所得结果,经过自己思考,提出明确结论。

目 录

第一部分 细胞生物学基础实验

一、细胞培养的基本技术	(1)
实验一 细胞培养室的设置、设备和无菌操作	(1)
实验二 器械的清洗和消毒	(2)
实验三 细胞培养用液的配置及消毒	(3)
实验四 原代细胞的培养 (组织块培养法)	(5)
实验五 原代细胞培养 (胰蛋白酶消化法分离表皮、 真皮细胞)	(6)
实验六 细胞的复苏	(6)
实验七 传代细胞培养	(7)
实验八 细胞的冻存	(8)
实验九 培养细胞的观察	(8)
实验十 细胞悬液中细胞数目的测定	(9)
实验十一 细胞活力的检测	(11)
实验十二 培养细胞的染色体的制备与观察	(11)
二、细胞与细胞器分离技术	(12)
实验十三 心肌细胞的分离	(12)
实验十四 细胞核的分离	(13)
实验十五 溶酶体的分离	(15)
实验十六 线粒体的分离	(16)

第二部分 生物化学与分子生物学基础实验

一、蛋白质与酶分析	(18)
实验一 蛋白质的性质	(18)
实验二 酶反应条件的选择	(23)
实验三 蛋白质含量的测定	(29)

附: 微量凯氏定氮法·····	(35)
实验四 蛋白质的电泳·····	(38)
实验五 氨基酸与蛋白质的层析·····	(48)
实验六 尿液淀粉酶活性测定 (改良 Winslow 法) ·····	(55)
实验七 血清丙氨酸氨基转移酶 (谷 - 丙转氨酶) 活性测定 (改良 Reitman - Frankel 法) ·····	(58)
实验八 胆碱酯酶的反应速度和米氏常数测定·····	(62)
二、糖的测定·····	(65)
实验九 总糖测定 (蒽酮比色法测定糖含量) ·····	(65)
实验十 血糖 (葡萄糖) 测定·····	(66)
三、脂类测定·····	(71)
实验十一 血清甘油三酯简易测定法·····	(71)
实验十二 血清胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇及其亚组分测 定·····	(73)
实验十三 血脂的层析鉴定·····	(78)
四、代谢产物测定·····	(80)
实验十四 血清尿素氮含量测定 (改良二乙酰 - 胍法) ·····	(80)
实验十五 血液和尿中肌酐含量测定·····	(81)
实验十六 血清胆红素定性和定量测定·····	(85)
五、维生素分离分析·····	(88)
实验十七 食物中胡萝卜素的柱层析和定量测定·····	(88)
实验十八 食物中维生素 C 含量测定 ·····	(91)
六、细胞信号传导分析·····	(94)
实验十九 血浆胰岛素放射免疫测定·····	(94)
附: 红细胞胰岛素受体测定·····	(100)
七、核酸与分子生物学实验·····	(104)
实验二十 核酸含量测定·····	(104)
实验二十一 真核细胞中核酸的分离·····	(109)
附: mRNA 的分离与纯化 ·····	(112)
实验二十二 重组 DNA 基本方法 ·····	(115)
附: 分子生物学实验室其他常用方法·····	(122)
实验二十三 多聚酶链式反应 (PCR) 技术 ·····	(137)
实验二十四 核酸分子探针标记与杂交实验·····	(139)
附: 放射性核素标记探针制备及杂交方法·····	(144)

实验二十五	DNA 序列测定技术——双脱氧末端终止法测定 DNA 序列	(152)
实验二十六	Internet 在分子生物学中的应用——利用 www 进行核酸同源序列的比较分析	(154)
八、常用仪器分析		(158)

第三部分 免疫学基础实验

实验一	血清 IgG 的提纯	(185)
实验二	单向琼脂扩散试验	(188)
实验三	双向免疫扩散试验	(189)
实验四	琼脂免疫电泳	(190)
实验五	火箭免疫电泳	(191)
实验六	对流免疫电泳	(193)
实验七	免疫酶标技术	(194)
实验八	免疫印迹技术 (Western blotting)	(196)
实验九	补体结合试验	(199)
实验十	血清总补体活性的测定 (CH_{50} 试验)	(202)
实验十一	PEG 沉淀补体消耗试验 (PEG - CC)	(204)
实验十二	吞噬细胞吞噬试验	(205)
实验十三	E - 玫瑰花试验	(206)
实验十四	淋巴细胞转化试验	(208)
实验十五	流式细胞仪自动细胞记数法 (FCS)	(209)
实验十六	细胞因子活性测定	(210)
附录		(214)

第一部分 细胞生物学基础实验

一、细胞培养的基本技术

实验一 细胞培养室的设置、设备和无菌操作

【目的和要求】了解细胞培养室的设置和设备，掌握无菌操作要领。

【设置和设备】一个细胞培养实验室至少应该能开展以下几个方面的工作：无菌操作、孵育、制备、清洗消毒、储藏等。

1. 无菌室 一个完整的无菌操作间应有：超净工作台（可以进行细胞培养和其他无菌操作），CO₂ 孵箱（用于孵育细胞和其他培养物），倒置显微镜（可观察细胞和其他培养物），台式离心机（可以分离细胞），水浴锅（可以复苏细胞及预期热培养基等），4℃电冰箱（用于短期存储培养基、血清、PBS、胰酶等）。

2. 缓冲间 无菌室外应有一较大的缓冲间，供操作人员更衣用。冻存细胞的液氮罐可放入缓冲间。

3. 准备室 用于清洗、消毒、制备蒸馏水、配制培养基等。准备室设有洗水池用于清洗各种器皿和器械；酸缸用于浸泡各种玻璃器皿，清除其上的各种碱性物质、重金属（如：铅、砷等）及干涸后粘附于玻璃上的蛋白质、脂类物质等；高压消毒器用于器皿器械消毒；双蒸水蒸馏器和单蒸水蒸馏器用于制备双蒸水和单蒸水，以备配制培养基和冲洗培养器皿、器械用。

【无菌操作】细胞培养应在严格的无菌条件下进行，对操作环境、实验人员和操作方式均有严格的要求。

1. 无菌室及超净工作台的灭菌 无菌室应定期打扫，每次实验前应该开紫外灯照射 30 分钟左右。超净工作台面每次使用前后均应该用 75% 酒精

擦洗台面,并用紫外灯照射 30 分钟左右。带入超净工作台内的物品需要经过消毒灭菌处理。 CO_2 孵箱也应定期消毒。

2. 实验人员的消毒 实验人员在进入无菌室操作之前应剪指甲,用肥皂仔细洗净双手,穿无菌衣,戴隔离帽和口罩,在无菌室门口换专用拖鞋方可进入。进入无菌室后需要用酒精棉球擦拭双手后才能进行操作。

3. 无菌操作方式 实验前要点燃酒精灯,各种操作均应靠近酒精灯火焰。开瓶,盖瓶前瓶口应过火焰,吸管不能乱碰器皿,加液不能将吸管伸入培养瓶内,否则应换干净吸管。在整个操作过程中所有瓶口尽量不要口朝上放,动作尽量轻,做到有条不紊,忙而不乱。

实验二 器械的清洗和消毒

【目的和要求】掌握去除器皿上杂质、各种微生物以及对细胞生长有影响物质的主要方法。

【实验器材】培养瓶、培养皿、吸管、解剖剪刀、镊子、洗涤剂、蒸馏水、70%酒精溶液、酸液、来苏尔液、不同规格毛刷。

【操作步骤】

1. 玻璃器皿的洗涤和消毒

(1) 新玻璃器皿的洗涤和消毒

1) 先用清水浸泡,然后用毛刷刷洗;烘干后在低浓度盐酸中浸泡 12 小时,以彻底除去脏物及铅、砷等细胞有毒害物质。

2) 用自来水冲去全部酸液后,再用洗涤剂洗刷以清除器皿内外表面的杂质。

3) 用具有强氧化性、强去污能力且对玻璃无损伤的洗液浸泡,使残留的微量杂质被完全清除。在泡酸过程中要戴耐酸手套,穿工作服,防止洗液损伤皮肤或烧坏衣服;泡酸器皿应充满洗液,内部不留气泡,时间 12 小时以上。

4) 泡酸后的器皿必须用流水反复冲洗 10 次以上,直到酸液全部冲净,器皿表面不出现水珠为止,然后用蒸馏水冲洗 3 次,有条件的用三蒸水冲洗一次。

5) 将冲洗干净的器皿置于烤箱内 ($40 \sim 50^\circ\text{C}$) 烘干后,用干净的布或纸包起来,放入电热压力蒸气消毒器内进行湿热消毒,此过程要保证被消毒器皿内的空气流通以防止玻璃破裂和消毒不彻底。

6) 为了保证消毒效果,待消毒的物品不要装得太满,加热升压之前,

打开排气阀以排除消毒器内空气；关闭排气阀后至压力上升到 15 磅后开始计时 20 分钟，同时必须控制压力恒定在 10 磅（通过控制电源）。消毒完毕后，要先打开排气阀，待压力为零时再打开消毒器的盖子，以免发生危险。

7) 从消毒器中取出已消毒好的物品，将其置于烤箱中把水分烤干，最后可放在无菌室或超净工作台上备用。

(2) 旧玻璃器材的清洗和消毒 在细胞培养中已经使用过的器材和培养瓶、培养皿等，在使用后应立即放入来苏尔液中浸泡 1~2 天。取出用洗涤剂洗净后置于洗液浸泡 12 小时以上，以下步骤同 (1) 中的 4)~7)。

2. 金属器械的清洗和消毒 金属器械不能泡酸，一般用洗涤剂洗刷干净后再用自来水蒸馏水反复冲洗干净，最后用 70% 酒精擦拭干净，置于铝饭盒内进行湿热消毒（即 15 磅高压 20 分钟）。

3. 橡胶、塑料等物品的清洗和消毒 将待清洗物置于洗涤剂中浸泡 12 小时，洗刷干净后，用双蒸水冲洗，然后置于烤箱内烘干，最后包装并进行湿热消毒。

4. 细胞培养室的清洁与消毒 在进行细胞培养前，细胞培养室的地面、桌面应先用干净的抹布抹净，再用稀释的来苏尔液拖抹，最后用紫外线灭菌消毒，也可同时使用消毒杀菌机。

实验三 细胞培养用液的配置及消毒

【目的和要求】通过实际操作了解和掌握细胞培养试剂的配制和消毒方法。

【器材和试剂】电热蒸馏器、电子天平、烧杯、量筒、磁力搅拌器、滤器、滤膜、500ml 玻璃瓶、胶头滴管、三蒸水、干粉型培养基、胰蛋白酶、精密 pH 试纸、青链霉素、1mol/L 盐酸、1mol/L NaHCO_3 液、NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 。

【操作步骤】

1. 水的制备 细胞培养用水必须经过高度纯化，不含离子及其他杂质。单蒸水通常使用金属蒸馏器制备，双蒸水和三蒸水用玻璃蒸馏器制备。在制备蒸馏水过程中要求调节适当的水压、水流速度、以便于高纯水最大限度的蒸发和冷却。

2. PBS——平衡盐溶液的配制和消毒

配制方法：因无沉淀形成，所以无须考虑药品的添加顺序

(1) 准确称量 NaCl 8.00g, KCl 0.20g, Na_2HPO_4 1.56g 和 KH_2PO_4 0.20g

(对含结晶水的物质经过分子量换算后称量)。

(2) 将它们置于 950ml 三蒸水中混匀, 然后用 1mol/L HCl 和 1mol/L NaHCO_3 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4, 最后加三蒸水定容至 1000ml。将新配制的 PBS 分装在 500ml 玻璃瓶中并注明名称、配制时间, 最后 15 磅 30 分钟湿热消毒灭菌, 4℃ 冰箱储存备用。

3. 胰蛋白酶的配制与消毒 称取一定量的胰蛋白酶, 按 0.25% 的浓度加入三蒸水, 将 pH 调至 7.2 左右, 然后在超净工作台内用注射器进行过滤除菌, 最后分装于干净的三角烧瓶或细胞培养瓶内, 同时需要用记号笔注明名称和配制日期。

4. 干粉型培养基的配制与消毒

(1) 将培养基溶于总量 1/3 的双蒸水中, 用水冲洗包装袋内表面 2 ~ 3 次, 以保证干粉型培养基全部溶解。将含有培养液的烧杯放置于磁力搅拌器上搅拌, 按照培养基说明的要求, 添加一定量的所需药品。

(2) 加入 100 万 U/瓶的青、链霉素, 将其溶解在 5ml 灭菌蒸馏水内, 每 1000ml 培养液加 0.5ml, 使其最终浓度为 100U/ml。

(3) 调整培养基的 pH 值 (用 1mol/L 盐酸、1mol/L NaHCO_3), 加入三蒸水定容, 最后用蔡氏滤器进行过滤消毒除菌, 通常采用孔径 0.22 μm 和 0.45 μm 滤膜各一张, 其中要求滤膜光面朝上且 0.45 μm 的滤膜位于 0.22 μm 的滤膜之上。

(4) 将经过过滤消毒除菌后的培养基分装于玻璃容器中, 标明名称和配制日期即可。

注意: 不含有机物的无机盐溶液可用湿热消毒, 而含有蛋白质、有机物的培养、胰蛋白酶等液体禁止采用高温消毒, 应该使用过滤消毒除菌。

5. 青、链霉素的配制与消毒 配制青、链霉素双抗液必须用灭菌蒸馏水, 青、链霉素最终要求的浓度应该为 100U/ml。将 80 万 U/瓶的青霉素溶于 4ml 灭菌蒸馏水中, 在 1000ml 的培养基中加入 0.5ml; 将 100 万 U/瓶链霉素溶于 5ml 灭菌蒸馏水中, 在 1000ml 的培养基中加入 0.5ml 即可, 灭菌蒸馏水是将重蒸水进行高压湿热消毒来制备的。

6. 血清的灭活 常用小牛血清, 取出置于 56℃ 水浴锅中, 30 分钟即可灭活。灭活的目的是除去血清中的补体, 补体有毒性, 对细胞生长、贴壁有影响。

实验四 原代细胞的培养（组织块培养法）

【目的和要求】

1. 通过实验了解原代细胞培养的一般方法和步骤。
2. 培养无菌操作的习惯。

【原理】动物机体或组织从机体中取出剪成碎块后，移入适当的器皿内，若给予所需营养（培养基）、pH、温度等条件，组织块内的细胞能移出组织块贴壁生长繁殖。

【器材和试剂】

1. 解剖剪、解剖镊、眼科剪、眼科镊、培养皿、培养瓶、吸管、酒精灯、倒置显微镜、CO₂孵箱、无菌衣、帽、口罩、手套等。
2. PBS 缓冲液（含青、链霉素各 400U/ml），配制好的可用（含青、链霉素和一定量小牛血清）培养基，75%酒精。
3. 新生 Wistar 大鼠。

【操作步骤】

1. 取材

（1）将新生 Wistar 大鼠用 75%酒精液浸泡消毒 1~2 分钟后，剖腹暴露出肝脏，剪肝组织 2~3cm 放入一干净平皿中。

（2）用加有高抗的 PBS 缓冲液（青、链霉素含量分别为 400U/ml）将肝组织清洗 1~3 次后放入另一个平皿中。用吸管吸取 0.5ml 左右培养液置肝组织上，再用弯头眼科剪将肝组织剪成 1mm³ 左右的小块。

2. 种植

（1）用吸管将剪好的组织块吸入，放置 25ml 培养瓶底部，尽量放置均匀。

（2）另用一根吸管吸取适量培养液沿培养颈部壁轻轻加入，以保持组织块湿润即可，千万不要淹没组织块，使组织块漂浮，造成培养失败！

（3）将培养瓶盖好，标记后，置 37℃ CO₂ 培养箱孵育。

3. 观察 24 小时后在倒置显微镜下观察，可见少量肝细胞从组织块中游离贴壁，可补加培养基，48 小时后即可见大量透明度较高的新生肝细胞以组织块为中心呈现放射状排列。

实验五 原代细胞培养 (胰蛋白酶消化法分离表皮、真皮细胞)

【目的和要求】

1. 了解胰酶消化法分离培养表皮和真皮细胞的方法和步骤。
2. 认识细胞培养中两种类型的细胞。

【原理】动物机体的各种组织或器官从机体中取出，用胰蛋白酶处理分散成单个细胞，将一定数量的单个细胞置合适的培养容器中，再给予所需培养基，在适宜的 pH 和温度下，细胞能生存、生长和继续繁殖。

【器材和试剂】

1. 眼科剪、眼科镊、培养皿、培养瓶、各种吸管、试剂瓶、酒精灯、倒置显微镜、普通冰箱，水浴锅、血细胞计数板、无菌衣、帽、口罩、CO₂ 孵箱等。

2. 无菌高抗 PBS 缓冲液（青、链霉素各 400U/ml）、含 10% 小牛血清的培养基，0.25% 胰蛋白酶液，75% 酒精。

3. 新生 Wistar 大鼠。

【操作步骤】

1. 取材和消化 用 75% 酒精消毒新生大鼠后，剪背部皮肤，移入无菌培养皿，带入超净台后，加高抗 PBS 洗 3~4 次，剪成长条形，转入 10ml 血清瓶中，加入 0.25% 胰蛋白酶液，在 4℃ 冰箱中消化过夜。

2. 用镊子小心分离消化过夜的真、表皮，PBS 洗 2 次，将真、表皮分别放入两个离心管中，加培养基，吹打成细胞悬液，吸取悬液离心，弃上清，加 2ml 培养基吹打后，分别转入培养瓶，标记后放入 CO₂ 培养箱中培养过夜。

3. 观察 24 小时后观察细胞贴壁情况，注意表皮细胞与真皮细胞在形态结构上的差别。

实验六 细胞的复苏

【目的和要求】学习细胞复苏的方法步骤，领会细胞复苏过程中的要领。

【原理】冻存一定时间的细胞，取出融解，重新再恢复其活力的过程，即为复苏。由于快速融化冻存细胞，能避免水分渗入细胞内形成再结晶，故：复苏时，应该尽量使细胞在短时间内融化。

【器材与试剂】37℃水浴、夹钳、吸管、离心管、培养瓶、酒精灯、酒精棉球、培养液、天平、普通离心机。

【操作步骤】

1. 从液氮中取出装有细胞的冻存管，用夹钳夹住放入 37℃水浴，不停摇晃，使其尽快融化。

2. 在超净工作台上用酒精棉球擦拭冻存管，打开冻存管盖，吸出细胞悬液，注入离心管中，滴加 5 倍以上培养液，混匀、离心、去上清液。

3. 用新培养液适当稀释离心管中细胞，制悬，按 $(1 \sim 10) \times 10^5$ 密度，将细胞接种于培养瓶中，放于 CO_2 孵箱中静置培养。

实验七 传代细胞培养

【目的和要求】

1. 学习传代细胞培养的原理及一般方法。
2. 能比较熟练地完成传代细胞培养的各操作步骤。

【原理】培养的细胞通过增殖达到一定数量后，为了避免因为生存空间不足或密度过大造成的营养障碍。需要加以及时的分离，稀释，此过程即为传代。

贴壁生长的细胞用消化法传代，常用的消化液有 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 液。悬浮生长的细胞可采用离心分离后传代，或用自然沉降法吸除上清后，再吹打传代。

【器材和试剂】吸管、培养瓶、离心管、计数板、倒置显微镜、培养液、0.25% 胰蛋白酶、天平、普通离心机。

【操作步骤】

1. 贴壁细胞的传代培养

(1) 弃去原培养瓶中的旧培养液。

(2) 加入适量的 PBS (因培养基中的小牛血清对胰蛋白酶有抑制作用)，轻轻摇动，清洗残留的培养液后倒掉。

(3) 加入适量的消化液，使其覆盖整个细胞，将培养瓶放置于 CO_2 培养箱，不时在倒置显微镜下观察，当细胞胞质回缩，胞间间隙增大后，吸出消化液，并向培养瓶中加入含 10% 小牛血清的培养液终止消化。

(4) 用吸管吸取培养瓶中的培养液，反复吹打瓶壁制备细胞悬液，吹打时不能用力过猛，尽量不出现气泡，以免损伤细胞。

(5) 接种 对上述细胞进行计数后，按照 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 密度将细胞接种