

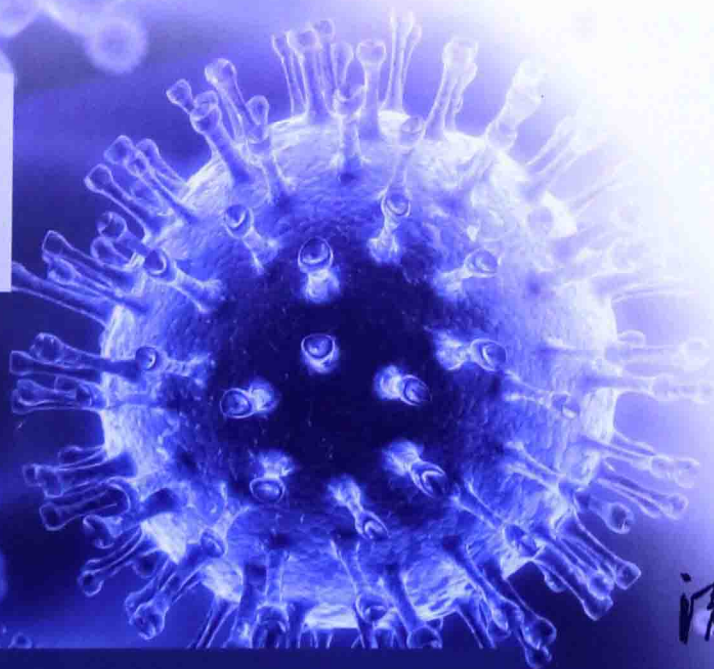
普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材
高等院校生命科学与技术实验教材

细胞工程

实验指导



钱 洁 房健民 主编

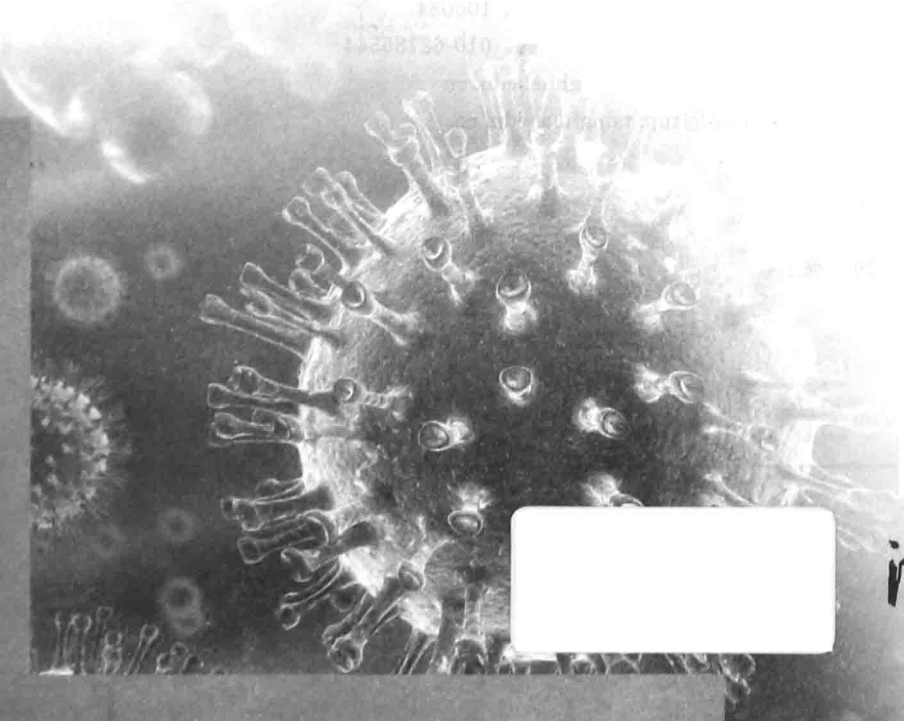


清华大学出版社

高等院校生命科学与技术实验教

细胞工程 实验指导

钱 洁 房健民 主编



清华大学出版社
北 京

内 容 简 介

本实验指导由动物细胞工程与植物细胞工程两大部分组成,全书分为7章,共设置基础性和综合性实验项目23个。内容包括动物细胞培养技术、单克隆抗体制备、哺乳动物细胞大规模培养、动物细胞工程应用技术、植物组织与细胞培养基本技术及其应用等,适合作为普通高等院校生物技术、生物工程专业细胞工程实验教材,也适合相关技术与研究人员参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程实验指导/钱洁,房健民主编.--北京:清华大学出版社,2014
高等院校生命科学与技术实验教材
ISBN 978-7-302-38778-7

I. ①细… II. ①钱… ②房… III. ①细胞生物学—实验—高等学校—教材 ②细胞工程—实验—高等学校—教材 IV. ①Q2-33②Q813-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第291104号

责任编辑:李 君 王 华

封面设计:戴国印

责任校对:赵丽敏

责任印制:宋 林

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 刷 者:北京富博印刷有限公司

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm

印 张:4

字 数:97千字

(附光盘1张)

版 次:2014年12月第1版

印 次:2014年12月第1次印刷

印 数:1~2000

定 价:25.00元

产品编号:052109-01

编者名单

主 编 钱 洁 (同济大学)

房健民 (同济大学)

副主编 邓志瑞 (上海大学)

编 委 崔香环 (同济大学)

尹衍新 (同济大学)

黄 海 (上海大学)

盛哲津 (同济大学)

李红文 (同济大学)

细胞工程是一门集现代生物科学与工程于一体的综合性应用学科，它在高等院校生物技术及相关专业的课程设置中占有重要地位，学好这门课程，将为学生今后从事生命科学领域的研究及与其相关的生物技术领域产业化工作打下良好的基础。国家发展改革委员会在《十二五生物技术的发展规划》提出“加强高素质生物技术人才建设，重点培养生物技术原始性创新人才、工程化开发人才”。这对高校生物技术专业人才培养提出了新的要求：要求培养的学生具有不断更新知识，掌握学科发展的前沿和动态、分析问题、解决问题以及把知识转化为现实生产力的创业能力。

同济大学本科教学一直坚持以学院学科发展优势为基础，重视学生的知识积累和创新、创业能力的培养；坚持以科研反哺教学，着眼于学生综合素质的提高，以适应当今社会对人才的需求；积极推进相关实验课程教学改革，强化学生实践能力培养。细胞工程实验开设以来，充分利用同济大学苏州研究院在抗体药物研究和制备方面的实力和医学与生命科学实验教学中心现有的教学条件开出了以单克隆抗体制备为代表的实验手段先进、应用性强的综合性实验项目。使细胞工程实验项目所用的实验技术紧密贴合科研实际，保证了实验方案设计的科学性和先进性。将科研训练纳入本科生的实验教学，提升本科实验教学的水平。其中，“单克隆抗体制备”实验于2013年被评为同济大学优秀精品实验项目，多年的教学实践为细胞工程实验教材建设打下了坚实的基础。

立足于我院细胞工程实验的开设经验，联合上海的兄弟院校共同编写了这本细胞工程实验教材。全书分为动物细胞工程和植物细胞工程实验两部分，共设置了基础性实验和综合性实验23个，以期为本科学学生和相关技术人员提供实验指导。为进一步加强实验教材的应用性，精心拍摄和制作了实验操作教学录像片与教材配套出版。

由于缺乏编写经验，错误与不妥之处难免，敬请批评指正，以便修订。

主 编

2014年9月

CONTENTS

目 录

第 1 章 动物细胞培养技术	1	实验十四 DNA 原核显微注射法制备 转基因小鼠	30
实验一 动物细胞原代培养	1	第 5 章 植物组织与细胞培养基本 技术	36
实验二 动物细胞传代培养	4	实验十五 烟草愈伤组织诱导与 分化	36
实验三 培养细胞生长曲线测定	6	实验十六 植物原生质体的制备	38
实验四 培养细胞的活力测定	7	实验十七 烟草细胞的悬浮培养	40
实验五 培养细胞的冻存与复苏	9	第 6 章 植物细胞工程应用技术	42
第 2 章 单克隆抗体制备	12	实验十八 烟草花药的离体培养	42
实验六 动物免疫	12	实验十九 植物多倍体人工诱导	44
实验七 融合细胞的准备	14	实验二十 植物细胞悬浮法培养生产 β -胡萝卜素	46
实验八 细胞融合与选择性培养杂 交瘤细胞	16	第 7 章 现代生物技术在植物细胞工程 中的应用	49
实验九 杂交瘤阳性克隆筛选	20	实验二十一 基因枪法转化植物和 外源基因瞬时表达	49
实验十 杂交瘤细胞克隆化培养与 杂交瘤细胞(株)冻存	21	实验二十二 烟草叶盘法基因转化	52
第 3 章 哺乳动物细胞大规模培养	23	实验二十三 拟南芥花序浸染法	54
实验十一 波浪式反应器大规模 培养	23		
实验十二 搅拌式反应器大规模 培养	25		
第 4 章 动物细胞工程应用技术	27		
实验十三 小鼠胚胎神经干细胞的 分离培养和诱导分化	27		

第 1 章 动物细胞培养技术

细胞培养是从体内组织取出细胞并模拟体内生存环境，在无菌、适当的温度及酸碱度和一定营养条件下，使其生长繁殖并维持结构和功能的一种培养技术。从体内取出细胞首次培养即为原代培养（primary culture），这是细胞培养的最初和必经阶段。当原代培养细胞生长到一定时期时，受到群体环境限制，就需要转移到另一容器才能继续生长，称为传代或继代培养（subculture）。

细胞培养在现代生物技术中应用广泛，利用细胞培养开展体外试验，成为阐明生命现象、疾病发病机制和筛选药物的重要手段，利用细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等，已成为生物技术产业的重要组成部分。

实验一 动物细胞原代培养

一、实验目的

1. 掌握动物细胞培养的无菌操作技术。
2. 掌握动物细胞原代培养的基本方法。

二、实验原理

动物细胞培养指将动物细胞或组织从机体内取出，并人工模拟体内的生理环境，在无菌、适当的温度和营养条件下，维持细胞的形态结构与功能，使其生存、生长和繁殖的体外培养方法。动物细胞培养技术不仅是基因工程、体细胞克隆、转基因动物、生物制药、干细胞、细胞生物学、微生物学、遗传学、病毒学、免疫学等学科研究的有力工具，也是细胞工程领域广泛采用的技术手段。因此，学习和掌握动物细胞培养技术具有重要的科研和生产价值。

原代培养（primary culture）指取自体内的新鲜组织、细胞，在体外条件下生长至传代之前的细胞培养阶段，是细胞培养的最初和必经阶段。原代培养方法主要有组织块贴壁培养法和分散细胞培养法。

组织块贴壁培养法是将切成小块的组织贴附在适宜的支持物上，细胞从组织块边缘游离、生长，形成单层细胞即为原代培养细胞。

分散细胞培养法是通过酶消化或机械分离，使组织分散成单个细胞，然后开始首次培养的方法。

三、实验材料

1. 动物材料 出生 2 周内的大鼠。

2. 实验试剂

- (1) D-Hank 液。
- (2) 75%乙醇。
- (3) 0.05% IV型胶原酶液。
- (4) DMEM 培养基。
- (5) 小牛血清。
- (6) 双抗溶液。
- (7) 0.4%台盼蓝染液。

3. 实验器材 超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂培养箱、水浴锅、离心机、眼科剪、眼科镊、移液器及枪头、培养皿、烧杯、细胞培养瓶、吸管、离心管、血细胞计数板、载玻片、盖玻片、200目不锈钢筛网、酒精灯、75%乙醇棉球、记号笔等。

四、实验方法与步骤

(一) 组织块贴壁培养法

1. 取1只大鼠，颈椎脱臼法处死，浸入75%乙醇消毒。
2. 将大鼠置于超净台中的大培养皿中，背部朝上，用75%乙醇棉球擦拭其整个背部皮肤。
3. 用眼科镊提起大鼠腰部皮肤，用眼科剪横向剪开皮肤，稍用力将剪开的皮肤拉向两端，暴露腰部。更换解剖器械，剪开腰部的肌肉、被膜，取出肾脏，置于培养皿中。
4. 更换解剖器械，去除肾被膜，去除肾盂，用含有双抗的D-Hank液清洗3次，剪取肾皮质部分，移入小烧杯中，加入少量D-Hank液，剪成1mm³左右的组织块。用D-Hank液清洗3次，吸去上清液，尽量去除血细胞。
5. 用弯头镊子将组织块移入细胞培养瓶，整齐贴在瓶壁上，组织块间距2~3mm，翻转培养瓶，使贴有组织块的一面朝上，小心加入3mL含10%小牛血清的DMEM培养基，培养液不要接触组织块。
6. 将培养瓶移入37℃的5% CO₂培养箱，贴有组织块的一面朝上，静置2~3h。小心翻转培养瓶，使组织块浸入培养液，继续静置培养。
7. 2~3天后，将培养瓶小心取出，置于倒置相差显微镜下，观察贴壁的组织块边缘游离出来生长的细胞。每2天半量换液。随着组织块周围生长细胞的数量增多，会形成生长晕。当组织块的生长晕相接时，可去除组织块，此时形成的单层细胞是原代培养细胞。

(二) 分离细胞培养法

步骤1~4同上述(一)组织块贴壁培养法的步骤1~4。

5. 向组织块中加入0.05% IV型胶原酶消化液，37℃水浴振荡消化5min后，用吸管吹打数次，吸取上清液于离心管中，在4℃冰箱中保存，向剩余组织块中添加胶原酶消化液，继续37℃水浴振荡消化，每隔5min，用吸管反复吹打，收集上清液，直至组织块完全消化。全部上清液在4℃、800r/min条件下离心5min，弃去上清液，向沉淀中加入培养液，吹打成悬液。

6. 用200目不锈钢筛网过滤，去除较大组织块，滤液在4℃、500r/min条件下离心5min，弃去上清液。向沉淀中加入3mL含10%小牛血清的DMEM培养液，重悬细胞。

7. 用血细胞计数板进行细胞计数并测定存活率。将细胞以 $(3\sim5)\times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于25mL培养瓶中,每瓶加入细胞悬液3mL。在培养瓶上标注组织来源、实验者姓名和实验日期。将培养瓶移入37℃的5% CO₂培养箱,静置培养。

8. 逐日观察细胞的生长状态。2天后进行换液,去除悬浮在培养液中的无活性细胞。待细胞铺满瓶底,可进行传代培养。

五、实验结果

1. 组织块贴壁培养法实验中,2天后可见细胞从组织块边缘游离长出。

2. 分离细胞培养法实验中,细胞12h贴壁,24h可见细胞从小细胞团周边生长,2~3天可长成单层,细胞呈扁平不规则多边形,鹅卵石样排列(图1-1,图1-2)。

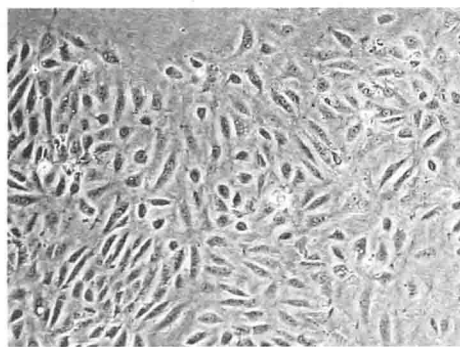


图1-1 胶原酶消化法原代培养72h的大鼠肾细胞

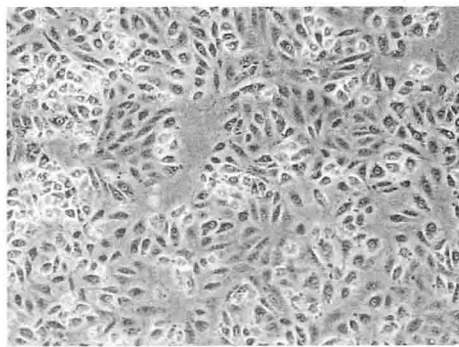


图1-2 胰酶消化法原代培养48h的大鼠肾细胞

六、注意事项

1. 原代培养过程中所使用的解剖器械、培养基、溶液、器皿等要经过高压灭菌或过滤除菌后方可使用。

2. 解剖动物和取材的各个步骤应更换解剖器械,以免细胞被污染。

3. 在CO₂培养箱中,若选用的培养瓶螺旋盖不带有滤膜,则应将瓶盖拧松,保持通气状态。

4. 实验过程中,实验人员要严格遵守无菌操作流程。动作要轻柔,安装吸头、打开或封闭瓶口等操作应在火焰近处并经过烧灼后进行。操作时,避免讲话、咳嗽,以防唾沫或呼出气流造成污染。取用液体前不宜过早开盖,使用完毕应立即封闭瓶口。吸取液体或细胞悬液时,应专管专用,一旦吸管前端接触了手或其他污染物时应更换,吸出后残留的液体不可重新加入原瓶,以防污染扩大或造成培养物间的交叉污染。

5. 实验结束后,应将实验废液或废物及时移出无菌室,并用消毒水擦拭超净台,保证清洁。

七、思考题

1. 结合实验记录,比较组织块贴壁法和分离细胞法培养的乳鼠肾细胞原代细胞的生长特点。
2. 分析影响原代细胞培养的主要因素。



实验二 动物细胞传代培养

一、实验目的

1. 掌握动物细胞培养的无菌操作技术。
2. 掌握动物细胞传代培养的基本方法。

二、实验原理

传代培养 (subculture) 是当细胞在培养器皿中生长到一定密度后, 被分开接种到新的培养器皿中的培养方法。当原代培养细胞生长到一定密度, 受到群体环境限制, 就需要将细胞转移到另一容器中, 称为传代培养。

根据原代培养物性状的一致性与否, 传代成功后称为细胞系 (cell line) 或细胞株 (cell strain)。这些细胞一般可顺利传代 40~50 代, 并保持染色体二倍体数量和接触抑制的特性。传至 50 代左右时则出现细胞生长停滞, 大部分衰老死亡, 此类为有限细胞系。有些细胞在传代培养过程中, 发生遗传突变获得持续增殖能力成为无限生长繁殖的连续细胞系。

贴壁型和悬浮生长细胞的传代培养方式有所差异, 贴壁型细胞传代时需要用胰酶消化或联合使用 EDTA 溶液, 使细胞从支持物上脱落、分散, 然后进行传代培养。

三、实验材料

1. 动物细胞 HeLa 细胞、HL-60 细胞。

2. 实验试剂

- (1) DMEM 培养基。
- (2) 0.25% 胰蛋白酶消化液。
- (3) PBS 溶液。
- (4) 75% 乙醇。
- (5) 小牛血清。
- (6) 双抗溶液。

3. 实验器材 超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂ 培养箱、水浴锅、离心机、移液器及枪头、细胞培养瓶、直吸管、弯头吸管、离心管、血细胞计数板、载玻片、盖玻片、酒精灯、75% 乙醇棉球、记号笔等。

四、实验方法与步骤

(一) 贴壁型细胞传代

1. 将待传代的 HeLa 细胞置于倒置相差显微镜下, 观察细胞的生长状态。选择铺满瓶底面 80% 以上的单层细胞进行传代。

2. 将 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清和双抗)、0.25% 胰蛋白酶消化液和 PBS 溶液在 37℃ 水浴中预热。用 75% 乙醇棉球擦拭手和瓶壁。



3. 在超净台中, 打开培养瓶盖, 轻轻晃动培养瓶后倒去培养液, 然后加入 3mL PBS 溶液, 润洗贴壁细胞后倒去。

4. 加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶消化液, 轻轻晃动培养瓶, 使消化液均匀浸润贴壁细胞, 盖上培养瓶盖, 将培养瓶移入 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱, 消化 2~3min。

5. 在倒置显微镜下观察, 待大部分贴壁细胞形状变圆, 尚未完全脱离瓶底表面时, 迅速倒去消化液并加入 3mL DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清和双抗), 终止消化反应。

6. 用弯头滴管反复吹打消化后的贴壁细胞, 直至瓶壁上的细胞全部脱落、分散。

7. 将细胞悬液吸入 10mL 离心管, 以 1000r/min 速度离心 5min, 弃上清液, 向沉淀中加入 6mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 反复吹打, 重悬细胞。

8. 用血细胞计数板进行细胞计数。将细胞悬液接种至 2 个 25mL 培养瓶中, 每瓶 3mL, 盖上瓶盖。

9. 在培养瓶上标注组织来源、实验者姓名和实验日期。将培养瓶移入 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱, 静置培养。

10. 逐日观察细胞的生长状态。待细胞铺满瓶底 80% 以上, 可再次进行传代培养。

(二) 悬浮生长细胞传代

1. 将待传代的 HL-60 细胞置于倒置相差显微镜下, 观察细胞的生长状态。

2. 将细胞悬液移入 10mL 离心管, 以 1000r/min 速度离心 5min, 弃上清液, 向沉淀中加入 6mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 反复吹打, 重悬细胞。

3. 用血细胞计数板进行细胞计数。将细胞接种于 25mL 培养瓶中, 每瓶加入细胞悬液 3mL。在培养瓶上标注组织来源、实验者姓名和实验日期。将培养瓶移入 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱, 静置培养。

4. 逐日观察细胞的生长状态。待细胞生长到一定密度, 可再次进行传代培养。

五、实验结果

贴壁型细胞传代后 2~8h 内开始贴壁, 24h 后有活性的细胞均已贴壁, 培养液中可见少量漂浮的细胞或碎片, 可通过换液去除。

六、注意事项

1. 传代培养过程中所使用的培养基、溶液、吸管、离心管等要经过高压灭菌或过滤除菌后方可使用。

2. 实验前将实验用培养基、胰蛋白酶液、PBS 等置于 37℃ 水浴中加温, 然后使用。

3. 胰蛋白酶消化细胞时, 应密切关注消化的程度, 消化过头会损伤细胞, 消化不足则难以将细胞吹打下来。

4. 吹打细胞时, 应避免产生过多气泡, 尤其不能让气泡溢出瓶口, 以免细胞被污染。

七、思考题

1. 观察并记录贴壁型细胞和悬浮生长细胞传代后的形态特征和生长阶段。

2. 在消化贴壁型细胞之前为什么要用平衡盐溶液洗涤细胞, 然后加入胰蛋白酶?

实验三 培养细胞生长曲线测定

一、实验目的

1. 掌握培养细胞生长曲线的绘制方法。
2. 掌握细胞计数的方法。

二、实验原理

培养细胞的生长曲线可计数细胞增长的绝对数值,常用来检测各种药物、培养液的成分和血清等对细胞生长的影响。

生长曲线是细胞生长量与生长时间的参数。细胞传代后,用每隔一定时间的活细胞数对培养时间作图,得到生长曲线。从生长曲线可以直观了解细胞生长状态,从生长曲线可以得知细胞传代后经历的潜伏期时间、细胞群体倍增时间以及对数生长期之后细胞数量不再增加的平台期等培养细胞生长的重要信息。

三、实验材料

1. 动物细胞 HL-60 细胞。
2. 实验试剂
 - (1) DMEM 培养基。
 - (2) 小牛血清。
 - (3) 双抗溶液。
3. 实验器材 超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂培养箱、水浴锅、离心机、移液器及枪头、细胞培养板、直吸管、离心管、血细胞计数板、盖玻片、酒精灯、75%乙醇棉球、记号笔等。

四、实验方法与步骤

1. 调整细胞浓度、接种 取生长状态良好的 HL-60 细胞,用血细胞计数板计数后,调整细胞浓度为 $(1\sim5)\times 10^4/\text{mL}$,按照每孔 1mL 的接种量,加入 2 块 24 孔培养板中。轻轻摇匀,置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。
2. 连续测定细胞数量 每隔 24h 取 3 孔细胞,分别进行细胞计数,计算细胞浓度的平均值(每毫升体积中的细胞个数)。连续检测 7~10 天,直到细胞浓度比前一天降低为止。
3. 血细胞板细胞计数法 将盖玻片盖在血细胞板上,吸取少量待测细胞悬液,从盖玻片边缘滴入,使细胞悬液刚好渗入并铺满整个盖玻片。在低倍镜下观察并统计细胞板四角的 4 个大方格内的细胞数,每个大方格由 16 个中方格组成。计数过程中,对大方格边缘处压线的细胞按照数上不数下和数左不数右的原则统计。计数后,细胞浓度按照下列公式计算:

$$\text{细胞浓度 (每毫升体积中的细胞个数)} = \frac{4 \text{ 个大方格内细胞数}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

4. 绘制生长曲线 根据每天测定的数据,以培养时间为横坐标,细胞浓度为纵坐标,在半对数坐标纸上绘制生长曲线(图 1-3)。

五、实验结果

实验结果见图 1-3。

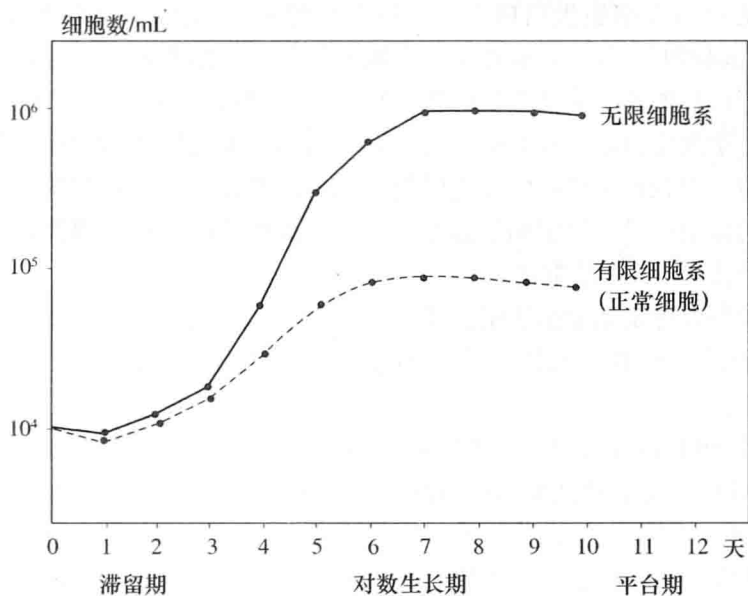


图 1-3 细胞生长曲线示意图 (引自: 司徒镇强, 吴军正. 2004. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版 (西安) 公司, 3: 242.)

六、注意事项

1. 应使用对数生长期的细胞进行实验。
2. 细胞悬液要吹打充分, 稀释要准确。每孔细胞接种的数量要一致。
3. 细胞接种的量不宜过多或过少, 一般以 7~10 天长满而不发生生长抑制为宜。
4. 每天计数细胞应在相同的时间进行, 以减少实验误差。
5. 用贴壁型细胞进行此项实验, 需要用胰蛋白酶消化细胞, 其余步骤均相同。
6. 由于计数的误差和实验操作过程中丢失细胞等因素影响, 本实验可能会有 20%~30% 的误差。为减少误差, 应了解细胞的生长情况。

七、思考题

1. 根据所绘制的生长曲线分析所测细胞生长各时期的特点。
2. 接种时细胞的密度会对生长曲线的测定产生什么影响?

实验四 培养细胞的活力测定

一、实验目的

1. 掌握台盼蓝拒染法测定细胞活力的方法。
2. 掌握 MTT 法检测细胞活力的原理与方法。

二、实验原理

细胞活性可以从活细胞数量、细胞形态、细胞生长情况及其代谢指标活性来评价。反映活细胞数量的指标可以通过每孔细胞蛋白质含量、每孔细胞 DNA 含量、活细胞计数、结晶紫试验、中性红试验、MTT 试验和 WST-1 试验检测；反映细胞膜完整性和通透性的指标有染料拒染率和乳酸脱氢酶漏出率等；反映亚细胞器损伤的指标可以通过中性红试验、MTT 试验和 WST-1 试验检测；反映细胞形态学改变的指标有细胞形态变化、细胞核和细胞质的改变、细胞空泡积累、脂质小滴、细胞膜膨出、细胞核染色质的变化以及细胞器的变化、细胞贴壁的改变等。细胞活性检测实验是细胞培养的常用技术。测定细胞活性可用来评价培养体系和检测药物或毒物对细胞的作用，其中台盼蓝拒染法和 MTT 法常用。

染料拒染法实验的原理是活细胞能阻止某些染料穿过细胞膜，而染料能进入损伤或死亡的细胞，因此可依据细胞被染料着色的情况来判断细胞的活性。常用染料有台盼蓝、伊红 Y、苯胺黑等。

四嗪唑蓝 (methylthiazoletrazolium, MTT) 是黄色粉末，可溶于生理盐水或 PBS，在一定浓度下，细胞可摄取 MTT，细胞中线粒体脱氢酶（主要是琥珀酸脱氢酶）能将 MTT 还原为蓝紫色甲瓚 (formazan) 颗粒，颗粒产生的量与活细胞数成正比。该颗粒在培养液中不溶解，可用二甲亚砜 (DMSO) 溶解后，进行比色定量比较。用不同浓度药物或毒物试验组的吸光度值与对照组相比得到的百分率作为各试验组的细胞存活率。通过设置一系列药物或毒物浓度得到的细胞存活率可以计算药物或毒物的 IC_{50} ，比较 IC_{50} 可判断细胞对不同药物或毒物的敏感性。

三、实验材料

1. 动物细胞 HeLa 细胞、HL-60 细胞。

2. 实验试剂

(1) DMEM 培养基。

(2) 0.4% 台盼蓝染液 (用 PBS 配制)。

(3) PBS 溶液。

(4) 2mg/mL MTT (用 PBS 配制)。

(5) DMSO。

3. 实验器材 超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂ 培养箱、酶联免疫检测仪、水浴锅、离心机 (细胞培养板离心)、EP 管、移液器及枪头、细胞培养板、吸管、血细胞计数板、盖玻片、酒精灯、75% 乙醇棉球等。

四、实验方法与步骤

(一) 台盼蓝拒染法

1. 将待测细胞制成单细胞悬液，取 50 μ L 细胞悬液和 50 μ L 0.4% 台盼蓝染液加入 1mL 的 EP 管中，混匀。

2. 在 3min 内，用血细胞计数板计数活细胞数和死细胞数，活细胞对染料拒染，而死细胞被染成淡蓝色。

3. 计算细胞存活率和细胞死亡率 (蓝染率)：

$$\text{细胞成活率}(\%) = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{细胞死亡率}(\%) = \frac{\text{死细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

(二) MTT 法

1. 将待测细胞制成单细胞悬液，调节细胞浓度至 $(5 \sim 10) \times 10^5/\text{mL}$ ，用移液器吸取细胞悬液接种至 96 孔板，分别接种 $0\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}$ 、 $40\mu\text{L}$ 、 $80\mu\text{L}$ ，每孔补充培养液至 $100\mu\text{L}$ 体积，每种细胞浓度均设置 2 个复孔。
2. 置于 37°C 、 5% CO_2 培养箱培养过夜（如果是悬浮细胞此步骤可以省略）。
3. 弃去培养板中培养液，每孔加入 $2\text{mg}/\text{mL}$ MTT $50\mu\text{L}$ ，轻轻摇匀，置于 37°C 、 5% CO_2 培养箱孵育 $2 \sim 3\text{h}$ 。
4. 弃上清液，加入 PBS 离心洗涤 1 次。
5. 每孔加入 DMSO $200\mu\text{L}$ ，室温放置，不时轻轻晃动培养板，等待甲瓚颗粒完全溶解。
6. 以无细胞孔为调零孔，在酶联免疫检测仪上测定波长 490nm 处的吸光度值 (OD_{490} 值)。

五、实验结果

由于各孔细胞的数量成倍增加，测定的 OD_{490} 值应相应增加。若用药物处理，则用药物组与对照组的吸光度值相比得出的百分率作为药物组细胞的存活率。细胞存活率越高，细胞毒性越小。

六、注意事项

1. 接种细胞时应留出空白孔，空白孔除了没有细胞外，其他处理与有细胞孔一致。空白孔作为酶标仪测定吸光度值时的调零孔。
2. 为减少误差，细胞悬液要均匀，细胞计数要准确。
3. 洗涤细胞过程中要防止损失甲瓚颗粒。

七、思考题

1. 除了台盼蓝染液外，还有哪些常用的染料可用于细胞活性检测？
2. 初步设计抗白血病药物三尖杉酯碱处理 HL-60 细胞后进行 MTT 法测定细胞活力的实验分组方案。

实验五 培养细胞的冻存与复苏

一、实验目的

1. 掌握培养细胞超低温冻存的原理与方法。
2. 掌握冻存细胞复苏的原理与方法。

二、实验原理

细胞冻存指将细胞悬混于冻存液中，常于 -196°C 的液氮中超低温保存。细胞冻存可以降

低细胞的代谢水平,保持细胞性质的相对稳定,延长细胞活性。许多细胞能在 -80°C 保存数月,在 -196°C 的液氮中长期保存。冻存液含有冻存保护剂甘油或二甲亚砜(DMSO),二者溶解度大,相对分子质量较小,容易透过细胞膜,加大膜对水的通透性,使冰点下降,在冷冻降温的过程中,有利于细胞内的水渗出,从而减少细胞内冰晶的形成,保护细胞。“缓慢冷冻快速融化”是冻存和复苏的基本原则,目的在于减少细胞内大量形成冰晶,破坏细胞结构,造成细胞死亡。

为保持细胞的存活率,常规超低温冻存一般采用降温的方法,标准冷冻速度为 $-2\sim-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$,当温度将至 -25°C 后,降温速度可增至 $-10\sim-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$,达到 -100°C 时可迅速浸入液氮中。可以使用程序降温仪严格设置冷冻程序。

细胞复苏指按照一定的复温速度将冻存的细胞恢复到常温,同时保证细胞的形态结构保持正常,代谢反应恢复正常。复苏时要求快速融化,防止细胞内再次形成冰晶。

三、实验材料

1. 动物细胞 HeLa 细胞、HL-60 细胞。
2. 实验试剂
 - (1) DMEM 培养基(含 10%小牛血清)。
 - (2) 冻存液:90%上述培养基加入 10%甘油或 DMSO。
 - (3) 0.25%胰蛋白酶消化液。
 - (4) 0.4%台盼蓝染液(用 PBS 配制)。
3. 实验器材 超净工作台、倒置相差显微镜、 CO_2 培养箱、水浴锅、离心机、冰箱、冻存管、冻存盒、移液器及枪头、吸管、血细胞计数板、盖玻片、酒精灯、75%乙醇棉球等。

四、实验方法与步骤

(一) 超低温冻存

1. 选择指数生长期的细胞,在冻存的前一天换液。
2. 贴壁细胞按照常规方法消化,如 HeLa 细胞,用 0.25%胰蛋白酶液消化,制成单细胞悬液。
3. 用血细胞板进行细胞计数。
4. 以 $1000\text{r}/\text{min}$ 速度离心 5min 收集细胞。
5. 弃上清液,用冻存液重悬沉淀细胞,调整细胞浓度为 $(5\sim 10)\times 10^6/\text{mL}$ 。
6. 分装细胞悬液于冻存管中,拧紧管盖,注明细胞名称和冻存日期,放入冻存盒中。
7. 将冻存盒在 4°C 条件下放置 30min 后放入 -80°C 冰箱过夜,然后转入液氮罐中保存。

(二) 细胞的复苏

1. 用镊子从液氮罐中小心取出冻存管。
2. 投入预热的 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 水中,快速摇动冻存管,使其在 1min 内完全融化。
3. 用 75%乙醇棉球擦拭冻存管壁。
4. 在超净工作台上用吸管吸取冻存管中的细胞,加入 10mL 离心管中,缓慢加入 9mL 细胞培养液稀释后,以 $1000\text{r}/\text{min}$ 速度离心 5min。
5. 弃上清液,用细胞培养液重悬沉淀细胞,以 $1000\text{r}/\text{min}$ 速度离心 5min。
6. 弃上清液,用细胞培养液重悬沉淀细胞,用血细胞板进行细胞计数,并用 0.4%台盼蓝染液进行拒染试验,计算细胞成活率(%)。

7. 将细胞悬液接种到细胞培养瓶中，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。
8. 待细胞贴壁后，在 24h 之内轻轻倒掉培养基，更换细胞培养液继续培养。

五、实验结果

各种冻存细胞复苏的存活率不同，一般可达到 90% 以上。

六、注意事项

1. 用于冻存的细胞应该具有较高的细胞活力，常选用指数生长期的细胞。
2. 在细胞冻存时，要防止液氮飞溅和冻伤，应佩戴护目镜和厚手套。
3. 要记录冻存管放入液氮罐中冻存架的位置和时间，便于需要复苏时查找。
4. 复苏时，融化冻存管的热水不能盛放在玻璃器皿中，防止冻存管壁带出液氮引起玻璃炸裂。
5. 注意观察液氮罐的液面，及时添加液氮，维持冻存的超低温环境。

七、思考题

1. 细胞冻存和复苏时为什么要遵循“缓慢冷冻快速融化”的原则？
2. 复苏的细胞贴壁后就要更换培养液，为什么不能等到细胞长满瓶底后再换？