

# 细胞工程实验

The Experiments for Cell Engineering

李志勇 主编



高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS

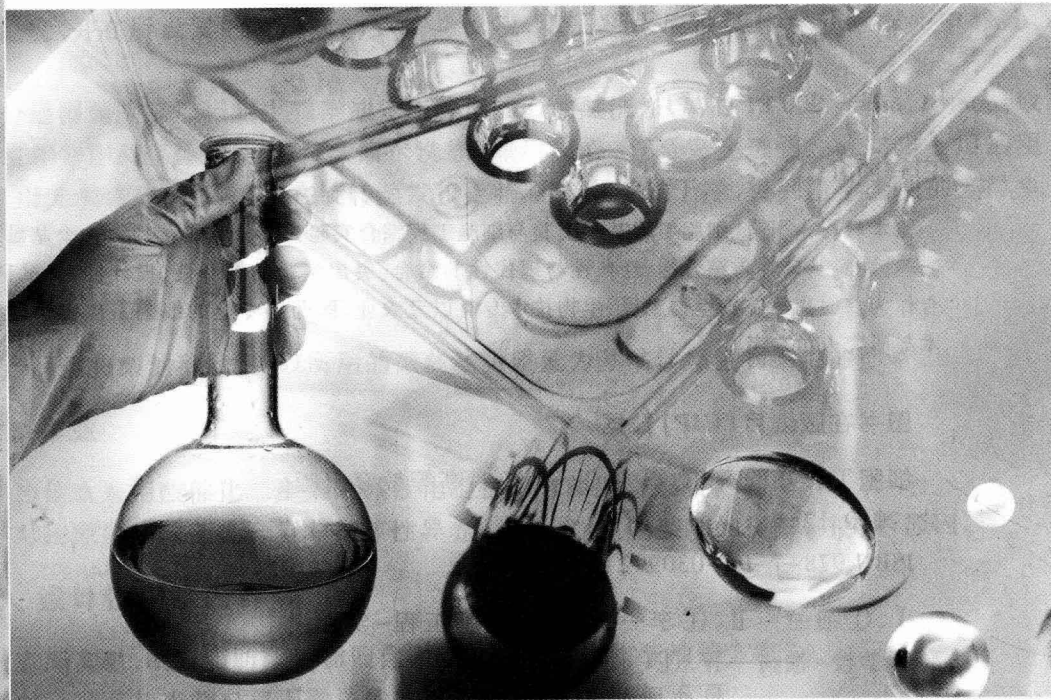


# 细胞工程实验

Cell Engineering Experiments

主编 张三

中国轻工业出版社



# 细胞工程实验

Xibao Gongcheng Shiyan

李志勇 主编



高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

## 内容简介

本教材由引言、细胞工程基础实验与细胞工程综合实验 3 部分组成,包括 14 个基础实验和 10 个综合实验,注意基础性与综合性、经典性与现代性的结合,突出实验的综合性、设计性,尝试科研反哺教学。适合作为普通高等院校生物工程、生物技术专业以及农业、医药等专业的细胞工程实验教材,也适合相关技术与研究人员参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

细胞工程实验/李志勇主编. —北京:高等教育出版社,2010.12

ISBN 978-7-04-030992-8

I. ①细… II. ①李… 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(2010)第 216830 号

策划编辑 王莉 责任编辑 孟丽 封面设计 张楠 责任绘图 尹文军  
版式设计 范晓红 责任校对 胡晓琪 责任印制 张泽业

---

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街 4 号  
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 三河市华润印刷有限公司

开 本 787×1092 1/16  
印 张 6.25  
字 数 150 000

购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598  
网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landracom.com>  
<http://www.landracom.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2010 年 12 月第 1 版  
印 次 2010 年 12 月第 1 次印刷  
定 价 12.00 元

---

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 30992-00

# 前言

如何培养创新型、高素质人才已经成为我国高等院校教学改革的重要内容。上海交通大学近期提出了知识传授、能力培养与素质养成“三位一体”的本科创新人才培养目标,为教学改革提出了新的任务和更高的要求。

实践教学是高等院校培养创新型、高素质人才的重要途径。细胞工程是一门以实验为基础的工程技术课程,细胞工程实验是细胞工程课程重要的组成部分,是知识、能力、素质“三位一体”的生物工程与生物技术专业人才培养的重要环节。

传统的实验课程或教材多以验证性实验为主,已经远远不能满足创新型人才培养的需要。综合性、设计性、探索性代表了生物工程实验教学的重要发展方向,然而,国内能反映这种趋势的实验教材还非常缺乏。《细胞工程实验》试图在学生能力培养上有所贡献,在实验的选择与设计上突出“研究型”教学的尝试与改革,强化锻炼学生主动学习、积极思考、自己动手解决问题与分析问题的能力。本实验教材具有以下5个特点:

(1) 注意基础性与综合性的结合,由浅入深,安排了14个基础实验和10个综合实验。

(2) 在注重经典性基础上突出现代性,既有细胞工程经典的实验,又编写了次级代谢产物、植物转基因、动物细胞生物制药、干细胞等现代性和前沿性的实验。

(3) 突出实验的综合性、设计性与探索性,在基础实验和综合实验中安排了设计性实验内容,同时在教学建议中提出一些探索性实验内容供参考。

(4) 科研反哺教学,结合编写人员的科研成果设计了高质量的综合实验。同时,根据一些同行发表的科研论文编写了具有特色的实验。

(5) 具有较广泛的适用性,除个别实验外,多采用简单易得的实验材料,每个实验附有学时与教学安排建议,方便各校根据自己的情况选择实验内容。

参加本书编写的均是上海交大学生命科学技术学院教学、科研第一线的教师与“细胞工程”国家级精品课程教学团队骨干。实验一、二由秦敏君编写;实验十一、实验十八、十九由马伟编写;实验二十二由郭光明编写;实验十四、二十一由闫晓梅编写;实验十五、十六、十七由钟建江编写;其余13个实验由李志勇编写。全书由李志勇统稿。

本书的编写是探索培养学生实践能力、创新能力的一种尝试。由于综合性、设计性实验编写缺乏经验,科研转化的实验也不一定成熟,因此错误与不妥之处敬请批评指正,以便再版修订。

李志勇  
于上海交通大学  
2010年6月

# 目录

## 第一篇 引言

第一章 实验室组成与无菌操作 .....	3
----------------------	---

## 第二篇 细胞工程基础实验

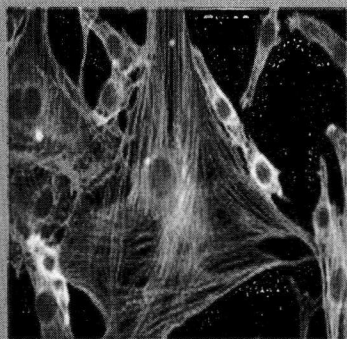
第二章 细胞观察、保存与细胞器分离 .....	9
实验一 细胞计数与死活细胞鉴别 .....	9
实验二 细胞冷冻与复苏 .....	11
实验三 细胞器分离与鉴定 .....	14
第三章 细胞融合 .....	20
实验四 植物原生质体分离与培养 .....	20
实验五 PEG 诱导植物体细胞杂交 .....	24
实验六 电融合诱导法促进动物细胞融合 .....	28
第四章 植物组织培养 .....	32
实验七 植物组织培养人工繁殖 .....	32
实验八 植物茎尖培养与人工种子制备 .....	34
第五章 植物单倍体与多倍体培养 .....	37
实验九 植物花药培养 .....	37
实验十 植物多倍体人工诱导 .....	39
第六章 植物细胞培养 .....	41
实验十一 拟南芥悬浮细胞培养与冷冻保存 .....	41
第七章 动物细胞培养 .....	44
实验十二 表皮角质细胞原代培养 .....	44
实验十三 表皮角质细胞传代培养 .....	47
实验十四 中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达制备乙肝表面抗原 S 蛋白 .....	49

## 第三篇 细胞工程综合实验

第八章 植物细胞工程综合实验 .....	55
实验十五 红豆杉细胞培养及次级代谢产物生产 .....	55
实验十六 植物细胞应激过程中有关酶活力变化 .....	59
实验十七 灵芝菌丝体培养制备灵芝酸 .....	62
实验十八 基于发根农杆菌的大豆转基因研究 .....	64

实验十九 根癌农杆菌介导的拟南芥花序浸润原位转基因 .....	69
<b>第九章 动物细胞工程综合实验 .....</b>	<b>73</b>
实验二十 抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备 .....	73
实验二十一 脂质体介导绿色荧光蛋白基因在 293T 细胞中的表达 .....	77
实验二十二 小鼠骨髓间质干细胞分离培养与鉴定 .....	81
<b>第十章 微藻细胞工程综合实验 .....</b>	<b>85</b>
实验二十三 螺旋藻气升式光生物反应器培养生产单细胞蛋白 .....	85
实验二十四 原始小球藻兼性异养培养生产生物柴油 .....	91

# 第一篇 引言







# 第一章 实验室组成与无菌操作

细胞工程实验必须在符合一定条件的实验室并严格无菌的环境下进行,本章简单介绍细胞工程实验室基本组成与无菌操作技术。

## 一、实验室基本组成

细胞工程实验室一般由准备室、无菌操作间、培养室、分析室等几部分组成,要求工作环境和条件必须保证无微生物污染、环境清洁。

### (一) 准备室

主要用于原材料处理、实验用品的洗涤、干燥、消毒以及溶液配制等。一般包括洗涤灭菌室,主要设备有:药品柜、器械柜、冰箱、微波炉、电磁炉、烘箱、蒸馏水或纯水系统、天平、pH计、加热设备及酸缸、玻璃仪器等。

### (二) 无菌操作间

主要用于材料的消毒、灭菌、接种、培养物培养与转移等,要密封、防尘、防菌。理想的无菌间应该包括更衣间、缓冲间和操作间3部分,缓冲间处于更衣间和操作间之间。操作间要大小合适,没有死角,便于清洗和消毒。主要设备有:紫外光源、超净工作台、消毒器、酒精灯、接种器械(镊子、剪刀、解剖刀、接种针)、灭菌锅、过滤除菌器等。

### (三) 培养室

用于组织或细胞培养。

对于植物组织或细胞培养,主要设备有:空调机、除湿机、换气扇、灯光、培养架(控温、控光、控湿)、光照培养箱、人工气候箱、摇床、培养箱、紫外光源、超净工作台等。

大多数植物组织培养温度为 $23 \sim 32^{\circ}\text{C}$ ,一般 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度保持在 $70\% \sim 80\%$ 。控制光照时间可安装定时开关钟。

对于动物细胞或组织器官培养,主要设备有: $\text{CO}_2$ 培养箱、转瓶或转管培养系统、超净工作台、培养器皿。

### (四) 分析室

用于对培养物的观察分析与培养物的计数等。主要设备有:普通光学显微镜、倒置显微镜、酶标仪、流式细胞仪、离心机、计算机及打印机等设备。

## 二、细胞培养的主要设备

主要包括水处理设备、无菌设备、培养设备、细胞观察分析设备、细胞分离与保存设备等。

### (一) 水处理设备

主要包括蒸馏水发生器、超纯水系统。

## (二) 无菌设备

主要有超净工作台、过滤除菌器、高压灭菌锅等。细胞分离接种等无菌操作需要在超净工作台上完成,超净工作台分为侧流式、直流式和外流式3大类。工作原理是利用鼓风机驱动空气通过高效过滤器除去空气中的尘埃颗粒,使空气得到净化。净化空气徐徐通过工作台面,结合紫外线杀菌使工作台内达到无菌条件。过滤除菌器有金属滤器、微孔滤膜器、玻璃漏斗式滤器等,依靠过滤除去颗粒或微生物污染。高压灭菌锅又名高压蒸汽灭菌锅,可分为手提式灭菌锅和立式高压灭菌锅。利用电热丝加热水产生蒸汽,并能维持一定压力的装置,主要有一个可以密封的桶体、压力表、排气阀、安全阀、电热丝等组成。

## (三) 植物细胞培养设备

主要包括光照培养箱、光照控温摇床等,为细胞生长提供稳定的温度、适当的湿度与光照等条件。植物组织培养需要设计人工气候室,精确控制温度、湿度、光照以及CO<sub>2</sub>等条件。

## (四) 动物细胞培养设备

主要有CO<sub>2</sub>培养箱,可以使培养条件维持在37℃、5%CO<sub>2</sub>等恒定条件,满足动物细胞生长需要。使用CO<sub>2</sub>培养箱培养细胞时应注意:①用螺旋口瓶培养细胞时,须将瓶盖微松,以保证通气;②保持培养箱内空气干净,定期消毒(90℃,14h);③保持箱内湿度,避免培养液蒸发。

## (五) 细胞分离与保存设备

细胞分离设备主要有离心机,包括高速、低速和常温、冷冻离心机。试剂保存设备主要用普通冰箱,细胞保存采用-80℃超低温冰箱或液氮罐。

## (六) 细胞观察分析设备

细胞观察分析主要采用显微镜,包括普通光学显微镜、倒置显微镜、扫描电子显微镜和透射电子显微镜。后两者用于细胞形态与结构的精细表征。

## (七) 其他设备

其他设备还包括流式细胞仪、显微操作系统、细胞融合仪等。

## 三、无菌操作

无菌操作(aseptic technique)是防止微生物污染的技术。

在培养过程中,细胞对有害物质非常敏感。微生物、细胞残留物及非营养成分的化学物质均可能影响细胞的生长。因此,对新使用和重复使用的培养器皿都要严格彻底地清洗。

细胞培养的最大危险是发生细菌、真菌和病毒等微生物的污染,污染的主要原因包括操作间或周围空间的不洁、培养器皿和培养液消毒不彻底。细胞培养的每个环节都应严格进行无菌操作,防止污染。

### (一) 消毒方法

分为3类:物理灭菌法、化学灭菌法和抗生素法。

#### 1. 物理灭菌法

(1) 紫外线消毒:用于空气、操作台表面和不能使用其他方法进行消毒的培养器皿的消毒,可以消灭空气中大部分细菌,培养室的紫外线灯应距地面不超过2.5m,消毒时物品不宜相互遮挡。紫外线可产生臭氧,污染空气,对人皮肤也有伤害,实验操作时要注意安全。

(2) 湿热消毒:即高压蒸汽消毒,是一种使用最广泛、高效的消毒方法,主要用于培养液、培养器皿等的灭菌。高压蒸汽消毒器中消毒物品不能装得过满,以防止消毒器内气体阻塞而发生危险。在加热升压之前,先要打开排气阀门排放消毒器内的冷空气,冷空气排出后,关闭排气阀门。需要经常检验安全阀活动是否自如。消毒过程中,操作者不能离开工作岗位。

(3) 过滤除菌:主要用于气体的除菌。对于不能耐受高温的培养用液、血清、酶液等也采用过滤除菌法。

## 2. 化学灭菌法

最常用的是 70% 乙醇,主要用于操作者的皮肤、操作台表面及无菌室内的壁面处理。

## 3. 抗生素法

在细胞培养时,在培养基中添加青霉素、链霉素、卡那霉素、制霉菌素等抗生素抑制细菌、真菌等污染。青霉素能抑制细菌细胞壁的合成,链霉素能抑制细菌蛋白质的合成,卡那霉素也能抑制细菌蛋白质合成,制霉菌素能干扰霉菌细胞质膜的合成。

## (二) 污染检测与控制

### 1. 细菌

细菌(bacteria)是一类形状细短,结构简单,多以二分裂方式进行繁殖的原核生物,主要由细胞壁、细胞膜、细胞质、核质体等部分构成,有的细菌还有荚膜、鞭毛、菌毛等特殊结构。细胞直径为 0.5 ~ 1.0  $\mu\text{m}$ ,长度多为 0.5 ~ 5  $\mu\text{m}$ 。可根据形状分为 3 类:球菌、杆菌和螺旋菌(包括弧形菌)。

细胞培养常见的污染细菌有枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、假单胞菌、白色葡萄球菌等。细菌污染初期不易发现,培养液颜色变黄,出现浑浊。倒置显微镜下观察可以看见有大量圆球状颗粒漂浮。采用普通肉汤培养基培养也可以检测有无细菌污染。采用青霉素、链霉素可以预防细菌污染。

### 2. 真菌

真菌(fungi)是具有真核和细胞壁的异养生物。其营养体除少数低等类型为单细胞外,大多是由纤细管状菌丝构成的菌丝体。多数真菌的细胞壁中最具特征性的是含有几丁质,其次是纤维素。常见的真菌细胞器有细胞核、线粒体、微体、核糖体、液泡、溶酶体、泡囊、内质网、微管、鞭毛等;常见的内含物有肝糖、晶体、脂体等。真菌通常分为 3 类,即酵母菌、霉菌和蕈菌(大型真菌),它们归属于不同的亚门。

常见的污染真菌有白色念珠菌、烟曲霉、黑曲霉、毛霉菌、孢子霉、酵母菌等。污染发生时可以看见呈白色或浅黄色小点漂浮于培养液表面,细胞生长变慢,培养液一般不发生浑浊。倒置显微镜下可见细胞间有纵横交错的丝状、管状或树枝状菌丝。采用抗真菌剂可防治真菌污染。

### 3. 支原体

支原体(mycoplasma)是介于细菌和病毒之间能独立生存的、结构上更简单的一种原核生物。比细菌还要小(直径 0.1 ~ 0.3  $\mu\text{m}$ )。遗传物质(DNA)存在于无膜分隔的核状区,或是双螺旋,或是环形分子。遗传物质的量只有细菌的 1/10。支原体有细胞膜而无细胞壁,会引起动物或人的呼吸系统疾病。

支原体在细胞培养中是一种常见的污染源,会造成培养物异常或衰亡。污染具有隐蔽

性,普通光学显微镜不能直接观察到支原体。检查支原体污染要用电子显微镜观察、荧光法或免疫法测定。支原体可通过滤器,因此过滤除菌法不能去除。支原体污染时多吸附于细胞表面或分散于细胞之间,培养液不发生浑浊,细胞生长变慢,部分细胞变圆,从瓶壁脱落。但是多数细胞无明显变化,因此非常难发现。

支原体污染检测有相差显微镜观察、电镜检测、荧光染色观察、培养观察等方法。

(1) 电镜下支原体有三层结构,无细胞壁,中央有电子密度大的密集颗粒或丝状的中心囊。

(2) 相差显微镜观察,呈暗色微小颗粒,多位于细胞与细胞之间。

(3) 用荧光染料 Hoechst 33258 可以使支原体 DNA 着色,然后用荧光显微镜观察。

(4) 采用支原体肉汤培养基培养观察有无雾状沉淀,然后再用琼脂培养基分离培养观察有无“荷包蛋”菌落出现。

支原体对青霉素有抗药性,支原体污染是动物细胞培养重点防治对象。污染的消除可以采用抗生素、加温处理、使用支原体特异性血清等方法。抗生素一般采用双抗生素(例如青霉素与链霉素)。4-氟-2-羟基喹啉、戴耳素衍生物、四环素衍生物等单用或者合用对防治支原体污染比较有效。支原体耐热性差,可以采用 41℃ 高温杀灭支原体,但是也要注意防止细胞受到伤害。

#### 4. 病毒

病毒(virus)是一类个体微小、无完整细胞结构、含单一核酸(DNA 或 RNA)型、必须在活细胞内寄生并复制的非细胞型微生物。病毒能增殖、遗传,具有生命最基本的特征。其主要特点是:① 含有单一核酸(DNA 或 RNA)的基因组和蛋白质外壳,没有细胞结构;② 在感染细胞的同时或稍后释放其核酸,然后以核酸复制的方式增殖,而不是以二分裂方式增殖;③ 严格的细胞内寄生性。

病毒大小以 nm 计,可以通过滤器。病毒污染检测有细胞观察、电子显微镜、免疫学及 PCR 等方法。要特别注意培养液等过滤除菌不完全、空气等途径引起的病毒污染。病毒污染是动物细胞大量培养生产疫苗、干扰素等生物制品时需要特别注意的。

#### 5. 细胞交叉污染

多种细胞同时培养时,所用器皿或液体等容易引起细胞交叉污染。常用细胞形态观察、检查细胞标志物等方法检测。

在进行多细胞培养时,器皿应该严格区分,在换液和传代时务必防止因细胞带出而污染其他试剂或操作环境。细胞要冻存保种,复苏使用。

## 第二篇 细胞工程基础实验





## 第二章 细胞观察、保存与细胞器分离

本章选择了3个基础的细胞工程技术实验,包括细胞计数与死活细胞鉴别、细胞冷冻与复苏、细胞器分离与鉴定,学习和了解相关技术方法。

### 实验一 细胞计数与死活细胞鉴别

#### 一、实验目的

1. 掌握基本的细胞计数方法。
2. 学习和掌握死活细胞鉴别的原理及方法。

#### 二、实验原理

细胞计数法和细胞活性鉴别是细胞培养的基本技术。细胞计数可以了解细胞生长状态,绘制生长曲线。在动物细胞原代和传代培养、细胞冷冻和复苏等众多技术中需要进行细胞计数;植物细胞进行悬浮培养也需要测定细胞数目。操作时吸取一定量的细胞悬液,计算细胞浓度。在细胞计数时,如细胞浓度太高,可进行必要的稀释。常用血球计数板进行计数(附录2.1)。

死活细胞鉴别是了解不同药物、生化物质处理效果的手段。在细胞冻存和复苏过程中,由于细胞遭受非生理性的低温打击等,引起部分细胞活力下降或死亡。通过细胞活性检查可快速检验细胞冷冻效果,是衡量细胞冻存、复苏效果的一种简便易行的方法。

有多种方法可以鉴别细胞的死活,最常用的是染色排除法和荧光排除法。

##### (一) 染色排除法

许多酸性染料不容易穿过活细胞的质膜而进入胞内,但当细胞损伤或死亡时,这些染料可以穿透变性的细胞膜,使其着色,因此可以此来鉴别死活细胞。常用的染料有台盼蓝、碘-碘化钾、TTC、伊红Y和苯胺黑等。台盼蓝(trypan blue,又称锥虫蓝)是检测细胞膜完整性最常用的生物染色试剂。死亡的细胞,膜的完整性丧失,通透性增加,细胞可被台盼蓝染成蓝色,而活细胞不被染色。依据此原理,细胞经台盼蓝染色后,死细胞染成蓝色,活细胞不着色,可实现对细胞存活率比较精确的定量分析。

##### (二) 荧光排除法

由于活细胞内有较强的酯酶活性,可将荧光素二氯二丙酸酯中的荧光素分解出来,从而使细胞发出强烈的黄绿色荧光,而死亡细胞由于酯酶活性丧失,不能分解二丙酸酯荧光素,则完全没有荧光。据此便可区别死活细胞。



### 三、实验材料

#### (一) 原料

不同培养时间的植物细胞培养液悬液。

#### (二) 试剂

1. 0.4% 台盼蓝溶液:以生理盐水配制。

2. 荧光素二氯二丙酸酯染液:取荧光素二氯二丙酸酯 10 mg 溶于 5 ml 丙酮中,将此溶液逐滴加入 5 ml 生理盐水直到出现永久性乳白色沉淀为止。

3. PBS 液:在 800 ml 蒸馏水中溶解 8 g NaCl,0.2 g KCl,1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,加水定容至 1 L。

#### (三) 仪器、材料

普通光学显微镜,载玻片,盖玻片,血球计数板,滴管,试管,荧光显微镜,离心机。

### 四、实验步骤

1. 取 0.5 ml 细胞悬液放入干净试管中,加入 1~2 滴 0.4% 台盼蓝溶液,混合,2 min 后立即用吸管吸取悬液,滴加到血球计数板上,用普通光学显微镜 10 倍镜观察计数。凡折光性强而不着色者为活细胞,染上蓝色者为死细胞。计数 1 000 以上细胞,计算出活细胞在总细胞中的比率。

2. 将荧光素二氯二丙酸酯染液数滴直接加入细胞悬液中,5 min 后离心 1 000 r/min 收集细胞。再用 PBS 洗涤 2 次,离心后可用 PBS 悬浮细胞,制片,加盖玻片镜检。

### 五、实验结果

比较不同培养阶段细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{细胞总数} - \text{死细胞数}) / \text{细胞总数} \times 100\%$$

### 六、作业

讨论细胞存活率在研究中的意义。

### 七、设计性实验内容

对比分析生长对数期、衰亡期的细胞存活率比例,并分析原因。

### 八、学时和教学安排建议

1 学时。

建议结合实验十一、十二、十三、十四进行。

#### 附录 2.1:血球计数板及其使用方法

血球计数板是一长方形厚玻片,放上盖玻片时计数板与其间距即计数室空间的高为 0.1 mm(图 2.1)。在低倍显微镜下可见计数室被双线划分成 9 个边长为 1 mm 的大方格。四角的大方格又各分为 16 个中方格。中央大方格被划分为 25 个中方格,每一中方格又划