



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞工程实验

The Experimental Guide for
Cell Engineering

张 铭 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



细胞工程实验

细胞工程实验

细胞工程实验

细胞工程实验





普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞工程实验

Xibao Gongcheng Shiyan

张 铭 主编



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

内容简介

全书分5章共39个实验,以动物细胞培养为基础,以单克隆抗体制备的技术体系为主要内容,包括骨髓瘤细胞培养、小鼠免疫、细胞融合、克隆筛选、抗体检测和细胞冻存等,以真核细胞转基因技术、小鼠胚胎干细胞培养和iPSC诱导技术、流式细胞仪分析技术和激光扫描共聚焦显微镜技术等为延伸,并包括植物细胞工程的主体技术。由于该类实验主要是以活细胞为操作对象,要求实验的连贯性,所以比较适合集中安排课时,各校在具体教学中也可根据自身情况酌情调整。

本实验教材为生物技术专业技能训练设计,提供了一个先进、实用、系统而又可供选择的实验体系;适用于生物类各本科专业细胞工程实验教学,也可用于生物相关专业的研究生实验技能训练以及生物专科学校的高级技能强化训练。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程实验指导/张铭主编. —北京:高等教育出版社,2010.8

ISBN 978-7-04-029979-3

I. ①细… II. ①张… III. ①细胞工程-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q813-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第121075号

策划编辑	王莉	责任编辑	张晓晶	特约编辑	卢琛	封面设计	张楠
责任绘图	尹莉	版式设计	范晓红	责任校对	刘莉	责任印制	陈伟光

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 北京市鑫霸印务有限公司

开 本 787×1092 1/16
印 张 7.75
字 数 180 000

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.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2010年8月第1版
印 次 2010年8月第1次印刷
定 价 13.00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 29979-00

引 言

本书是1998年浙江大学四校合并后生命科学学科建设和课程设置讨论的产物。当初辨析的重点是生物科学与生物技术专业的异同以及各自应具有的知识技能内涵。生命科学是一个庞大的知识体系,以前在生物学二级学科的基础上设立专业。随着分子和细胞技术快速发展,生命科学的学科发展出现了明显的趋同性,形成了可以独立于理论体系的技术体系,生物技术为理、工、农、医等许多学科所应用并作为生物高技术产业发展的支撑。顺应学科和产业的发展,教育部将原来12个生物类专业合并成为生物科学和生物技术两个专业,分别着重培养科学理论型人才和技术应用型人才。但这在具有长期历史沿革的一些高校之中产生了专业内涵难以把握的问题,甚至出现了有的学校只办生物科学专业,有的学校只办生物技术专业,而有的学校同时开办生物科学专业与生物技术专业。我们讨论的结果是努力办好两个专业:在原有理学生物学的基础上,生物科学专业偏向基础教育,着重于动物学、植物学、微生物学和生态学,强化动、植物野外实习、生态考察和治理;生物技术专业偏向应用,着重于生化与分子生物学、细胞生物学、遗传学、生理学,强化现代生物技术和技能的培养。生物技术专业课程设置在共同的生物学基础课程体系的基础上,突出技术、能力训练。利用暑假短学期的实践教学环节,我们设计了一个生物技能训练的课程体系,由基因工程、细胞工程、发酵工程、生物信息与数据处理4门课组成,每门课3个学分,集中上课,全部为实验课。该课程体系力求探索不从属于理论课程的实验技术体系,尽可能改变实验课以验证性实验为主的格局,使之成为以技术训练为主导,以创新发展为方向,让学生可以系统学习新的实用性技术,大幅度提高学生的技术、技能水平,逐渐形成生物技术专业的特色。

这4门技能课程的主要内容和目标是:(1)基因工程:完成一个基因的克隆、重组、表达及其产物提取、分析、检测的全部过程。(2)细胞工程:掌握细胞培养、免疫、融合、克隆、检测等单克隆抗体制备的关键技术。(3)发酵工程:以谷氨酸、啤酒、红曲为对象,系统地训练好氧发酵、厌氧发酵和固体发酵等工艺技术,做出产品。(4)生物信息与数据处理:以互联网为基础,介绍杂志、年评、国际会议等,以及数据库的种类、系统、特点和应用,学习生物实验设计和数据处理方法。4门课程互动,形成生物技术专业技能训练的课程体系,而细胞工程是该体系中的一门课程。

本书是在这样的总体定位中编写而成的。考虑到技术体系的完整性、先进性和实用性,全书选择了39个实验,分5章,以细胞培养为基础,以单克隆抗体技术为主体,以小鼠胚胎干细胞技术为延伸,包括植物组织和细胞培养以及转基因技术等。细胞工程以活细胞为操作对象,杂交瘤单克隆抗体制备过程又较长,如何在本门课程中完成技术学习和技能训练是一个具有挑战的命题。细胞工程是在杂交瘤单克隆抗体技术的基础上形成的,单克隆抗体制备的技术基础——细胞培养、细胞融合、分子免疫、分子检测等技术已经成熟,而且应该是生物技术专业的学生必须掌握的技能。同时,单克隆抗体技术在科学研究、蛋白质组学、临

床诊断、生物芯片、靶向药物以及亲和分离等领域有越来越广泛的应用。因此,系统进行杂交瘤单克隆抗体技术训练,对于现代生物技术专业学生的培养是必需的、迫切的,对于他们将来进行研究和产业服务很有价值。

各校根据各自的实际情况,分别可以有以下3种内容安排:(1)重点学习第1章“动物细胞培养技术”和第4章“植物组织与细胞培养技术”。(2)重点学习第2章“杂交瘤技术与单克隆抗体制备”和第5章“真核细胞转基因技术和检测技术”。(3)完成全部教材实验内容,包括第3章“小鼠胚胎干细胞体外培养和分化技术”。本教材安排第3章的内容,是因为胚胎干细胞体现了细胞工程的最新进展,有巨大的应用前景,而且胚胎干细胞技术是我国少数几个与国际差距较小、能形成优势特色的领域。估计在不远的将来,我国乃至国际干细胞研究将有一个巨大的发展。因此,在高校开展与之相关的课程具有深远的意义。在这部分内容中,我们增加了“诱导多潜能干细胞(iPSC)的制备”的内容,这对于提高性的训练或研究生的训练是有价值的。

开设细胞工程实验课程一般会遇到以下几个方面的困难:(1)活细胞的操作要求连续性。这与传统的课程安排会不相适应。但是随着教育改革的深化,课程设置越来越灵活,实验室开放、短学期制、连续性大实验等为开设细胞工程实验课创造了条件。(2)实验设备要求较多。但主要的超净台、CO₂培养箱等无菌设施,一般学校都已配备。科学技术已经发展到了活细胞加工的时代,对于细胞工程实验设备的投入相对于学生技能的提高来讲是物有所值的,因为现在越来越多用人单位需要熟悉细胞培养的人才。(3)实验消耗材料较贵。这个问题也是可以解决的:器皿可以反复使用;一只小鼠只花费几元钱,但可进行饲养、免疫、解剖、细胞分离、培养、融合、冻存、活力测定、生化提取和分子测定等许多实验;有些常用的试剂可以自己开发,开发过程又能很好地锻炼学生。根据我们多年的教学实践经验,细胞工程的实验教学费用是可以控制的。

多年的教学实践表明,细胞工程实验是同学们十分喜爱、收获良多、记忆深刻的实验课程。它的技术体系完整,技术先进实用,训练比较到位,活细胞的观察和操作比较生动,能激发学生的学习兴趣。虽然有的实验比较复杂,初学者容易失败,有一定的挑战性,但如果在训练过程中能够宽容失败,鼓励反复实践,把训练目标从做过提升到会做,就能使学生得到真正的提高,享受到现代生物技术的魅力。

本书是在使用多年的实验讲义的基础上编写的,由课程组的全体同仁通力合作完成,第1章由项黎新、苏中渊编写,第2章和第3章由张铭、张佳蓉编写,第4章由徐程、张铭编写,第5章由王勇、谭舟编写。编写过程中,姜祖韵、沈颖、吴涛、骆靖峰、周扬、纪慧娇、顾斌、俞宏和宋秀丽等做了大量工作。

我们要特别感谢高等教育出版社的王莉编辑,没有她的鼓励、帮助、督促,这本书的完成是不可能的。细胞工程实验是一个内涵丰富、技术比较复杂的体系,至今还没有一本专门的细胞工程实验教材,尽管我们已有一定的实践基础,难免还有许多不足和错误之处,权请同行、读者不吝指正。

张 铭

2010年4月

目 录

实验计划	1
第 1 章 动物细胞培养技术	3
1-1 动物细胞培养实验的器材准备	4
1-2 动物细胞培养用液的配制及过滤除菌	7
1-3 培养细胞的形态观察、大小测定和照相记录	10
1-4 动物细胞的传代培养	14
1-5 动物细胞的原代培养	17
1-6 培养细胞的分裂指数和生长曲线测定	21
1-7 培养细胞的活性测定	24
1-8 培养细胞的染色体标本制备与分带技术	27
1-9 培养细胞的超低温冻存与复苏	29
第 2 章 杂交瘤技术与单克隆抗体制备	33
2-1 抗原制备与小鼠免疫	34
2-2 饲养层细胞的制备	37
2-3 骨髓瘤细胞的制备	39
2-4 免疫脾细胞的制备	40
2-5 细胞融合和杂交瘤筛选	42
2-6 特异性单克隆抗体的检测	45
2-7 杂交瘤细胞的克隆化培养(有限稀释法)	47
2-8 单克隆抗体的制备与分离纯化	49
2-9 杂交瘤细胞的保存	51
第 3 章 小鼠胚胎干细胞体外培养和分化技术	53
3-1 小鼠超数排卵	54
3-2 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层的制备	55
3-3 小鼠胚胎干细胞(mESC)的分离培养与传代	60
3-4 小鼠胚胎干细胞(mESC)的鉴定	64
3-5 小鼠胚胎干细胞的体外分化实验	72
3-6 诱导多潜能干细胞(iPSC)的制备	74

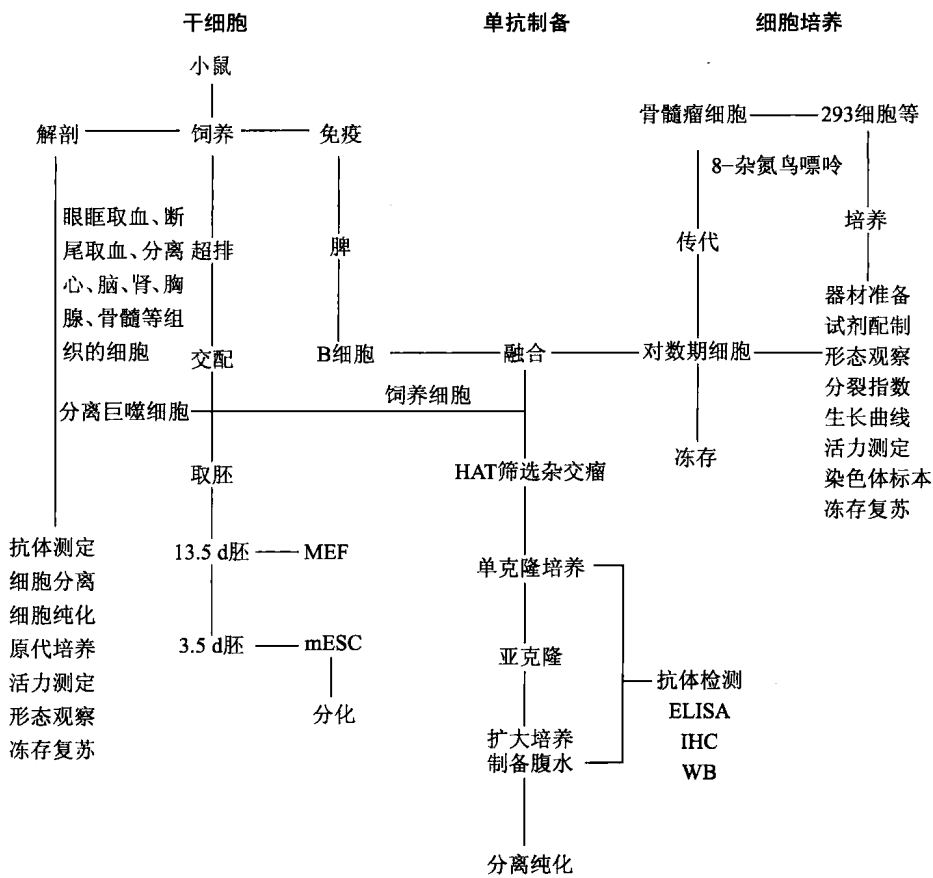
第 4 章 植物组织与细胞培养技术	77
4-1 植物组织与细胞培养基的配制	78
4-2 胡萝卜愈伤组织诱导及继代培养	81
4-3 胡萝卜愈伤组织的“器官分化”与“体细胞胚发生”	83
4-4 马铃薯茎尖培养	85
4-5 胡萝卜悬浮细胞培养	86
4-6 胡萝卜人工种子制作	88
4-7 大麦原生质体的分离与电融合	89
第 5 章 真核细胞转基因技术和检测技术	93
5-1 磷酸钙沉淀介导的转基因技术	94
5-2 阳离子聚合物介导的转基因技术	95
5-3 脂质体介导的转基因技术	96
5-4 基因枪法介导的转基因技术	98
5-5 细胞拆合和细胞重组	100
5-6 流式细胞仪分析技术	101
5-7 激光扫描共聚焦显微镜的使用和观察	104
5-8 细胞凋亡的诱导及生化检测	107
附录 1 缩略词表	109
附录 2 常用培养基和试剂的配制	110
附录 3 常用实验仪器	114
参考书目	115

实验计划

日期	实验内容
第 1 天	讲解实验要求, 观看录像 1-1 动物细胞培养实验的器材准备 1-4 动物细胞的传代培养 2-1 抗原制备与小鼠免疫
第 2 天	1-2 动物细胞培养用液的配制及过滤除菌 2-3 骨髓瘤细胞的制备 4-1 植物组织与细胞培养基的配制
第 3 天	1-3 培养细胞的形态观察、大小测定和照相记录 2-2 饲养层细胞的制备 4-2 胡萝卜愈伤组织诱导及继代培养
第 4 天	2-4 免疫脾细胞的制备 2-5 细胞融合和杂交瘤筛选 4-3 胡萝卜愈伤组织的“器官分化”与“体细胞胚发生”(观看录像)
第 5 天	1-6 培养细胞的分裂指数和生长曲线测定 1-7 培养细胞的活性测定 4-4 马铃薯茎尖培养
第 6 天	2-6 特异性单克隆抗体的检测 1-5 动物细胞的原代培养 4-5 胡萝卜悬浮细胞培养(观看录像)
第 7 天	1-8 培养细胞的染色体标本制备与分带技术 5-1 磷酸钙沉淀介导的转基因技术 5-2 阳离子聚合物介导的转基因技术 5-3 脂质体介导的转基因技术 3-1 小鼠超数排卵(观看录像) 3-2 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层的制备(观看录像) 3-3 小鼠胚胎干细胞(mESC)的分离培养与传代(观看录像) 3-4 小鼠胚胎干细胞(mESC)的鉴定(观看录像) 3-5 小鼠胚胎干细胞的体外分化实验(观看录像) 3-6 诱导多潜能干细胞(iPSC 细胞)的制备(观看录像) 4-6 胡萝卜人工种子制作 5-4 基因枪法介导的转基因技术(观看录像)

第 8 天	1-9	培养细胞的超低温冻存与复苏
	4-7	大麦原生质体的分离与电融合
第 9 天	2-8	单克隆抗体的制备与分离纯化
	5-8	细胞凋亡的诱导及生化检测
	5-5	细胞拆合和细胞重组(观看录像)
	5-6	流式细胞仪分析技术(演示)
	5-7	激光扫描共聚焦显微镜的使用和观察(演示)
第 10 天	2-7	杂交瘤细胞的克隆化培养(有限稀释法)
	2-9	杂交瘤细胞的保存
		小结、考评

实验流程和材料利用



动物细胞培养技术

动物细胞培养是指从体内取出组织、细胞,模拟体内生理环境,在无菌、适当的温度和营养条件下,使之生存、生长并维持其结构和功能的方法。自1907年Harrison用淋巴液做培养基,培养蛙胚神经组织,观察到神经细胞突起的生长过程开始,到实现细胞在体外长期培养增殖,至今已建立了数以万计的细胞系(cell line),并可达到10 000 L以上的培养规模,形成了一整套的技术体系,包括取材、培养基、培养条件、培养方法、培养细胞的生物学分析等。细胞培养为研究细胞增殖、分化、凋亡及其机制提供了实验模型,在研究病毒的侵染、复制和防治,研究肿瘤的发生、发展和治疗过程中发挥了重要的作用,为药物筛选提供了平台,为组织工程和临床细胞治疗提供了大量的材料。因此,学习和掌握细胞培养技术具有重要的科学研究和生产应用价值。

1-1 动物细胞培养实验的器材准备

一、实验目的

1. 了解动物细胞培养的洁净要求,建立无菌操作的概念。
2. 掌握细胞培养器材的清洗、消毒和保存的方法。

二、实验原理

细胞培养的本质是在人工条件下实现多细胞生物的基因组以单细胞无性繁殖的方式进行扩增。细胞在培养过程中保持其原有特性,因此,细胞培养成为细胞增殖、分化、凋亡的研究模型。脱离母体的细胞,失去了机体免疫系统、解毒系统和缓冲系统的支持,十分脆弱。培养基成分、pH、温度、气体条件等的轻微变化就会影响细胞的正常生长,极微量的有害物质就会使培养的细胞生长不良、产生变异或死亡,微生物污染更是直接导致细胞培养的失败。因此,需要严格的无菌条件和环境控制。洁净是细胞培养的基本要求,它包括取材的供体无菌,培养用液和培养用具的无菌,培养环境和操作过程的无菌,以及观察环境的相对无菌。洁净需要有一个体系来保证,这个体系包括无菌室,超净工作台,洁净的培养箱,无菌的培养器皿、培养用具和培养液,专用仪器设备,优质的细胞培养用水,无菌的试剂及血清等生物添加物,以及良好的管理,从而实现细胞培养在适宜、可控的环境下进行,保证细胞培养的成功。细胞培养用品的清洗和消毒是最为基础的,其流程如图 1-1-1 所示。

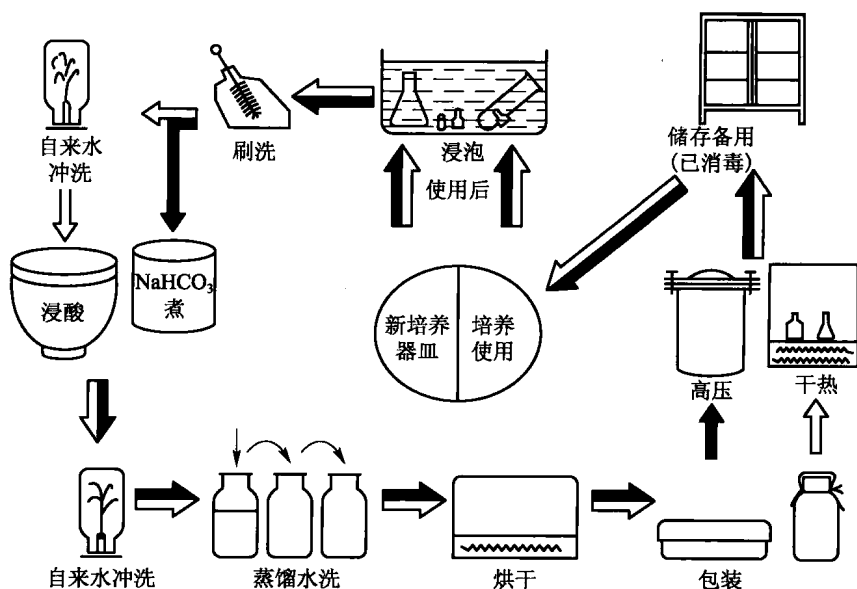


图 1-1-1 培养器材的清洗和消毒程序
(黑箭头:橡皮等不耐高温用品;白箭头:玻璃器皿)

三、实验用品

1. 实验器材:超净台,高压灭菌器,高温灭菌箱,干燥箱,纯水器,电炉,不锈钢锅,石英蒸馏水器,白纸,布袋,血清瓶,试剂瓶,眼科剪,眼科镊,不锈钢筛网,培养瓶,培养板,除菌过滤器,滤膜,橡胶手套,毛刷等。

2. 实验试剂:碱性高锰酸钾洗液,新洁尔灭,洗洁精,蒸馏水,双蒸水等。

碱性高锰酸钾洗液的配制:取 4 g 高锰酸钾溶于少量水后,加入 100 mL 10% 的 NaOH 溶液,混匀后装瓶备用。

四、实验方法

(一) 细胞培养室的准备

1. 整理、清洁无菌室的物品和器具。
2. 每周用 1% 新洁尔灭液擦拭无菌室地面、四壁、顶面等。
3. 经常开启除湿机,保持培养室干燥,防止微生物生长。
4. 每天开启无菌室和缓冲间紫外灯,照射 0.5~1 h,然后避光 0.5~1 h。
5. 细胞培养前,开启超净台,5 min 后再进行操作。

(二) 细胞培养器材的清洗和消毒

1. 玻璃器皿的清洗和消毒(干热灭菌法,图 1-1-1 中白箭头所示)

清洗流程如下:

- (1) 用过的细胞培养器皿立即浸入水中。
 - (2) 用软毛刷加洗洁精轻轻刷洗。
 - (3) 自来水冲洗,将洗洁精完全冲干净。
 - (4) 置电热干燥箱 80 °C 烘干。
 - (5) 碱性高锰酸钾洗液浸泡过夜。
 - (6) 自来水反复冲洗(20 次)。
 - (7) 单蒸水反复冲洗(5~6 次)。
 - (8) 双蒸水冲洗(5~6 次),或双蒸水浸泡过夜。
 - (9) 置电热干燥箱 80 °C 烘干。
 - (10) 白纸包扎后,装入储物罐。
 - (11) 干热灭菌,140~160 °C,2~3 h,冷却后放入无菌室备用。
2. 塑料橡胶制品的清洗和消毒(湿热灭菌法,图 1-1-1 中黑箭头所示)
- 使用后的塑料橡胶制品应立即浸入水中:
- (1) 在洗洁精溶液中浸泡 1 h 后进行刷洗。
 - (2) 自来水冲洗 10 min。
 - (3) 单蒸水冲洗 3 次。
 - (4) 双蒸水浸洗 3 次。
 - (5) 自然晾干。
 - (6) 包扎。
 - (7) 高压蒸汽灭菌(121 °C,20~30 min)。

3. 金属器具的清洗和消毒

使用后的剪刀、解剖刀、镊子、不锈钢筛网等金属器具应立即浸入水中:

- (1) 先用洗洁精洗去油垢等污物。
- (2) 自来水反复冲洗。
- (3) 单蒸水冲洗3次。
- (4) 双蒸水冲洗3次。
- (5) 自然晾干。
- (6) 包扎。
- (7) 高压蒸汽灭菌(121℃, 20~30 min)。

4. 细胞培养板和培养用具的清洗和灭菌

- (1) 弃去培养板中的旧培养液和培养物。
- (2) 自来水浸泡过夜。
- (3) 用软毛刷蘸少量洗洁精轻轻洗去污物。
- (4) 自来水冲洗10 min。
- (5) 自然晾干。
- (6) 用碱性高锰酸钾洗液浸泡1~2 h。
- (7) 自来水冲洗15~20 min。
- (8) 单蒸水冲洗5~6次。
- (9) 双蒸水冲洗5~6次。
- (10) 自然晾干。

(11) 使用前置于超净工作台上,紫外线照射灭菌30 min,或密封集中, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照灭菌,剂量为24.5~26.9 kGy。

5. 除菌过滤器的清洗和灭菌

(1) 除菌过滤器的过滤瓶和不锈钢漏斗等分别按玻璃器皿、塑料器皿和金属器具清洗的方法进行清洗,烘干。

(2) 在支撑网上安装0.22 μm 微孔滤膜,均匀夹紧滤器,放入双层布袋中,高压蒸汽灭菌(121℃, 20~30 min)后放入无菌室备用。

6. 无菌衣、帽和口罩等的清洗和消毒

无菌衣、帽和口罩等棉织品要定期进行清洗,使用前放入布袋中,用高压蒸汽灭菌(121℃, 20~30 min),然后置烘箱内40℃烘干备用。

五、注意事项

1. 细胞培养要远离微生物污染源,局部的洁净条件可由超净工作台来实现。根据实验需要选用不同类型的超净工作台或生物安全柜,超净工作台和无菌室应定期检测。检测方法是取3~4只直径9 cm的细菌培养皿,打开盖子,随机暴露在无菌室超净工作台的各部分0.5 h,然后加盖,37℃培养48 h,观察菌落数,每培养皿小于3个菌落为合格。超净工作台需要及时清洗或更换精滤网和高效过滤器等。

2. 新购橡胶制品使用前要用2% NaHCO_3 煮沸20 min除去毒性物质。

3. 细胞培养用蒸馏水必须用石英蒸馏水器烧制。可以用去离子水替代蒸馏水,用去离

子水蒸馏替代双蒸水。

4. 使用电热干燥箱进行干热消毒,升温与鼓风应同时开始,到达 100 ℃时停止鼓风。到达灭菌时间后,关闭电源,待温度下降后,再开启灭菌箱门,取出物品。

5. 高压灭菌器要定期检查,每次使用时都应观察水位,保证不断水。物品摆放要合理,不堵塞排气口。加热后要放出冷空气,并保持一定的高压空气流动,以免局部温度隔离导致灭菌无效。

6. 使用后的玻璃、塑料器皿应立即浸入清水中,避免黏附于玻璃上的蛋白质干涸。用软毛刷和中性洗涤剂仔细洗刷,或用超声波清洗。向洗液中浸泡器皿或从洗液中取出器皿时都要戴耐酸手套和围裙进行防护,每次戴耐酸手套时都要用充气法检测手套是否有破漏。

7. 灭菌后的器皿要存放在洁净处,根据不同的无菌方法和包装方法在可靠的时间内使用,普通高温高压灭菌的物品储存超过两周,应重新灭菌方可使用。

六、思考题

1. 在动物细胞培养实验中,有哪些常用的灭菌和除菌方法?各自的优、缺点是什么?
2. 细胞培养用物品为什么要严格洁净、无菌?

1-2 动物细胞培养用液的配制及过滤除菌

一、实验目的

1. 掌握动物细胞培养用液的配制和酸碱度调节方法。
2. 掌握培养用液的过滤除菌和无菌实验方法。

二、实验原理

细胞离体生长需要各种营养因子和生长因子以及基本恒定的 pH 和渗透压环境,这些都是由培养基供给的。目前采用的各种合成培养基是在天然培养基的基础上发展而成的。培养基的成分包括氨基酸、维生素、盐类、葡萄糖、有机补充物、激素和生长因子等。大多数培养基要添加血清才能使细胞生长得更好。细胞培养用液还包括消化液、平衡盐溶液和抗生素液等。消化液用于原代组织细胞的分离和贴壁细胞系的分散传代。常用的消化液有胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)以及胶原酶溶液。酶液用于解离细胞间的蛋白质、胶原、黏附分子等,使细胞离散。EDTA 是一种二价化学整合剂,能结合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,使依赖 Ca^{2+} 的钙黏着蛋白失活而使细胞解离。

血清和酶液等含有蛋白质活性的物质,不能高温灭菌,需要采用过滤方法除去微生物。滤器分为正压和负压两类(图 1-2-1)。正压过滤器适用于过滤血清等黏稠、富含蛋白质的液体,这些液体在负压抽滤中会产生很多泡沫。两种滤器都是靠空气压力使培养用液经过一定截留孔径的滤膜来实现除菌。

水的质量是细胞培养成功的前提,必须非常纯净。平衡盐溶液(BSS)有多种配方,不同配方的 BSS 提供维持平衡的无机离子成分和适合的渗透压以及调节 pH 的能力略有差异,

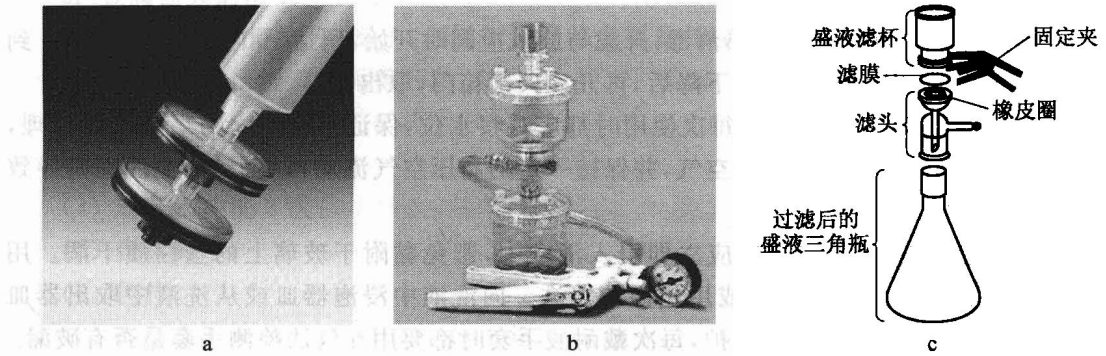


图 1-2-1 滤器

a. 注射器式正压过滤器; b. 负压过滤器; c. 负压过滤器结构图

可根据需要选用。

在培养液中添加抗生素能有效减少污染。常用的抗生素有青霉素和链霉素。在溶液中抗生素易失活,使用时要注意药品的有效期。抗生素有抑菌作用,但并不杀灭细菌,长期使用会出现抗药菌株,并会掩盖低水平的污染。因此,要在一定间隔期停用抗生素。

培养细胞对培养基 pH 比较敏感,大多数细胞系在 pH 7.2~7.4 时生长最好,通过培养液中的酚红指示剂可以直观地确定 pH 范围。酚红在 pH 6.5 时呈黄色, pH 7.0 时呈橘红色, pH 7.4 时呈红色, pH 7.8 时呈紫红色。培养细胞生长代谢过程中会产生 CO_2 和有机酸,使培养液的 pH 变低。为了保持培养液的 pH 恒定,培养基中设计有不同的缓冲液,最常见的是 CO_2 缓冲系统,利用 CO_2 和 NaHCO_3 之间的浓度平衡调节培养液的 pH。因此,细胞需要在 CO_2 培养箱内培养。也有在培养基中添加 HEPES 等试剂,提高培养基的缓冲容量。

大部分培养的细胞对渗透压的耐受力较大。不同种属细胞的渗透压要求略有不同,如体外生长的人细胞的渗透压大约是 290 mOsm/kg,而小鼠的渗透压大约是 310 mOsm/kg。实际工作中,渗透压为 260~320 mOsm/kg,对大部分细胞都是合适的。

三、实验用品

1. 实验器材:超净台,酒精灯,高压蒸汽灭菌锅,超净水器,抽滤器,盐水瓶,细胞培养瓶,吸管,0.22 μm 滤膜,量筒,搅拌棒,无菌衣,无菌帽,口罩,精密滤纸等。

2. 实验试剂:1640 培养粉剂,5.6% NaHCO_3 溶液,新生牛血清,PBSA 溶液,青霉素/链霉素双抗液 10 mL(每毫升含青霉素 10 000 U,链霉素 10 000 μg),胰蛋白酶粉剂,细菌培养基,EDTA,75%乙醇等。

四、实验方法

(一) 1640 培养液的配制

1. 称取 9.8 g 的 1640 培养粉剂。
2. 将 1640 培养粉剂溶于 500~600 mL 的双蒸水。
3. 加入青霉素/链霉素双抗液 10 mL(每毫升含青霉素 10 000 U,链霉素 10 000 μg)。

4. 用 5.6% NaHCO_3 溶液调 pH 至 7.0~7.2, 精密试纸测定 pH, 定容到 1 000 mL 后, 过滤除菌。

(二) 过滤除菌

1. 抽滤装置经清洗烘干后, 装上孔径为 0.22 μm 的醋酸纤维素微孔滤膜, 装袋高压蒸汽灭菌(121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min), 放入无菌室备用(参见实验 1-1)。

2. 进入缓冲间, 穿好无菌服, 戴好无菌帽、口罩、手套后, 进入无菌室, 打开超净工作台, 用 75% 乙醇棉球擦手消毒, 点燃酒精灯。

3. 在超净工作台上, 将配制好的培养液小心倒入抽滤装置的容器中, 打开抽滤泵或用手压抽滤泵抽滤。

4. 抽滤完毕, 在酒精灯安全区域卸下抽滤器, 在抽滤瓶上加无菌棉塞。

5. 吸取 2 mL 经抽滤的培养液, 置于无菌细胞瓶内, 加 1 mL 细菌培养基, 加盖密闭后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 进行无菌检测。培养液澄清, 颜色无变化为无细菌污染。

6. 取下抽滤嘴连接管, 在酒精灯火焰上灼烧灭菌, 待冷却后, 打开培养液瓶盖, 分装做好标记, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7. 经无菌检验证实培养基无菌后, 加入一定比例的新生牛血清(一般为 10%~15%), 密封, 贴标签, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 暂不使用则 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(三) 胰蛋白酶消化液的配制

1. 量取 10×PBSA 液 10 mL, 置于 250 mL 烧杯内。

2. 加入双蒸水 90 mL, 混匀。

3. 称取 20 mg EDTA, 加入配制好的 1×PBSA 中, 加热后搅拌使其完全溶解, 配成 0.02% EDTA 溶液, 冷却。

4. 加入 0.25 g 胰蛋白酶粉剂, 轻轻搅拌, 保鲜膜封盖, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

5. 第 2 天, 适当搅拌后, 精密滤纸过滤, 最后用 0.22 μm 滤膜抽滤。

6. 取 1 mL 胰蛋白酶加入 2 mL 培养液中作无菌检测。

五、注意事项

1. 配制细胞培养用水要求很高, 要用石英蒸馏水器烧制, 蒸馏 2 次以上, 最好使用新鲜蒸馏的, 也可使用质量好的超纯水。超纯水经过滤、离子交换、反渗透、超滤、紫外杀菌等多道处理, 电阻率达到 18.6 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$, 如用于细胞培养还建议再蒸馏 1 次。

2. 配制平衡盐溶液母液一般都配成 10× 以上母液冰箱保存。高浓度盐溶液在冰箱中会有结晶析出, 使用时应仔细观察, 先充分溶解后再稀释。

3. 血清的应用是许多细胞能够培养成功的重要因素。血清是血液固形物之外的部分, 约占血液的 55%, 用于细胞培养的血清有牛血清、马血清、人血清、羊血清等。常用的牛血清又可分为胎牛血清、新生牛血清、小牛血清等。胎牛血清的质量最好, 它所含的生长因子多, 抗体、补体少, 刺激细胞生长的能力强。但因血清成分复杂, 生产批次之间有差异, 需要选择使用, 同时应注意加入血清后培养基 pH 的变化与调整。

4. 培养液的配制过程要特别注意避免染菌, 称量、溶解、制水过程都应尽可能在洁净的环境中较快地完成, 因为不是所有的微生物都可以经 0.22 μm 滤膜去除。滤膜可以由醋酸纤维素、混合纤维素等组成, 孔径分别为 0.1 μm 、0.22 μm 、0.45 μm 、0.63 μm 等, 可根据过滤