

## 第一节 细胞培养的相关技术

### 1 细胞的复苏

#### 【概述】

复苏细胞要求快速融化的手段，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化。避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损害。

#### 【用品】

培养液、吸管、离心管、培养瓶

#### 【步骤】

- [1] 打开水浴锅，将温度调至 37 °C；
- [2] 从液氮中取出冻存的细胞株，用镊子夹住冻存管（戴防护面罩），迅速置入 37 °C 的水浴锅中，不断振摇冻存管，使之尽快融化，要在 1-2 min 内完成复温；
- [3] 完全融化后，取出冻存管，移至超净工作台，用 75%酒精擦洗消毒，用无菌吸管吸取细胞悬液移至无菌离心管，加 10 倍的含 10%胎牛血清的培养液，用吸管轻轻吹匀；
- [4] 细胞悬液离心，1000rpm，5-8min，小心弃上清液。加入适量含 10%胎牛血清的培养液，接种于培养瓶中，置于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度孵箱中培养；
- [5] 次日更换培养基，以后按常规培养方法进行培养。如果复苏时细胞密度较高及时传代。细胞复苏时细胞密度以  $5 \times 10^5$  个/ml。

### 2 细胞的传代

#### 【概述】

培养细胞传代根据不同的细胞采取不同的方法。贴壁生长的细胞用消化法传代；部分贴壁生长但粘附不牢固的细胞也可以用直接吹打传代；悬浮生长的细胞可以采用直接吹打或离心沉淀后再分离传代，或直接用自然沉降法吸除上清后，再吹打传代。

#### 【用品】

PBS（或 Hanks 液）、0.25%胰蛋白酶（或含 EDTA）、培养液、吸管、培养瓶

#### 【步骤】

贴壁细胞消化传代法：

- [1] 用无菌吸管吸弃瓶内旧的培养基；
- [2] 用 PBS 洗二遍，以防止残留培养液中的血清对胰蛋白酶的抑制作用，向瓶内加入 0.5--0.8 ml 胰蛋白酶（以  $25\text{cm}^2$ ），轻轻摇动培养瓶，使胰蛋白酶流遍所有的细胞表面；加入的消化液适量，因为消化液过多对细胞有损伤，同时也需要较多的含血清培养液

去中和；

- [3] 消化最好在 37℃培养箱或室温 25℃以上的环境下进行消化，消化 2--5 min 后，把培养瓶放在显微镜下观察，发现胞质回缩、细胞间隙增大，细胞变圆后，立即将培养瓶立起并加入少许含血清的培养液，终止消化；
- [4] 用无菌吸管反复吹打瓶壁细胞，吹打过程按顺序进行，从培养瓶底部一边开始到另一边结束，以确保所有底部都被吹打到；吹打过程中动作要轻柔，尽可能不要出现泡沫，这些都损伤细胞；
- [5] 加入新鲜含 10%胎牛血清的培养液，然后将原培养瓶中的细胞悬液吸出，分别接种在新的培养瓶中。

悬浮细胞的传代：因为悬浮生长细胞不贴壁，故传代时不用采用消化法，可直接传代或离心收集细胞后传代。直接传代即让悬浮细胞慢慢沉淀在瓶底后，将上清洗掉 1/2—2/3，然后用吸管吹打形成细胞悬液后，再传代。

悬浮细胞多采用离心方法传代，即将细胞连同培养液一并转移到离心管内，离心 800—1000r/min，5min，然后去除上清，加新的培养液到离心管内，用吸管吹打使之形成细胞悬液，然后传代接种。

部分贴壁生长的细胞，不经消化处理直接吹打也可使细胞从壁上脱落下来，而进行传代。但这种方法仅限于部分贴壁不牢的细胞，如 HeLa 细胞等。直接吹打对细胞损伤较大，导致较大数量的细胞丢失，因此绝大部分贴壁生长的细胞均需消化后，才能吹打传代。

### 3 细胞的冻存

#### 【概述】

冻存细胞时要缓慢冷冻。因为细胞在不加任何保护剂的情况下直接冷冻时，细胞内外的水分都会很快形成冰晶，冰晶的形成将引起一系列的不良反应。首先细胞脱水使局部电解质浓度增高，pH 值改变，部分蛋白质由于上述因素而变性，引起细胞内部空间结构紊乱，细胞内冰晶的形成和细胞膜系统上蛋白质、酶的变性，引起溶酶体膜的损伤使溶解酶释放造成细胞内结构成分的破坏，线粒体肿胀、功能丧失并造成细胞能力代谢的障碍。胞膜上的类脂蛋白复合体在冷冻中易发生破坏引起胞膜通透性的改变、使细胞内容物丧失。细胞核内 DNA 也是冷冻时细胞易受损部分。如细胞内冰晶形成较多，随冷冻温度的降低，冰晶体积膨胀造成 DNA 的空间构型发生不可逆的损伤性变化，而引起细胞的死亡。

在细胞冻存时要尽可能的均匀地减少细胞内水分，减少细胞内冰晶的形成是减少细胞损伤的关键。目前多采用甘油或者二甲基亚砷作为保护剂。这两种物质在深低温冷冻后对细胞无明显毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞，可以使冰点下降，提高细胞膜对水的通透

性；加上缓慢冷冻方法可使细胞内的水分渗出细胞外，在胞外形成冰晶，减少细胞内冰晶的形成，从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。

### 【用品】

胰酶、含血清培养基、DMSO（分析纯）或无色新鲜甘油（667.83kPa 蒸汽高压消毒）、吸管、离心管、冻存管

### 【步骤】

- [1] 用无菌吸管吸弃瓶内旧的培养基；
- [2] 加入少量 PBS 冲洗二遍，用胰蛋白酶把单层细胞消化下来，依据传代的方法把细胞悬液收集于离心管中，离心 1000 rpm，5-8 min；
- [3] 小心弃上清液，加入配置好的冻存培养液，用吸管轻轻吹打使细胞均匀，然后将含有细胞的冻存液转移到无菌的冻存管中，每个冻存管加液 1-1.5 ml，细胞最终密度为  $(5-10) \times 10^6/\text{ml}$ ；
- [4] 冻存管封口，做好标记，按照以下程序冻存：4℃，15min--20 min，-20℃ 30min--40 min，见细胞悬液结冻后，放入 -80℃ 冰箱 3h 或过夜，之后置于液氮中。

### 【注意事项】

- [1] 从增殖期到形成致密的单层细胞以前的培养细胞都可以用于冻存，但最好选择对数生长期细胞，已经长满的细胞冻存复苏后生存率很低。在冻存前一天最好换 1 次培养液。
- [2] 将标记好并装入冻存管的支架，从液氮容器口缓缓放入，按 1℃/min 的降温速度，在 30-40min 时间内使其到达液氮表面。再停 30min 后，直接投入液氮中。
- [3] 细胞在首次冻存后要在短期内复苏 1 次，观察细胞对冻存的适应性。

## 4 细胞的计数

### 【概述】

细胞计数法是细胞培养研究中的一项基本技术，它是了解培养细胞生长状态，测定培养基、血清、药物等物质生物学作用的重要手段。常用的细胞技术有血球计数板计数法和电子细胞计数仪计数法。

### 【用品】

血球计数板、吸管、胰酶、培养液、显微镜

### 【步骤】

- [1] 准备计数板：用无水乙醇或 95% 乙醇清洁计数板和盖玻片，待干燥后，把盖玻片覆在

计数板上面，使之微微移向一侧，露出计数板台面少许；

[2] 用移液枪在计数板上盖玻片的一侧加微量细胞悬液，加样时不要溢出盖玻片也不能溢入两侧的玻璃槽内，如果产生上述情况需对计数板冲洗和拭干后重新加样，加样量也不要过少或带气泡；

[3] 在显微镜下，用 10×物镜观察，可见细胞均匀分散计数板各处。计算四角大方格内的细胞数，压中线者只计算左线和上线者，右线和下线不计算在内(即仅计算压两个边的细胞)，成团细胞按单个细胞计算。按照下面公式计算细胞密度：

$$(\text{细胞悬液的细胞数})/\text{ml}=(\text{四个大格子细胞数}/4) \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

#### 【注意事项】

[1] 消化单层细胞时，务求细胞分散良好，制成单细胞悬液。否则会影响细胞计数结果。

[2] 取样计数前，应充分混匀细胞悬液。在连续取样计数时，尤其要注意这一点。否则，前后计数结果会有很大的误差。

[3] 镜下计数时，遇见 2 个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算。如细胞团 10%以上，说明消化不充分；或细胞数少于 2 个/mm<sup>2</sup>或多于 50 个/mm<sup>2</sup>时，说明稀释不当，需重新制备细胞悬液、计数。

### 5 培养细胞的运输

装运细胞的方法有两种，一种为冷冻储存运输，即利用特殊容器内盛液氮或干冰冻存，保存效果较好，但较麻烦，且不宜长时间运输，多需空运。另一种简单的方法为充液法，步骤如下：

[1] 选择生长状态良好的细胞，可直接根据路程时间来选择接种细胞数量，一般以长满 1/3—1/2 瓶底壁为宜，去掉旧培养液，补充新的培养液到达瓶颈部，保留微量空气，拧紧瓶盖，瓶口用胶带密封。

[2] 妥善包装运送，并用棉花等做防震防压处理。4—5 天可以到达目的地者一般放在贴身口袋即可，到达目的地后倒出多余的培养液，仅保留维持细胞生长所需液量。37℃培养，次日传代。

[3] 如果距离很近，如在统一城市内或数小时路程，也可将细胞附着面朝上，或把培养液全部倒掉放在胸部口袋进行运送。仅靠附着于细胞表面的培养液，可使细胞短时间不致受损。

### 6 多药耐药细胞的培养

多药耐药 (Multidrug Resistance, MDR) 是指肿瘤细胞长期接触某一化疗药物，不仅对

此种化疗药物产生耐药性，而且对其他结构和功能不同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药性的现象，是造成化疗失败的主要原因。

耐药指数 (RF) = 某种药物针对抗药性细胞的  $IC_{50}$  / 某种药物针对敏感性细胞的  $IC_{50}$ 。

逆转指数 (reverse index, RI) = 不加逆转剂时某种药物针对抗药性细胞的  $IC_{50}$  / 加入逆转剂后某种药物针对抗药性细胞的  $IC_{50}$ 。

体外低浓度梯度递增联合大剂量间断冲击方法诱导肿瘤细胞对特定细胞产生耐药性。

## 第二节 细胞培养污染的检测和排除

组织培养细胞被有害物污染是组织培养工作的大敌。应用组织培养进行研究工作，除需要好的实验设计和技术方法外，成败的关键还在于能否避免污染。一项好的研究，或建成的满意细胞系，往往由于遭受污染而前功尽弃。因此，一个组织培养工作者，要始终注意防止污染。

培养细胞被污染，人们最注意的是真菌、细菌和病毒等微生物。现在看来已经不够，当前“污染”一词的概念应该是，凡混入培养环境中对细胞生存有害的成分和造成细胞不纯的异物，都应视为污染。从这一概念考虑，组织培养污染应包括以下几个方面：

微生物：真菌、细菌、支原体和病毒

化学物质：影响细胞生存的非细胞所需的化学成分

细胞：非同种的其它细胞

当然在培养中以微生物污染最为多见，化学污染较少；但近年随细胞种类增多，不同种细胞交叉污染却屡有发生，以致在 ATCC 接受入库细胞中特设同工酶检测一项，目的在于证明是否有 HeLa 等细胞的交叉污染。但细胞交叉污染只要工作细心，是容易防止的，而微生物污染在实际工作中却是最难防止和易发生的。

**1 污染途径** 各种污染主要通过以下途径和媒介发生：

[1] 空气 空气是扩散微生物的主要途径。由于空气流动性大，在操作场地与外界隔离不严和消毒不充分的情况下，外界不洁空气很容易侵入造成污染。因此，培养设施不宜置于通风场所。现各实验室普遍应用净化工作台，能产生无菌的屏障气流，可防止不洁空气污染。净化工作台使用过久，过滤层受尘埃堵塞情况下，工作时不带口罩或外界气流过强、污染空气均可进入操作野，导致污染。又不同季节和不同地区空气内含菌数不同；炎热夏季尤其南方多雨地区空气湿度大、含菌数量多，工作应特别注意。空气是不断流动的；虽用消毒措施也难以排出空气中所有微生物，但每立方米内含菌数不应超过 1-5 个。

[2] 器材 培养器皿和容器洗刷不净残留污物、培养用液灭菌不彻底等，都可引入有害物。

[3] 操作 实验操作马虎、动作不准确、消毒观念不强，使用的吸管、刀、剪沾染微生物等；或封瓶口时不严，都可发生污染。同时培养两种以上细胞，操作不慎，使用同一吸管或培养

用液，可能导致细胞交叉污染。

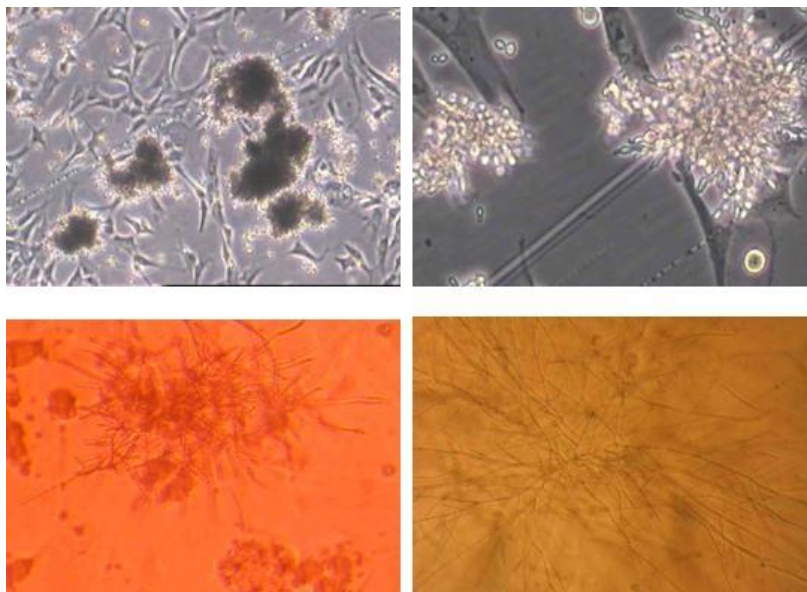
[4] 血清 血清也是污染细胞的来源，有的市售血清制备水平低、检测不严，常已被支原体和病毒污染。

[5] 组织 初代培养组织常有污染；有的是在手术中污染，有的本身可能是被污染的组织(如已经发生溃烂的肿瘤组织)；手术用碘酒消毒后，擦拭不净可能混入碘污染。

**2 污染对细胞的影响** 体外培养细胞自身没有抵抗污染的能力，而且培养基中加入的抗生素的抗污染能力也是很有限的，培养细胞一旦发生污染多数将无法挽救。在细胞受有害物污染时间短、污染程度轻、并能及时排除污染物的情况下，细胞有可能恢复。当污染物持续存在于培养环境中时，轻者细胞增殖生长缓慢、分裂相减少、细胞变得粗糙、细胞轮廓增强，重者细胞停止增殖，分裂相消失，细胞质中出现大量堆积物，细胞变圆或崩溃从瓶壁脱落。但根据污染物的不同，对细胞的影响有别。

有的微生物如支原体，无致死毒性，可与细胞长期共存，对细胞形态和功能的影响是潜在的。而病毒、细菌和霉菌的增殖迅速，能在短时间内在数量上压过细胞或产生有毒物杀死细胞。化学物，如重金属或其它非培养必需化学试剂混入培养液中后，有的毒性小，被排除后，细胞仍可生存；有的烃化物如多环芳烃有致突变性，能导致细胞发生转化。

[1] 真菌污染 在微生物污染中，以真菌污染最多，最常见的有：烟曲霉(*Aspergillus Fumigatus*)；黑曲霉(*Aspergillus Niger*)；毛霉菌(*Mucor*)；孢子霉(*Oospora*)；白念珠菌(*Candida*)；酵母菌(*Yeast*)。真菌种类繁多，形态各异，但污染后均不难发现，大多呈白色或浅黄色小点漂浮于培养液表面，肉眼可见；有的散在生长，镜下观察呈丝状、管状或树枝状菌丝，纵横交错穿行于细胞之间。念珠菌和酵母菌呈卵圆形态，散在于细胞周边和细胞之间生长。



预防霉菌污染，可在培养基里加 3u/ml 的两性霉素或制霉菌素或放线菌素 D 或双抗；但

细胞一旦污染，很难挽救，制霉菌素或放线菌素 D 或双抗都于事无补，建议舍弃该污染细胞，将环境彻底消毒。无菌室经甲醛熏蒸消毒后，可用同等量的氨水喷洒中和，约几小时即可进入操作。

[2] 细菌污染 较常见的污染细菌有大肠杆菌、假单孢菌，白色葡萄菌等。细菌污染后大多能改变培养液 pH 使培养液变混浊，也有的对培养液无肉眼可见影响，只在镜下观察发现菌体时才能感知污染。细菌增殖迅速，能消耗营养液和产生毒素抑制细胞生长，毒性大的细菌很快导致细胞崩解死亡。加用抗生素的培养液一般可预防和排除个别少量细菌的污染。一旦发生细菌污染很易发现，多数情况下培养液短期内颜色变黄，出现明显污浊现象。

细菌和霉菌污染多在传代、换液、加样等开放性操作之后发生。而且由于增生迅速，多在发生污染 48h 以内就已明显。因此在实验的最初两天密切观察实验样本是否有污染发生，这样可及时采取措施予以补救或排除。

[3] 支原体污染 支原体是细胞培养中最常见、不易被察觉和干扰实验结果的一种污染。从 1952--1972 年间，有人检查了 54 个实验室的 9700 个各类培养细胞时发现，有 11% 的细胞受到了支原体的污染。当前随实验室设备的改善和技术方法的改进，支原体污染率有所下降，但尚未能彻底杜绝，污染仍时有发生。支原体污染是细胞培养研究室重点预防对象。

支原体是一种介于细菌和病毒之间的目前所知能独立生活的最小微生物，它无细胞壁，形态呈高度多样性，最小的直径 0.2 微米，可通过滤菌器。支原体大小介于 0.2~2 微米之间，约有 1% 可通过滤菌器，因此往往难以发现。支原体形态多变，有圆形、丝状或梨形：光镜下难以看清其结构。支原体多吸附于细胞表面或散在细胞之间，横断面很像细胞微绒毛的横断面。

不同支原体的生物学性状有很大差别。所有支原体都需要固醇，部分需要精氨酸，有的需氧、葡萄糖，有的有 DNA 酶活性、溶血作用和凝集作用；有的缺乏或全无某一特性，因此支原体对培养细胞的影响是多方面的。大多数支原体适于偏碱条件下生存(pH7.6--8.0)，对酸耐受性差，对热比较敏感；对青霉素普遍有抗药性；青霉素作用主要抑制细菌细胞壁的形成，支原体无细胞壁，故不受影响。细胞受支原体污染后，个别严重情况下，加之细胞敏感，可使细胞增殖缓慢、部分细胞变圆、从瓶壁脱落。但多数细胞受污染后，无明显变化，或有微细变化却由于传代和换液而被缓解。在观察不够细心和缺乏经验时，外观上往往给人以“正常”的感觉，实则污染细胞会受到多方面潜在的影响。

[4] 细胞交叉污染 细胞培养中，细胞间交叉污染并不罕见，多是由于在培养操作过程中各种细胞同时进行，混杂使用所用器具或液体所致，这种污染能使细胞的生长特性、形态特征等发生变化，有些变化较轻微、不易察觉，有些则可能由于污染的细胞具有生长优势最终压

过原来细胞而导致细胞的生长抑制，最终死亡。常用观察细胞形态、分析生长特性和核型、检测细胞的标记物等方法检测交叉污染的细胞。

### 3 污染的检测

#### [1] 细菌、真菌污染的检测

**肉眼观察** 细菌、真菌污染常在传代、换液、加样等开放性操作之后发生，而且增生迅速，若有污染，在 48 小时内可明显观察到，例如培养液变混浊，或略加振荡有很多漂浮物漂起。

**接种观察** 采用普通肉汤接种或用未加双抗药物的培养液接种，也可发现是否有污染。

**镜下观察** 在倒置显微镜的高倍镜下可见培养液中有大量圆球状颗粒漂浮，即为细菌污染。

若细胞之间有丝状、管状、树枝状或卵形的物质常为真菌污染。

#### [2] 支原体污染的检测

**相差显微镜观察** 直接取少许培养液滴在载物片上，再盖上盖片观察，支原体在镜下呈暗色微小颗粒，多位于细胞与细胞之间，有时可见类似于布朗运动的表现。应注意与细胞破碎溢出的内容物如线粒体等相区别。

**荧光染色法观察** 用荧光染料 Hoechst33258，此染料能与 DNA 特异地结合，可使支原体内的 DNA 着色，荧光显微镜下支原体呈绿色小点，散在于细胞周围或附于细胞表面。

**电镜检测** 若条件许可，可用扫描电镜或透射电镜观察。一般在细胞培养 48~72 小时，细胞接近汇合前，用胰酶消化细胞制成细胞悬液后进行固定、包埋、切片后才能进行观察。

**培养检测** 将细胞悬液 5mL 加入 45mL 支原体肉汤培养基，培养 14 天后观察肉汤培养有无雾状沉淀，然后取 0.5ml 加入已冷却到 50℃的培养基中，再用琼脂培养基做分离培养，37℃培养 3 天观察有无“荷包蛋”菌落出现。

#### [3] 病毒的检测

应用电镜技术快速诊断动物病毒病。

逆转录\_聚合酶链反应 RT-PCR 检测病毒。

**4 污染的预防** 防止污染，预防是关键，预防措施应贯穿于整个细胞培养的始终。培养细胞的污染一旦明确，多数将无法救治，如果污染的细胞不是具有重要的价值，一般发现污染后应尽快弃之，以防污染扩大影响其他细胞。因此，应尽力预防污染的发生。防止的关键在严格无菌操作，把好每一关口，尽可能禁止其他污染的物品进入培养操作环节。

[1] 器皿准备中的预防 用于细胞培养的器皿应严格清洗，做到真正洁净；应该无菌的物品，要做到消毒严格，真正无菌；器皿在运输、贮藏过程中，要严格操作，谨防污染。



[2] 开始操作前的预防 主要包括以下方面：应当按厂家规定，定期清洗或更换超净工作台的空气滤网，请专职人员定期检查超净工作台的空气净化标准；检查培养器皿是否有消毒标志，有条件的实验室应尽可能使用一次性无菌器皿；检查新配制的培养液，确认无菌方可应用；操作前提前半小时启动超净工作台及紫外消毒灯；操作者应消毒双手和戴口罩。

[3] 操作过程中的预防 主要包括：在超净工作台面放置的所有培养瓶瓶口不能与超净工作台的风向相逆，不允许用手触及器皿的无菌部分，如瓶口和瓶塞内侧；在安装吸管帽、开启或封闭瓶口操作时要经过火焰烧灼，并在火焰附近工作；吸取培养液、细胞悬液等液体时，应专管专用，防止污染扩大或造成培养物之间的交叉污染；使用培养液前，不宜过早开瓶；开瓶后的培养液应保持斜位，避免直立；不再使用的培养液应立即封闭瓶口；培养的细胞在处理之前勿过早暴露于空气中；操作时不要交谈、咳嗽，以防唾沫和呼出气流引发污染；操作完毕后应将工作面整理好，并消毒擦拭工作面，关闭超净工作台。

[4] 其他方面的预防 主要有：为了确保培养物的安全，应及早冻存有价值的培养物；购入的未灭活血清应采取 56℃水浴灭活 30 分钟的措施以使血清中的补体和支原体灭活；对新引进的细胞株应加强观察，防止外来的污染源；超净台的风机不能过大，风机到 6-8 格。否则也可能能致霉菌污染；孵箱应定期清洁（2 月左右），尤其在多雨的季节，培养箱清洗方法是：用 84 液擦洗—清水擦洗—75%酒精擦洗—紫外灯照。定期打扫无菌室：每周打扫一次，先用自来水拖地、擦桌子、超净工作台等，然后用 3‰来苏尔或者新洁尔灭或者 0.5%过氧乙酸擦拭。

**5 污染的排除** 培养的细胞一旦被微生物污染，应及时处理，防止其他细胞被污染。通常选高压灭菌被污染的细胞，然后弃掉。如果有价值的细胞被污染，并且污染程度比较轻，可通过及时排除污染物，挽救细胞恢复正常。常用的排除微生物污染方法有如下几种：

[1] 抗生素排除法 抗生素是细胞培养中杀灭微生物的主要手段。各种抗生素性质不同，对各种微生物的作用也不同，联合应用比单用效果好，预防性应用比污染后使用好；如果发生微生物污染后再使用抗生素，常难以根除。有的抗生素对细菌仅有抑制作用，而无杀灭效应。反复使用抗生素还能使微生物产生耐药性，且对细胞本身也有一定影响，因此有人主张尽量不用抗生素处理，当然，一些有价值的细胞被污染后，仍需用抗生素挽救，在这种情况下，可采用 5~10 倍于常用量的冲击法，加入高浓度抗生素后作用 24--48 小时，再换入常规培养液。有时可能奏效。抗生素的参考用量和效果列于表。

表 常用抗生素及推荐用量

抗生素	抗菌谱			常用浓度
	细菌	真菌	支原体	

青霉素				100IU/ml
链霉素	G+			100μg/ml
庆大霉素	G-			200μg/ml
四环素	G+/G-		+	10μg/ml
卡那霉素	G+/G-		+	50μg/ml
两性霉素	G+/G-	+	+	2μg/ml
制霉菌素		+		25μg/ml

[2] 加温除菌 根据支原体耐热性能差的特点。有人将受支原体污染的细胞置于 41℃中作用 5~10 小时(最长可达 18 小时)以杀灭支原体。但 41℃对培养细胞本身也有较大影响, 故在处理前, 应先进行预试验, 确定出最大限度杀伤支原体而对细胞影响较小的处理时间。

[3] 动物体内接种 受微生物污染的肿瘤细胞可接种在同种动物皮下或腹腔, 借动物体内免疫系统消灭污染的微生物, 肿瘤细胞却能在体内继续生长, 待一定时间后, 从体内取出再进行培养繁殖。

[4] 与巨噬细胞共培养 在良好的体外培养条件下巨噬细胞可存活 7--10 天, 并可分泌一些细胞生长因子支持其他细胞的克隆生长。与体内的情况相似, 巨噬细胞在体外培养条件下仍然可吞噬微生物并将其消化。利用 96 孔培养板将极少量的培养细胞与巨噬细胞共培养, 可以在高度稀释培养细胞、极大地降低微生物污染程度的同时, 更有效地发挥巨噬细胞清除污染的效能。本方法与抗生素联合应用效果更佳。

#### 主要参考文献:

- [1] 薛庆善主编.体外培养的原理与技术.北京:科学出版社,2001
- [2] 陈瑞铭主编, 动物组织培养技术及其应用.第二版.北京: 科学出版社, 1998
- [3] 鄂征主编.组织培养和分子细胞学技术.第二版.北京: 北京出版社, 1997
- [4] 薛庆善主编.体外培养的原理与技术.北京: 科学出版社, 2001
- [5] 章静波主编, 组织和细胞培养技.北京: 人民卫生出版社, 2002
- [6] 张卓然主编, 实用细胞培养技术.北京: 人民卫生出版社, 1999

## 附：主要试剂的配制

### [1] McCoy's 5a 培养基

配制 1000 ml 培养基：称取青霉素 0.08g，链霉素 0.1g， $\text{NaHCO}_3$  1.5 g，Hepes 2.38g 和 McCoy's 5a 干粉一袋，放入已消毒的 1000ml 烧杯中，加适量超纯水，充分搅拌溶解，混匀定容至 1000 ml，在超净台中用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜的过滤除菌，4  $^\circ\text{C}$  保存。

### [2] 胰蛋白酶(trypsin) 液(0.25%)

精密称取胰蛋白酶 0.25 g，溶于 100 ml PBS 缓冲液中，用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌，小瓶分装，4  $^\circ\text{C}$  保存。

### [3] 细胞冻存培养液(含 10%二甲基亚砷)

配制 10 ml 细胞冻存液：取 9 ml 胎牛血清于无菌离心管中，加入 1 ml 二甲基亚砷，混匀，4 $^\circ\text{C}$  保存。

### [4] 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取  $\text{NaCl}$  8.5 g、 $\text{KCl}$  0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.85 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g，在 1000 ml 超纯水中溶解，于高压灭菌器中 121 $^\circ\text{C}$  灭菌 25 min，4  $^\circ\text{C}$  保存。