

293 细胞的大规模培养

293 细胞是腺病毒载体的包装细胞。腺病毒是继逆转录病毒后用于基因治疗研究的热门载体。直接将腺病毒载体导入人体内表达目的基因，治疗恶性肿瘤、心血管疾病或一些遗传疾病已取得可喜进展；利用腺病毒载体在包装细胞 293 中表达分泌性蛋白质，如蛋白酪氨酸激酶 1C 等亦成为生产重组蛋白的一条途径。因此完善 293 细胞的大规模培养技术具有越来越重要的市场意义。哺乳细胞的大规模培养方式有三种：贴壁培养、微载体培养、无血清悬浮培养。这三种方式均可用于 293 细胞的大规模培养。

293 细胞特性

293 细胞是用 5 型腺病毒 75 株系转化，含有 Ad5 E1 区的人胚肾细胞。它是加拿大 McMaster University 的 F.L.Graham 与 J.S.Miley 于 1976 年用 DNA 转染技术构建而成。293 细胞是贴壁依赖型成上皮样细胞，表现出典型的腺病毒转化细胞的表型，细胞允许 Ad5 和其他血清型腺病毒在其上增殖。293 细胞为人亚三倍体细胞系。293 细胞在无 Ca^{2+} 或含 Ca^{2+} 培养基中可同样生长，也可生长在血清浓度降低的培养基中。

转瓶培养

转瓶培养一般用于小量培养到大规模培养的过渡阶段，或作为生物反应器接种细胞准备的一条途径。与传统静止单层培养相比，转瓶具有三大优点：为细胞提供较大的生长表面；轻微的转动可以防止培养液中形成的某些成分对细胞生长可能产生的影响；细胞大部分时间仅覆盖一薄层培养液，有利于气体交换。我们已成功实现 293 细胞的转瓶培养。由于 293 细胞对生长环境的改变较为敏感，细胞容易成团，因此维持稳定的温度、酸碱度和转动速度对细胞正常均匀生长至关重要。

现在使用的转瓶培养系统包括二氧化碳培养箱和转瓶机两部分。293 细胞接种后，维持适当的转速培养。不同的细胞转速略有不同。细胞的均匀分散贴壁情况与培养液温度、瓶子的转动速度和细胞特性有关。在 5-6 天的培养周期中，细胞量可增殖 20 倍。

反应器贴壁培养

此种培养方式中，细胞贴附于固定的表面生长，不因为搅拌而跟随培养液一起流动，因此比较容易更换培养液，不需要特殊的分离细胞和培养液的设备，可以采用灌流培养获得高细胞密度，能有效地获得一种产品；但扩大规模较难，不能直接监控细胞的生长情况，故多用于制备用量较小、价值高的生物药品。

CelliGen、CelliGen PlusTM 和 Bioflo3000 反应器是常用的贴壁培养式生物反应器，用于细胞的贴壁培养时可使用篮式搅拌系统和圆盘状载体。此载体是直径 6 毫米的无纺聚酯纤维圆片，具有很高的表面积与体积比（ $1200\text{cm}^2/\text{g}$ ），有利于获得高细胞密度。篮式搅拌系统和载体培养是目前贴壁细胞培养使用最多的方式，除用于 293 细胞的培养外，还用于杂交瘤细胞培养、Hela 细胞培养、CHO 细胞培养及其它细胞培养。此种方式培养 293 细胞，细胞接种后贴壁快，接种 1 小时后细胞贴壁率可达 98% 以上，采用灌流培养。整个培养周期约 7-10 天，细胞增殖 25-50 倍。

微载体培养

微载体是目前公认的最有发展前途的一种动物细胞大规模培养技术,其兼具悬浮培养和贴壁培养的优点,放大容易。目前微载体培养广泛用于培养各种类型细胞,生产蛋白质产品,如 293 细胞、成肌细胞、Vero 细胞、CHO 细胞。常用商品化微载体有三种: Cytodex?, Cytopore 和 Cytoline。

使用较多的反应器有两种: 贝朗公司的 BIOSTAT?B 反应器,使用双桨叶无气泡通气搅拌系统; NBS 公司的 CelliGen、CelliGen PlusTM 和 Bioflo3000 反应器,使用 Cell-lift 双筛网搅拌系统。两种系统都能实现培养细胞和收获产物的有效分离。

微载体培养 293 细胞,首先要选择合适的微载体类型和搅拌速度。接种细胞可用 1L spinner 微载体培养系统或是其它贴壁培养方式准备,采用灌流培养,培养周期 10-15 天,能达到的细胞密度为 $5-10 \times 10^6/\text{ml}$ 。

无血清悬浮培养

无血清悬浮培养是用已知人源或动物来源的蛋白或激素代替动物血清的一种细胞培养方式,它能减少后期纯化工作,提高产品质量,正逐渐成为动物细胞大规模培养的研究新方向。要实现 293 细胞无血清悬浮培养必须先将贴壁培养 293 改造为悬浮培养 293S 细胞并寻找适合高密度无血清培养的培养液配方。

悬浮培养时,由于缺少血清和蛋白的保护作用,293S 对剪切力的敏感度增加,难以达到高密度培养,导致 293S 产生病毒的数量比贴壁培养低 5-10 倍左右。细胞接种后,灌流培养 7 天,达到细胞密度 $5 \times 10^6/\text{ml}$,增殖 5-10 倍。

结论

不管是哪种培养方式,首要的一点是必须操作规范、防止污染;其次根据需要选择合适的 293 细胞培养方式,对细胞生长状况实行有效的监控,以便获得稳定的蛋白或病毒产物。

细胞培养技术

一、细胞培养基本概念

细胞培养是指从体内组织取出细胞摹拟体内出现环境,在无菌、适当温度及酸碱度和一定营养条件下,使期生长繁殖,并维持其结构和功能的一种培养技术。细胞培养的培养物为单个细胞或细胞群。

在医学遗传学研究中应用最广泛的是外周血淋巴细胞、皮肤或纤维细胞和各种能在体外长期生长的细胞系。外周血淋巴细胞培养具有时间短、技术简便、可重复取材等优点,它在临床染色体分析中使用最广泛。体外培养细胞株可在培养过程中发生自发的或在外界作用下的转化,成为永久细胞系,也可直接建成永久细胞系,永久细胞系能在体外无限制的传代和生长。永久细胞系通常具有非整倍体细胞和各个细胞的核型不完全相同特征。但细胞克隆的细胞系其这一特征可以不明显。

二、细胞培养的环境

细胞在体外培养中所需的条件与体内细胞基本相同。

1、无污染环境

培养环境无毒和无菌是保证细胞生存的首要条件。当细胞放置于体外培养时,与体内相比细胞丢失了对微生物和有毒物的防御能力,一旦被污染或自身代谢物质积累等,可导致细胞死亡。因此在进行培养中,保持细胞生存环境无污染、代谢物及时清除等,是维持细胞生存的基本条件。

2、恒定的温度

维持培养细胞旺盛生长,必须有恒定适宜的温度。人体细胞培养的标准温度为 36.5 ± 0.5 , 偏离这一温度范围,细胞的正常代谢会受到影响,甚至死亡。培养细胞对低温的耐受力较对高温强,温度上升不超过 39 时,细胞代谢与温度成正比;人体细胞在 $39-40$ 1 小时,即能受到一定损伤,但仍有可能恢复;在 $40-41$ 1 小时,细胞会普遍受到损伤,仅小半数有可能恢复; $41-42$ 1 小时,细胞受到严重损伤,大部分细胞死亡,个别细胞仍有恢复可能;当温度在 43 以上 1 小时,细胞全部死亡。

3、气体环境

气体是人体细胞培养生存必需条件之一,所需气体主要有氧气和二氧化碳。氧气参与三羧酸循环,产生供给细胞生长增殖的能量和合成细胞生长所需用的各种成分。开放培养时一般把细胞置于 95%空气加 5%二氧化碳混合气体环境中。

二氧化碳既是细胞代谢产物,也是细胞生长繁殖所需成分,它在细胞培养中的主要作用在于维持培养基的 PH 值。大多数细胞的适宜 PH 为 7.2-7.4, 偏离这一范围对细胞培养将产生有害的影响。但细胞耐酸性比耐碱性大一些,在偏酸环境中更利于细胞生长。有资料显示,原代羊水细胞培养 PH6.8 时最适。

细胞培养液 PH 浓度的调节最常用的为加 NaHCO_3 的方法,因为 NaHCO_3 可供 CO_2 , 但 CO_2 易于逸出,故最适用于封闭培养,而羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)因其对细胞无毒性,也起缓冲作用,有防止 PH 迅速变动的特性而用于开放细胞培养技术中,其最大优点是在开放式培养或细胞观察时能维持较恒定的 PH 值。

4、细胞培养基

培养是既是培养细胞中供给细胞营养和促使细胞生殖增殖的基础物质,也是培养细胞生长和繁殖的生存环境。培养基的种类很多,按其物质状态分为半固体培养基和液体培养基两类;按其来源分为合成培养基和天然培养基。

(1) 合成培养基:合成培养基是根据细胞所需物质的种类和数量严格配制而成的。内含碳水化合物、氨基酸、脂类、无机盐、维生素、微量元素和细胞生长因子等。单独使用细胞虽有生存但不能很好的生长增殖。

(2) 天然培养基：使用最普遍的天然培养基是血清，基本以小牛血清最普遍。血清由于含有多种细胞生长因子、促贴附因子及其多活性物质。与合志培养基合用，能使细胞硕利增殖生长。常见使用最为 5-20%。

三、细胞培养设施和基本条件

1、实验室设计

细胞培养是一种无菌操作技术，要求工作环境和条件必须保证无微生物污染和不受其它有害因素的影响。细胞培养室和设计原则是防止微生物污染和有害因素影响，要求工作环境清洁、空气清新，干燥和无烟尘。细胞培养工作包括：工作液配制、无菌操作（采样）、温育、无菌处理，细胞和用品贮存等。细胞培养室的设计实施原则一般是无菌操作区设在室内较少走动的内侧，常规操作和封闭培养于一室，而洗刷消毒在另一室。

2、常用设施及设备

(1) 超净工作台：也称净化工作台，分为侧流式、直流式和外流式三大类。

(2) 无菌操作间：一般由更衣间、缓冲间和操作间三部分组成。操作间放置净化工作台及二氧化碳培养箱、离心机、倒置显微镜等。缓冲间可放置电冰箱、冷藏器及消毒好的无菌物品等。

(3) 操作间：普通培养箱、离心机、水浴锅、定时钟、普通天平及日常分析处理物品。

(4) 洗刷消毒间：烤箱、消毒锅、蒸馏水处理器及酸缸等。

(5) 分析间：显微镜、计算机及打印机等。

3、培养器皿

细胞培养以玻璃器皿为主，常准备最需是使用最的三倍。器皿应选择透明度好、无毒、中性硬度玻璃制品。常用的玻璃器皿有下面几种。

(1) 液体储存瓶：用于储存各种配制好的培养液、血清等液体，常以 500ml、250ml、100ml 生理盐水瓶或血浆瓶代替。

(2) 培养瓶：根据培养细胞种类要求不同培养瓶的形态各异，用于细胞传代培养的细胞要求瓶壁厚薄均匀，便于细胞贴壁生长和观察，瓶口要大小一致，口径一般不小于 1cm，允许吸管伸入瓶内任何部位，规格有 200ml、100ml、50ml、25ml、10ml 等几种。用于外周血培养的常用 10ml 普通圆瓶。两种培养瓶均要求选用优质玻璃制成。

(3) 培养皿：用于开放式培养及其它用途。分直径 30mm、60mm、120mm 等几种。

(4) 吸管：常用的有长吸管和短吸管两类，长吸管也称刻度吸管。其改良后管上部有球型刻度称改良吸管，刻度吸管用于移动液体。常用 1ml 和 10ml 两种。短吸管也叫滴管，分弯头和直头两种。

(5) 离心管：离心管是细胞培养中使用最广泛的器皿，根据用途不同形态各异，常用于细胞培养的离心管有大腹式尖底离心管和普通尖底离心管两类。前者分别为 50ml、30ml、15ml；后者则多为 10ml 和 5ml。

(6) 其它：如三角烧瓶、烧杯、量筒、漏斗、注射器等。

四、培养细胞形态

体外培养细胞根据它们在培养器皿是否能贴附于支持物上生长特征，可分为贴附型生长和悬浮型生长两大类。贴附型细胞在培养时能贴附在支持物表面生长。如羊水细胞为贴附型细胞，常表现为成纤维型细胞和上皮细胞生长。悬浮型细胞在培养中悬浮生长。

1、成纤维型细胞

在培养中的细胞凡形态与成纤维细胞类似时，皆可称之为成纤维细胞。本型细胞由形态与体内成纤维细胞的形态相似而得名，细胞在支持物表面呈梭形或不规则三角形生长，细胞中央有卵圆形核，胞质向外伸出 2-3 厘米个长短不同的突起，除真正的成纤维细胞外，凡由中胚层间质起源的组织细胞常呈本类形态生长。

2、上皮型细胞

此类型细胞在培养器皿支持物上生长具有扁平不规则多角形特征，细胞中央有圆形核，细胞紧密相连单层膜样生长。起源于内、外胚层细胞如皮肤、表皮衍生物、消化管上皮等组织细胞培养时，皆呈上皮型形态生长。

3、游走型细胞

本型细胞在支持物上散在生长，一般不连成片。细胞质经常伸出伪足或突起，呈活跃的游走或变形运动，速度快且不规则。此型细胞不很稳定，有时亦难和其它型细胞区别。在一定的条件下，由于细胞密度增大联成片后，可呈类似多角型或成纤维细腻包形态。常见于羊水细胞培养的早期。

五、培养细胞形态分析

培养细胞随贴附支持物形状不同而形态各异，最常见的是贴附于平面支持物细胞。在一般光镜下生存中的细胞是均质而透明的，结构不明显。细胞在生长期常有 1-2 个核仁在细胞机能状态不良时，细胞轮廓会增强，反差增大。若胞质中时而出现颗粒、脱滴和腔泡等，表明细胞代谢不良。

六、培养用品的清洗与消毒

目前我国细胞培养器皿主要仍使用能反复使用的玻璃器皿，清洗的主要目的为清除杂质和微生物，使在器皿内不残留任何影响细胞生长的成份。因而在组织细胞培养中清洗和消毒是一项极为重要的环节。

(一) 清洗

在组织细胞培养中，体外细胞对任何有害物质都非常敏感。微生物产品附带杂物，上次细胞残留物及非营养成分的化学物质，均能影响培养细胞的生长。因此对新使用和重新使用的培养器皿都要严格彻底的清洗，且要根据器皿的组成材料不同，选择不同的清洗方法。

1、玻璃器皿的清洗

组织细胞培养中，使用量最大的是玻璃器皿，故工作最最大的是玻璃器皿的清洗。一般玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、浸酸和冲洗四个步骤。清洗后的玻璃器皿仅要求干净透明无油迹，而且不能残留任何物质。

(1) 浸泡：初次使用和培养使用后的玻璃器皿均需先用清水浸泡，以使附着物软化或被溶液掉。新的初次使用的玻璃器皿，在生产及运输过程中，玻璃表面带有大量的干固的灰尘，且玻璃表面常呈碱性及带有一些对细胞有害的物质等。新瓶使用前应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸液（5）浸泡过夜，以中和其中的碱性物质。再次使用的玻璃器皿则常附有大量刚使用过的蛋白质，干固后不易洗掉，故用后要立即浸入水中，且要求完全浸入，不能留有气泡或浮在液面上。

(2) 刷洗：浸泡后的玻璃器皿一般要用毛刷沾洗涤剂刷洗，以除去器皿表面附着较牢的杂质。刷洗要适度，过度会损害器皿表面光泽度。

(3) 浸酸：清洁液是由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水按一定比例配制而成，其处理过程称为浸酸。清洁液对玻璃器皿无腐蚀作用，而其强氧化作用可除掉刷洗不掉的微量杂质。清洁液去污能力很强。是清洗过程中关键的一环。浸泡时器皿要充满清洁液，勿留气泡或器皿露出清洁液面。浸泡时间一般为过夜，不应少于 6 小时。清洁液可根据需要，配制成不同的强度，常用的下列三种：重铬酸钾（g）浓硫酸（ml）蒸馏水（ml）（A）强清洁液 63 1000 200000 B）次强清洗液 120 200 1000 （C）弱清洁液 100 100 100

清洁液配制时应注意安全，须穿戴耐酸手套和围裙，并要保护好面部及身体裸露部分。配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒搅拌，使产生的热量挥发，配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒搅拌，使产生的热量挥发，配制溶液应选择塑料制品。配成后清洁液一般为棕红色。

(4) 冲洗：玻璃器皿在使用后，刷洗及浸泡后都必须用水充分冲洗。使之尽量不留污染或洁液的残迹。冲洗最好用洗涤装置。即省力、效果又好。如用手工操作，则需流水冲洗十次以上，每天水须灌满及倒干净，最好用蒸馏水清洗 3-5 次，晾干备用。

2、胶塞的清洗

细胞培养中所用的橡胶制品主要是瓶塞。新购置的瓶塞带有大量滑石粉及杂质，应先用自来水冲洗，再做常规处理，常规清洗方法是：每次用后立即置入水中浸泡，然后用 2% NaOH 或洗衣粉煮沸 10-20 分钟，以除掉培养中的蛋白质。自来水冲洗后，再用 1% 稀盐酸浸泡 30 分钟或蒸馏水冲洗后再煮沸 10-20 分钟，晾干备用。

3、塑料制品的清洗

塑料自制品现多是采用无毒并已经特殊处理的包装，打开包装即可用，多为一次性物品。必要时用 2% NaOH 浸泡过夜，用自来水充分冲洗，再用 5% 盐酸溶液浸泡 30 分钟，最后用自来水和蒸馏水冲洗干净，晾干备用。

(二) 消毒

细胞培养的最大危险是发生培养物的细菌，真菌和病毒等微生物的污染，污染主要是由于操作者的疏忽而引起，常见的原因有操作间或周围空间的不洁，培养器皿和培养液消毒不合格或不彻底，由于有关培养的每个环节的失误均能导致培养失败，故细胞培养的每个环节都应严格遵守操作常规，防止发生污染。

消毒方法分为三类：(A) 物理灭菌法(紫外线、湿热、过渣等)。(B) 化学灭菌法(各种化学消毒剂)。(C) 抗生素。

(1) 紫外线消毒：用于空气，操作台表面和不能使用其它法进行消毒和培养器皿。紫外线直接照射方便、效果好，经一定的时间照射后，可以消灭空气中大部分细菌，培养室紫外线灯应距地面不超过 2.5 米，且消毒物品不宜相互遮挡，照射不到的地方起不到消毒作用。

紫外线可产生臭氧，污染空气，试剂及培养液都有不良影响，对人皮肤也有伤害，不宜近照射也进行实验操作。

(2) 温热消毒：即高压蒸气消毒，是一种使用最广泛、效果最好的消毒方法。温热消毒时，消毒物品不能装得过满，以防止消毒器内气体阻塞而千百万危险，保证其内气体的流通。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，冷气空气排出后，关闭排气阀门，同时检验安全阀活动自如，继后开始升压，当达到所需压力时，开始记算消毒时间。消毒过程中，操作者不能离开工作岗位，要定时检查压力及安全，防止消毒及表皮意外事件发生。

常用物品消毒压力及时间：

培养液、橡胶制品、10 磅 10 分钟；

布类、玻璃制品、金属器械、18 磅 20 分钟。

上两种是最常见的物理消毒方法。

(3) 化学消毒法：最常见的是 70% 酒精及 1‰ 的新洁而灭，前者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。后者则主要用器械的浸泡及皮肤和操作室壁面的擦拭消毒。化学消毒法操作简单、方便有效。

(4) 抗生素消毒：确切应记成抗生素灭菌，主要用于培养液灭菌或预防培养物污染。

七、绒毛染色体制备

绒毛来源于胚胎的中胚层，最早的初级干绒毛出现于孕三周初，孕 8 周左右是绒毛发育最旺盛时期。目前国内外绒毛取材多选自于 8-9 周。研究资料表明，绒毛取样不影响胚胎的发育及胎盘的功能。但取样的失败可导致胚胎丢失而终止妊娠。

绒毛取样前者首先要检查阴道分泌物以判别阴道的洁净度，防止取样导致宫内感染。其次需

做 B 超检查，一是确定胚胎大小，二是确定胚芽有无心血管搏动，三是确定胚芽在子宫内的位置，用以判别取材时间，是否取材及取样器进宫的角度及深度。

1、实验材料

妇科阴道冲洗物品、绒毛取样器、5ml 注射器、培养皿、小镊子、5ml 离心管、甲酸、柠檬酸钠、冰乙酸、PRMI 1640、秋水仙素、载玻片等。

2、培养液配制

PRMI 1640 10-15ml

秋水仙素 10ug/ml 1ml

3、操作过程

(1) 1%新洁而灭冲洗阴道，用卵圆钳固定子宫颈，根据妇查及 B 超提示选择角度及浓度探性插入绒毛取样器，当有弹性阻挡感且深度符合 B 超所示时，抽出取样器内芯，接上 5ml 注射器，抽出 4-5ml，此时，注射器内可见有血性液体流进；

(2) 取一干净培养皿，内加 PRMI 1640 5ml，内含秋水仙素 0.06ug/ml。慢慢抽出取样器，将所吸出物注入培养皿内，并用 1640 冲洗注射器及取样器，混匀。置培养箱 30-40 分钟；(3) 挑选发育良好的绒毛放入另一小培养皿中，用预温 37 的 0.075M。KCL 与 10% 柠檬酸钠 1:1 混合液漂洗两次。(4) 用眼科小剪剪碎绒毛，再将 2 滴秋碱加入上述漂洗低渗液低渗 30 分钟；(5) 加 3:2 的甲醇冰乙酸固定液 0.2ml，预固定，1000rpm8 分钟，弃上清液；(6) 加新鲜配制的 3:2 固定液 3ml；固定 30 分钟，2000rpm8 分钟，弃上清液；(7) 第二次固定可加 3:1 甲醇冰乙酸固定液 3ml 固定 30 分钟，2000rpm8 分钟，弃上清液；(8) 离心后，加所余体积的 60%冰乙酸，打匀，2 分钟后加等量甲醇，打匀，2000rpm8 分钟，弃上清液。(9) 3ml 3:1 甲冰固定液过夜，冰水制片；(10) 80 考片 2 小时，自然冷却。

(11) G 分带处理，观片。

八、羊水细胞培养

羊水中含有胎儿脱落的上皮细胞，可在体外培养用以分析胎儿染色体核型。目前国内外大都采用腹腔羊膜穿刺术，妊娠 12-30 周的羊水细胞均可培养成功。羊膜腔穿刺取羊水行染色体分析，最佳孕周为 16 周左右。因此时羊水增长快，羊水中细胞较多，细胞培养易于生长，而且不易损伤胎儿。国内多数选择的穿刺时间在妊娠的第 16-30 周。国外现已较多地采用妊娠早期的羊膜穿刺，但需在 B 超下定位及穿刺。羊水量按妊娠时间大致计算 (1ml/w)。资料表明，穿刺病例的妊娠结局、分娩方式、胎儿的出生体重等与未穿刺无明显差异。

1、实验材料

2.5%碘酒、75%酒精、无菌棉签和棉球、镊子、20-22 号无菌腰穿针、吸管、培养瓶、培养液 (PRMI 1640、199、F10、F12)、小牛血清、秋水仙素、KCL、甲醇、冰醋酸、培养皿、盖玻片等。

2、培养液配制

F-12 85%

小牛血清 15%

双抗 100u/ml

小瓶贮藏 4-8

3、操作过程

A (盖玻片培养法)

(1) 采样：选择妊娠 13-14 周妇女，在无菌条件下抽取羊水 5ml，立即注入无菌离心管中；(2) 收集：离心分离细胞，1000rpm10 分钟，去上清，留 0.5ml，轻打混匀；(3) 接种：30mm 培养皿中放盖玻片 1 张，每片滴混匀的细胞液 1-2 滴，置培养箱内培养 30-60 分钟；(4) 培养：取出后从盖玻片外加培养液 2ml，静置培养 48 小时后观察细胞生殖状况并

定时换液，5-10 天后，可见大量成纤维细胞或上皮样细胞生长；(5) 终止培养：当有大量圆形发亮细胞出现时，加秋水仙素 0.02-0.04ug/ml，作用 10-12 小时；(6) 低渗：倒掉培养液，加预温 37 0.075MKCL 溶液 5ml，37 温育 30 分钟，镜下可见胀大的羊水细胞，加 0.5-1ml 3 1 甲醇：冰醋酸固定液预固定；(7) 固定：倒掉低渗液，加 5ml 固定液固定 30 分钟以上，反复 3 次；(8) 干燥：将附有细胞的盖玻片斜放于培养皿中，置 80 烤箱处理 2-3 小时；(9) 胶片：将附有细胞的盖玻片用树脂胶封固于玻片上，正面朝外，小心细胞破坏；

B (常规培养法)

(1) — (2) 相同于盖玻片培养法；(3) 接种：将混匀的羊水细胞种置于 50ml 或 100ml 细胞培养瓶内，平均 10ml 羊水细胞收集的细胞种置一瓶加 5-10ml 混合培养液。(4) 培养：酒精灯火先封口，静置培养 48 小时后观察细胞贴壁及生长情况，5-10 天后可见瓶底面有大量羊水细胞生长；(5) 终止培养：同 A 法；(6) 细胞收集：将培养液倒入一干净离心管中，加 0.025% 的胰蛋白酶 0.5-1ml/瓶，轻轻摇动，使培养瓶底面完全接触消化酶，然后用弯头吸管吹打，待细胞全部脱落后加前培养液终止胰蛋白酶消化。用吸管移细胞悬液于离心管中。1000-2000rpm 10 分钟，弃上清，留细胞沉淀。若一次消化不彻底，可反复消化；(7) 低渗及预固定：加预温 37 KCL 溶液 10ml，37 温育 30 分钟，加 0.5-1ml 新鲜配制的 3 1 甲醇冰乙酸固定液预固定，用气泡吹打细胞使其混匀。(8) 固定：用新鲜配制的 3 2 甲冰固定三次，每次 30 分钟。固定液加入时沿管壁缓慢加入；(9) 制片及干燥：用绒毛制片；(10) 分带处理。

九、人外周血淋巴细胞培养

在正常情况下，人外周血中是没有分裂相的，只有在异常情况下才能发现。植物血球凝集素 (PHA) 是人类淋巴细胞有丝分裂的刺激剂，在 PHA 作用下，原处于 Go 期的淋巴细胞转化为淋巴母细胞，进而进行有丝分裂。利用 PHA 这一特性，淋巴细胞经过含有 HPA 培养液培养，在体外便可获得丰富的含有有丝分裂的生长活跃的细胞群体，终止分裂中期的淋巴细胞，例可得到所需的人体染色体图形。具有用血量少、操作简单等优点。

1、实验材料

2.5% 碘酒、75% 酒精、无菌棉签或棉球、镊子、吸管、培养瓶、培养液 (PRMI 1640、M199)、小牛血清、秋水仙素、KCL、甲醇、冰醋酸、载玻片等。

2、培养液配制

无菌条件下配制培养液，每瓶所含下列试剂：

RPMI 1640 或 199 90%

小牛血清 10%

PHA (自制) 0.1ml 3%

肝素 10u/ml 2%

双抗 100u/ml (选择)

分装于 10ml 培养瓶内，每瓶 5ml 培养液，封口置冷藏柜备用。

3、操作过程

(1) 采样接种：用 2.5% 碘酒、75% 酒精消毒瓶盖，用酒精灯火焰过烤，无菌条件下抽取患者外周血 0.5-1ml，每瓶加 20 滴左右，轻摇均匀，尽量避免培养物与瓶盖接触；(2) 培养：置 36 培养箱中培养 72 小时，每隔 12 小时左右轻遥 1 次，以促进细胞生长增殖；(3) 抑止分裂：收获前 2 小时左右加秋水仙素，最终浓度为 0.02ug/ml 培养液，摇匀后置培养箱中继续培养，以抑止细胞在分裂中期。(4) 终止培养：从培养箱中取出培养瓶，摇匀后移至 10ml 尖底离心管中，尽量收集培养细胞。2000rpm 8 分钟。(5) 低渗处理：弃上清液，加入预温 37 的 0.075MKCL 8ml，迅速打匀，置 37 培养箱或水浴锅中 10-20 分钟；(6) 预固

定：取出低渗中尖底离心管，轻轻加入新配制的 1-2ml 3-2 甲醇：冰乙酸混合液，取相应编号滴管用汽泡轻轻打 2-3 下。800-1000rpm 8-10 分钟；(7) 固定：弃上清液。加入新鲜配制的 3-2 甲醇冰乙酸混合液 10ml，轻打混匀，封口置室温 30 分钟以上。1500-2000rpm 10 分钟，反复 2-3 次；(8) 制片：使用蒸馏水制备冰水片进行滴片。留离心后沉淀细胞，加新鲜配制的固定液，制成细胞悬液，取 1-2 滴滴片，用于轻轻吹开。刻号后清理刻号污物，置 80℃ 烤片 2 小时；(9) 收片：待烤箱自然冷却后，取出烤片，置干净环境中或培养箱中以备用进行显带处理。

十、植物血凝素的制备

植物血凝素也称为植物凝集素 (PHA)，可自制也可购自商品。自制的方法常用生理盐水提取法。

(A) 干品制备法 (1) 选广东鸡子豆 10g，用蒸馏水冲洗，置培养皿内用 75% 酒精一次性浸洗，倒掉酒精留间隙置 37℃。恒温箱内 24-48 小时；(2) 在无菌条件下研碎鸡子豆，加生理盐水 30ml，摇匀后放入 4℃ 冰箱 24 小时，第二天再加生理盐水 70ml，再置 4℃ 冰箱内 24 小时。每 8-12 小时摇荡一次。(也可一次性加 100ml 生理盐水)；(3) 无菌条件下移入 10-50ml 离心管内，3000-4000rpm 30 分钟。在无菌箱内把上清液分装于 10ml 小瓶，置冰箱冷冻层备用；(4) 效价：外周血染色体制备每 100ml 培养基加 PHA 约 2ml。注：若整个过程未能在无菌条件下进行，分装时用 G5 玻砂漏斗除菌即可。

(B) 鲜品制备法：(1) 选择完整无破皮鲜菜豆 20g，用 75% 酒精浸泡 10 分钟；(2) 在净化工作中用无菌盐水或蒸馏水漂洗二次，然后置无菌乳钵中捣成糊状，用 100ml 无菌盐水浸泡封口；(3) 移入 4℃ 冰箱中置 24 小时，中间摇动数次，次日 3000rpm 30 分钟，在无菌情况下分装上清液于 10ml 小瓶内，置冰箱冷冻层备用。(4) 效价：正式使用前先用一定量作效价测定，按效价使用。

十一、组织培养细胞染色体制备

组织细胞用于遗传学分析最常见的是体外培养的细胞株，多为恶性肿瘤细胞株，且呈贴壁生长，仅少数细胞株为悬浮生长。培养细胞有来源易得、细胞分裂率高和染色体标本制出清晰度高等优点。组织细胞染色体制备的关键是掌握好体外细胞的生长动态，只有处在对数生长期的细胞才能出现较高的分裂相，所以秋水仙素处理的时机及量是染色体标本形态及分裂指数的关键。

1、实验材料

培养液 (PRMI 1640、M199、DMEM 等)，小牛血清、0.025% 胰蛋白酶、秋水仙素，刻度离心管，直吸管及弯头吸管，培养瓶或皿、KCL、甲醇、冰乙酸、载玻片。

2、培养液配制

培养液 85-95%

小牛血清 5-15%

双抗 (选择) 100u/ml

3、操作过程

(1) 培养细胞：选择处于指数生长期、用大瓶培养的 80-90% 汇合单层培养细胞；

(2) 终止培养：当有大量圆形发亮细胞出现时，加秋水仙素 0.01-0.03ug/ml 培养混合液，置温箱继续培养 6-10 小时以抑制分裂期细胞停止于分裂中期；(3) 聚集细胞：

(A) 摇动法：

可利用分裂中期细胞变圆与底物附着不牢特点，此时可持培养瓶，左右反复横向水平摇动，可使 90% 的中期分裂细胞从瓶壁脱落；

(B) 消化法：

将培养液倒入离心管内，给培养瓶内加 0.025% 胰蛋白酶液 0.5-1ml/瓶，水平左右摇动，

便培养瓶底壁面完全接触消化酶，稍后用弯头吸管吹打，待细胞完全脱落后，加入 3-5ml 前培养终止消化。用吸管移入装有培养液的离心管内 2000rpm10 分钟。弃上清液，留沉淀细胞；

(4) 低渗处理：给沉淀细胞加顶温的 37 0.075MKCL8ml 左右，用吸管打均匀，在温箱中静置 20-30 分钟；

(5) 预固定：向低渗处理适当的离心管中加新鲜配制的 3 2 甲醇，冰乙醇固定液 1-2ml，用吸管轻松吹打调匀，此措施能起到使细胞表面轻微固定，可防止固定后细胞粘连成块。

(6) 固定：800-1000rpm10 分钟，弃上清液加新鲜配制的 3 2 甲醇冰乙酸固定液 10ml，加入时要沿管壁慢慢加入，后轻轻吹打，封口后室温静置 30 分钟以上，反复三次；

(7) 制片：末次离心后，倒掉上清液，留沉淀细胞，加新鲜配制固定液 0.5ml 左右，混匀后冰片制片，其它同外周血方法。

十二、胸腹水细胞染色体制备

在恶性肿瘤的胸腹水中有大量的分裂期细胞，其中多以非整倍体细胞存在，并含有各种标记染色体。

1、实验材料

2.5%碘精、75%酒精、无菌棉球、镊子 20-22 号无菌腰穿包、50ml 离心管、秋水仙素、KCL、甲醇、冰乙酸、载玻片等。

2、操作过程

(1) 采样：选择有胸或腹水患者，在无菌条件下，轻腹穿刺或于手术取胸或腹水 20-50ml；

(2) 培养：立即加入秋水仙素培养，最终浓度为 0.02-0.04ug/ml 胸腹水，置 37 培养箱内 4-6 小时；

(3) 低渗及后期制作羊水细胞。

十三、染色体制备体会

1、培养基 PH 浓度、小牛血清量及培养箱温度的恒定是培养成功关键；

2、秋水仙素适量、适宜的处理时机和时间，是获得良好、足够分裂相的条件。分裂相的多少和染色体形态及带型处理良好与否均受其影响。3、低渗处理是获得分散良好的分裂相关键步骤，低渗过度或不足都会造成染色体形态不良的结果。在低渗处理时期细胞十分娇嫩，并且表面发粘，低渗细胞混匀时，吹打要适宜，避免细胞破碎及粘团，另外不要将细胞吸到吸管上部及离心管上部，避免细胞丢失。4、固定技术是制备良好分散的染色体的重要步骤。若染色体分数不良，可适当加大冰乙酸含量，其同时有改善由于低渗处理不够或固定不充分所造成的缺陷，但过量会造成染色体形态变化和影响分带结局。染色体形态不良与固定液速度有关，加第 1 次固定液过快或打过快，可造成飘带样染色体；5、固定液每次使用必须新鲜配制，否则将会形成酯类，从而影响固定效果。6、滴片是染色体制备中影响染色体形态的关键一步。首先要载玻片要非常干净，否则会影响染色体的分散和分带效果。其次是滴片的距离、滴加量多少、制片的方式都会影响染色体分期效果。7、烤片：是染色体制备中最后一步技术。烤片的温度、时间与染色体形态和分带有关。不宜温度过高和烤片时间过长。

十四、染色体实验技术分析

染染色体分裂指数低：患者处于非常时期（感染期、放、化疗期）：

培养基营养成分不良；

培养基 PH 偏低或偏高；

PHA 过量或不足；

小牛血清质量不高；

小牛血清数量偏低或过高；

培养温度不稳定；培养箱温度偏低；

秋水仙素处理时间过短；
离心时间或速度不足；
制备过程损失过大。
染色体形态不理想：受检者处于非常时期；
PHA 过量；
小牛血清质量不高；
培养箱温度不恒温；
秋水仙素量不当；
低渗时间不理想；
低渗温度过高；
离心速度过高；

固定液加速过快；

固定混匀手法过重；

吹片技术不良。

染色体形态偏长：培养基 PH 偏酸；

秋水仙素量偏低；

秋水仙素处理时间偏短；

染色体形态偏短：培养基 PH 偏碱；

秋水仙素处理量过量；

秋水仙素处理时间过长。

染色体分带不良：血液状况不良；

培养基营养成分不良；

小牛血清质量不高；

小牛血清数量不当；

培养箱培养温度不良；

秋水仙素处理量过高；

PHA 量过高；

低渗处理时间或温度不良；

胰酶质量不良；

染色液质量不良；

染色技术不良；

分带技术不佳。

染色背景不良： 培养细胞生长不良；

低渗处理技术不良；

离心过程尘染；

分带技术不良；

染色技术不良；

染色液尘染；

载玻片处理不干净； 制片过程尘染；

存片环境不干净。

培养失败： 培养中损失；

血源质量不良；

培养中感染；

小牛血清污染；

培养箱温度失控；

PHA 过期或过量；

秋水仙素失效；

低渗失败；

离心机失误。

标本损失：培养中损失；

制备中损失；

分带中损失；

保存中损失；

十五、染色体分带技术

染色体显带技术是在显示染色体基础上发展起来的技术，其优点是能显现染色体本身更细微的结构，有助于更准确地识别每条染色体及染色体异常疾病。染色体分带技术能适用于各种细胞染色体标本。

染色体显带是沿着整条染色体的长轴，能显现出着色深浅不同、横向走的带型。目前认为染色体显带现象是染色体结构所致。但用特殊方法处理后，再用染料染色，则带型更加清晰，随显带方法不同，显现出的带型的特点也不一样，这说明带的出现与染料的特异结合相关。人类染色体能显现出近 2000 个 G 带，这些带再融合成一般显微镜下可见的 850 条左右的高分辨染色体带型或 350 条带左右的常规带型。

常见的几咱显带方法：

（一）G 带

也称为 G 显带，是最常用的显带方法，具有操作简便、经济及标本能长期保存等优点。

1、Giemsa 原液的配制：

（1）称 3.75gGiemsa 粉置研磨器中，加少许丙三醇研磨，研磨越细越好；

（2）将研细的 Giemsa 加丙三醇移入 500ml 棕色瓶内，丙三醇的总量为 250ml，用一定量甲醇洗干净研磨器。

（3）摇匀，置 60℃ 水浴锅 24 小时或 37℃ 温箱 72 小时，经常摇动。

（4）取出冷却后，加甲醇总量至 250ml 混匀，密封棕色瓶备用。贮藏时间越长，染色效果越好。

2、实验材料：

中期染色体标本；

0.9%氯化钠注射水；

3% tris 液体；

0.25% 胰蛋白酶；

Giemsa 染色液；

蒸馏水；

水浴锅；

立式染缸；

定时器或时针；

温度计；

镊子及纱布；

刻字笔；

3、操作程序：

(1) 消化液配制：取 0.9% 氯化钠注射水 100ml，加 0.25% 胰蛋白酶 1ml，制成 0.025% 胰蛋白酶盐水消化液，加 4-5 滴 tris 液调 PH6.8 左右，移消化液于立式染色缸并置 37℃ 水浴锅中备用；

(2) 染液配制：取立式染缸，加蒸馏水 500ml，加 3 滴 tris 液调 PH 并加入 Giemsa 染液 1ml 左右，用吸管调匀备用； (3) 漂洗液：取立式染缸一个，内加蒸馏水备用；

(4) 试消化：待消化液温度在 37℃ 左右时，取同批标本较多者标本 1 张，分二节或三节进行消化，每节相差十五秒左右，从 45 秒或 60 秒开始增减。取出后先在纱布或吸水纸上直立除去带出胰蛋白酶，后置蒸馏水染缸内漂洗，取出后，标本斜面朝上，刮去染色缸内染液上浮膜，沿槽插入，每分钟移动 1 次，染色 3-5 分钟。

(5) 洗片：从染色缸中取出标本玻片，自来水冲洗，取刻编号面朝上用纱布干净玻片背部染色，稍干，高倍镜下观片，确定分带与染色时间。

(6) 分带：取 4 张待分带标本玻片，细胞面朝左侧按顺序插入 37℃ 的消化液中，消化时间较试消化选择时间延长 5-10 秒钟，取出每片间隔时间约 10 秒钟左右。

(7) 消化及染色调整：每次消化完一批标本后，需加入配好的消化液 25ml 于消化缸中，下次消化时间不变。同样，每次染色一批标本后加 Giemsa 染色液 2-3 滴，调匀，每次染色时间不变；

(8) Giemsa 染色调整：若 Giemsa 染色标本偏红，说明染色液偏酸，可加 tris 数滴调蓝，若 Giemsa 染色标本偏蓝则说明 tris 加多了；

(9) 保存：将分好带的及观察中的标本及时收集于玻片盒内保存，防止细胞涂面灰尘污染及擦损。

注意：Giemsa 消化染色过程中，有两个重要的环节，一是胰酶消化环节，消化不足带不出现，消化过度染色体变得膨胀和不着色，必须把握好胰酶浓度、消化时间和消化温度；二是预处理或老化环节，对消化和带型清晰度有很大影响，其中 80℃ 2 小时热处理，是简便易行和效果较好的办法。

(二) 姐妹染色单体分化染色

姐妹染色单体差别染色可使中期染色体显示深浅不同的两条单体，能借以观察姐妹染色单体互换 (SCE) 现象。SCE 是两条染色单体在 DNA 合成中核苷酸序列发生互换而表现出来一种现象。即是细胞分裂是 DNA 同源重组的结果。SCE 既是一种无害的变化 (有生理波动)，也可受射线、致突和致癌物三因素等作用而升高。SCE 一定成度反映细胞的损伤与修复状态。

1、原理：

在细胞培养过程中，加入一定的 5-溴脱氧尿苷 (BudR)，当细胞在 DNA 复制过程时，BudR 能作为核苷酸的前体取代胸腺嘧啶而被掺入到新合 DNA 中。因此，当细胞处于第二个分裂周期时，同一染色体的两条姐妹染色单体，一条由双股都含有 BudR 的 DNA 链构成，而另一条为单股含有 BudR 的 DNA 链。在结构上双股含 BudR 的 DNA 螺旋化程度较低，故对染色剂亲和力低，在用 Giemsa 染色时其单体着色浅，只有单股含 BudR 的 DNA 链组成的单体则着色深而形成差别着色。

2、BudR 贮存液的配制：

BudR 5mg (先用 0.5ml 1N NaOH 溶解)

然后加蒸馏水至 5ml

即成 1000ug/ml 的贮存液，因 BudR 遇光会发生分解，贮存液需置棕色瓶并黑纸封瓶避光冰冻保存。

3、实验材料：

所检培养细胞；

BudR 贮存液；

2×SSC 液；

常规染色体制片所需物品；

水浴锅；

20W 紫外灯一个；

培养皿；

镜头纸；

4、操作程序

(1) BudR 掺入：细胞培养 24 小时后于培养液中加入 BudR，最终浓度 5-15mg/ml，避光条件下继续培养。

(2) 终止培养：待细胞经历两个细胞周期（48 小时），培养终止前 3 小时加秋水仙素，秋水仙素终浓度为 0.02ug/ml 培养液；

(3) 常规制片及烤片；

(4) 紫外灯照射：取标本玻片置于大号培养皿内，正面朝上，上覆盖镜头纸，从玻片外镜头纸边沿加 2 × SSC 液致使全镜头纸浸湿，移入 50-60℃ 水浴锅内，紫外线灯距离 5cm，照射 30-40 分钟；

(5) 染色：取出照射后标本，蒸馏水冲洗，置 PH6.8 的 2%Giemsa 染色 15 分钟；

(6) 洗片及存片：同 G 带片

注意：BudR 是一种强突变剂，使用浓度不宜过高，否则会产生细胞毒性作用。

(三) 染色体脆性部位 (fra)

脆性位点也称危性部位，是在一定的培养条件下人类染色体上某些特异位点非随机地表现出的裂隙和断裂。脆性部位分为普通型和罕见型两大类。

1、实验材料

(1) 常规外周血所用物品。

(2) 培养基是用不含叶酸的 MEM-Fra 培养基或低叶酸的 CT199 培养基。

2、培养液配制

MEM-Fra 90-95%

小牛血清 5-10%

双抗 100u/ml

PH 调至 7.5 左右

3、操作程序

与制备外周血的染色体方法相同。

注：脆性 X 综合症：(FraX)

这种染色体改变是在 1969 年被发现，1977 年被定位于 Xq27、记录为 fra(X)(q)，并命名为脆性部位。X 连锁智力低下 (MR) 与 fra(X)(q27) 密切相关。FraX 的发生率占新生儿的 1/2500；占 X 连锁 MR 病 1/2-1/3；占男性 MR 的 1-2%；其发生率仅次于先天愚型。

第二章 细胞培养

第一节 细胞培养基本技术

一、免疫细胞分离技术

1、淋巴细胞的分离

取肝素抗凝血 1ml 加 Hanks 液 1ml 稀释后,沿管壁徐徐滴流叠加盛有 2ml 淋巴细胞分离液的试管内(注意勿与分离液混合,然后 2000r/min 水平离心 20min,管内分为 4 层,自上而下依次为血浆,单个核细胞,颗粒白细胞、红细胞(图 2—1)。用毛细管伸至单个核细胞层中(位于细胞分离液与血浆的界面上),沿管壁轻轻吸出全部细胞。然后用 Hanks 液洗两次,每次 2000r/min 离心 10min,最后用 RPMI 1640 培养液将细胞配成 $2 \times 10^6 / \text{ml}$ 的细胞悬液备用。

2、T 细胞及 B 细胞的分离

将淋巴细胞悬液通过尼龙棉柱,B 细胞粘附于尼龙棉上,T 细胞则不粘附,先用 RPMI 1640 培养基洗脱尼龙棉柱,流下的细胞悬液含有丰富的 T 细胞。然后用力反复挤压尼龙柱、挤出粘附在尼龙棉上的 B 细胞,并用少量的 RPMI 1640 培养基洗脱,此细胞悬液含有丰富的 B 细胞。尼龙柱(塑料管)的长短和尼龙棉的多少,视分离细胞的多少而定。

3、CD4 细胞及 CD8 细胞的分离

(1) CD4 细胞的分离:将一定量的 T 细胞悬液通过一根 Sephadex—10 柱,然后用少量的 RPMI 1640 培养基洗涤,收获的细胞悬液约含 85% 的 CD4 细胞。

(2) CD8 细胞分离:用 Tris 缓冲液稀释羊抗鼠 IgG(浓度为 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$)包被一平皿表面,然后放置 4 过夜,没有包被上的抗体用 PBS 洗净。然后将已标记有抗 CD8 单克隆抗体的 T 细胞(细胞浓度为 $1 \times 10^7 / \text{ml}$)3ml 加入上述的平皿内,4 放置 2 小时,用 PBS 轻轻洗净未粘附的细胞,然后用毛细管加入 10ml PBS 吹打。收集的脱落细胞经洗涤后悬浮在 RPMI 1640 培养基中备用。CD4 细胞亦可用此法分离。

4、单核巨噬细胞的分离

单核巨噬细胞有粘附塑料或玻璃表面的特性,而淋巴细胞则无此特性,借此可将这两类细胞分开,其方法简述如下。将待分离的细胞悬液(如实验动物的腹腔液)加入适当大小的塑料或玻璃平皿内,置于 37°C CO_2 温箱内温育 1 小时,然后用 RPMI 1640 培养基轻轻漂洗平皿表面,去除非粘附细胞,再将粘附有细胞的平皿表面用上述培养基轻轻洗刷,收集粘附的单核巨噬细胞。如果要获得纯度较高的单核巨噬细胞,可重复上述过程。

二、肿瘤细胞株的传代培养

传代细胞是指来自人或动物的肿瘤组织或正常组织的细胞,其染色体组型发展为非整倍体或二倍体低于 75%,这种非整倍体细胞在体外具有无限传代的生命力,通常具有异种移植的能力和较广泛的病毒敏感性。传代细胞的特性是:具恒定繁殖特性,少数细胞即有繁殖能力,在琼脂内能形成克隆;有的为贴壁生长,有的悬浮生长。染色体组型为异倍体,大多数人源细胞染色体为 60 - 70 条左右。保留种属特异性,但组织分化性与脏器特性均消失。具致癌性。由于传代细胞繁殖迅速,易获取、易保存,已为各实验室广泛采用。

1、HeLa 细胞的传代培养

试剂与仪器

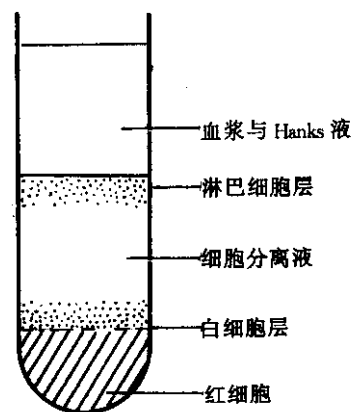


图 2 - 1 淋巴细胞分离示意图

HeLa 细胞。

Hanks 液, 0.25%胰蛋白酶, 0.02%EDTA, 生长液, 青、链霉素(PS), 5.6% NaHCO₃

小三角烧瓶, 培养瓶, 无菌吸液管(5ml 及 1ml)、毛滴管, 废液瓶等。

方法与步骤

(1) 选生长良好的 HeLa 细胞一瓶, 轻轻摇动培养瓶数次, 悬浮起浮着在细胞表面的碎片, 然后连同生长液一起倒出, 用 Hanks 液洗一次。

(2) 从无细胞面侧加入 0.25%胰蛋白酶液或胰蛋白酶—EDTA 消化液 4—5ml, 翻转培养瓶, 使消化液浸没细胞 1min 左右。

(3) 翻转培养瓶, 放置 5—10min, 为促进细胞的消化, 可以加入 37℃ 预热的消化液, 或在细胞面向上时, 用手掌贴着细胞面的瓶外壁, 待肉眼观察细胞面出现布纹孔状为止。

(4) 倒出消化液, 如系 EDTA 消化, 需沿细胞层的对面加 Hanks 液 4.5ml 洗涤, 洗涤时轻轻转动培养瓶, 让液体在瓶内慢慢流动, 以洗掉消化液; 如系胰蛋白酶消化, 倒掉胰酶后可不洗涤。

(5) 沿细胞面加入适量新配制的生长液, 洗下细胞, 并用吸管吹打数次, 使细胞分散开, 按 1:2 或 1:3 分配传代培养。

(6) 37℃ 培养, 接种后 30min 左右可贴壁, 48 小时可换生长液, 一般 3—4 天可形成单层, 形成单层后再换维持液供试验用。

[附]

(1) 生长液:

MEM 液 63%, 乳蛋白水解物 20%

小牛血清 15% 双抗(P、S)1%

用 5.6% NaHCO₃ 溶液调整 pH 至 7.2—7.4

199 液 70% 乳蛋白水解物 18%

小牛血清 10% 双抗(P、S) 1%

用 5.6%NaHCO₃ 溶液调 pH 至 7.2 - 7.4。

1640 液 88% 小牛血清 10%

双抗(P、S) 1% 用 5.6%NaHCO₃ 溶液调 pH 至 7.2 - 7.4

(2) 维持液

1640 液 96% 小牛血清 2%

双抗(P、S) 1% 用 5.6%NaHCO₃ 溶液调 pH 至 7.2 - 7.4

2、人类白血病细胞(K₅₆₂)的传代培养

试剂与仪器

K₅₆₂ 细胞。

RPMI 1640 生长液。

培养瓶、无菌吸液管(5ml 及 1ml)、废液瓶等。

方法与步骤

(1) 选生长良好的 K₅₆₂ 细胞一瓶, 轻轻加入等量的生长液。

(2) 用无菌吸液管轻轻吹打, 使 K₅₆₂ 细胞均匀悬浮, 然后吸出一半的细胞悬液加入另一个培养瓶中。

(3) 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 24—48h。

(4) 如果细胞比较浓, 可按 1:3 分配传代培养。

三、细胞的计数、分装与培养

1、细胞计数

细胞计数对于决定植入的细胞浓度和数量以及了解细胞存活率和增殖度都是极为重要的。

$$\text{细胞浓度} = \frac{4 \text{ 大方格内活细胞数}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数}(10) = \text{细胞数/ml};$$

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{活细胞数}}{\text{活细胞数} + \text{死细胞数}} \times 100\%$$

首先取待测的细胞悬液 0.1ml 加 D—Hanks 液 0.8ml 及 0.3% 台盼蓝 0.1ml (死细胞着色), 混合后滴入血球计数盘内, 按白细胞计数法, 于低倍镜下计数 4 角的 4 个大方格内的活细胞(透明未着色)总数, 然后用下式计数:

在计数过程中, 对大方格的边缘压线细胞应按数上不数下, 数左不数右的原则进行计数。计数时, 二次重复计算误差不应超过 10%。

2、细胞的分装与培养

根据细胞计数, 用生长液将细胞悬液稀释成 $(3-5) \times 10^5$ 个 / ml, 每个培养皿内分装一定量。一般接种细胞数应视细胞种类不同而定, 如类上皮细胞浓度应为 $(1-3) \times 10^5$ / ml, 成纤维细胞应倍量 $[(2-6) \times 10^5$ / ml。若为胚胎组织细胞, 细胞数量可低些, 而成体组织细胞数量则应高些; 细胞活力好的接种数可少些, 年老组织接种的量就应多些。如对制备细胞的成活率把握不大, 可先取少量分装试培养, 次日抽样检查。如细胞成活, 细胞贴壁, 即可大量分装培养; 如细胞不贴壁, 则将制备的细胞弃掉需重新制备。一般通过细胞活性检测或视制备中的细胞性状等, 对接种的成功率应心中有数, 故实际中少量试装培养可省略。

37Y 孵箱静置培养, 于 2—3 天后换一次生长液, 类上皮细胞约在 5-7 天可长成单层细胞, 成纤维细胞则以 3-4 天或 5-7 天为宜, 以供使用。已铺满瓶皿底面的单层细胞, 如继续培养则易老化, 甚至脱落。感染病毒等影响特异性 CPE 的判断, 因此成片细胞不能当天使用, 应换成维持液(不含或仅含 2% 以下血清的培基), 以后每隔 5—7 天换维持液一次, 一般可维持 1—3 周, 用这种维持细胞进行试验研究。

这种长成单层的原代细胞可进行传代培养用细胞分散剂(胰酶、EDTA 或胰酶 / EDTA 等)处理, 使细胞从培养皿上脱离, 加生长液充分吹打, 制成单个细胞悬液分装。加入生长液的量可按原量的 2 倍, 即一瓶传成二瓶, 置 37 培养 3-5 天可形成单层, 成片后换维持液即可进行试验。

四、细胞的冻存、复苏与运输

第二节 树突状细胞的体外制备

树突状细胞(dendritic cell, DC) 是一类具有树枝状突起的抗原呈递细胞, 其分布广泛, 由骨髓中的髓性多能干细胞发育而成, 在免疫应答过程中至关重要。它是原发性混合淋巴细胞反应中的主要刺激细胞, 可激活 Th 细胞发生增殖反应, 而且还能刺激产生 TC 细胞。树突状细胞呈递抗原给 T 细胞提供稳定的微环境。

基本原理

本文应用细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 使血液中单核细胞分化成树突状细胞, 并用 IFN- 促进树突状细胞的成熟。

试剂和材料

新鲜的外周(肝素)抗凝血液

淋巴细胞分离液。无钙镁 Hanks(CMF-Hanks)液

制剂: 人重组 GM-CSF(hrGM-CSF)。

hrIL-4 hr IFN- 。

培养液:

(1) RPMI 1640 全培养基: RPMI 1640+10% 胎牛血清(FCS、热灭活)+2mmol /LL-谷氨酰胺+100IU/ml 青霉素+100 μg/ml 链霉素+1g/L 非必需氨基酸+1 mmol /L 丙酮酸钠+ 5×10^5 mol /L 2 巯基乙醇。

(2) RPMI 1640/IL-4/GM-CSF: 即 RPMI 全培养基+IL-4(40ng/ml)+GM-CSF(50ng/ml)。

(3) RPMI 1640/IFN- : 即 RPMI 全培养基+ IFN- (1-10ng/ml)。

器皿及仪器

培养瓶(25 ml 和 75 ml) CO₂ 孵箱、光学显微镜、血细胞计数器、垂直气流超净台、离心机

等。

实验操作

- 1、置备单核细胞，方法参见第一章之第三节。
- 2、将单核细胞培养基在含 IL-4 和 GM-CSF 的 RPMI 1640 培养基中，细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，置 5% CO_2 孵箱中，37 孵育 3 天。
- 3、培养基第 3 天换液，轻轻吸去原培养液，加入等量含有 IL-4 和 GM-CSF 的新鲜 1640 培氧液，继续置 CO_2 孵箱中培养。
- 4、促树突状细胞成熟：单核细胞经与 IL-4 和 GM-CSF 的共同孵育，7 天左右使其分化成树突状细胞，但并未成熟。此时轻轻吸去含有 IL-4 和 GM-CSF 的 1640 培养液，更换等量的含有 IFN- γ 的 RPMI 1640 培养液，继续置 5% CO_2 孵箱中，37 培养，至第 9 天时可获得成熟的树突状细胞。

质控与提示

- 1、细胞活性：用胎盼蓝拒染法检测，至少应有 90% 的细胞具有活性。
- 2、细胞分化能力检测：单核细胞开始培养时，细胞贴附于塑料培养瓶壁上，用抗 CD14 荧光抗体标记检测，细胞纯度均应为 90% - 100%，当用 IL-4 和 GM-CSF 孵育 7 天和改用 IFN- γ 孵育至第 9 天时，单核细胞分化为树突状细胞并不断趋向成熟，此时细胞不再贴壁生长，也不再表达 CD14 抗原；但能高水平表达 MHC- II 类抗原和 CD1 抗原。
- 3、许多种类的诱导剂都可用于人脊髓细胞转化成树突状细胞。
- 4、单核细胞，如来源于骨髓的 $\text{CD}34^+$ 细胞或来源于脐血的 $\text{CD}34^+$ 细胞等不同的始动细胞，均可用于树突状细胞的分化培养。
- 5、此项技术基于单核细胞贴壁而设计，也可用塑料培养袋培养，防止单核细胞的贴壁，但分离方法要改变为沉降法。

第三节 LAK 细胞的培养

LAK(Lymphokine activated killer cell)细胞是用细胞因子(如 IL-2、IL-12 等)活化的杀伤细胞。即采用自体或同种异体外周血淋巴细胞，在体外经细胞因子活化 3.5 天，增强其广谱抗肿瘤作用的功能，并使数量大幅扩增，成为 LAK 细胞，可用于肿瘤的治疗。

基本原理

应用人重组 IL-2 (hr12 等)于体外活化和扩增外周血淋巴细胞，使其成为经细胞因子活化的杀伤(LAK 细胞)。LAK 细胞呈现高度的 MHC 限制的细胞毒作用。

试剂和材料

新鲜的外周(肝素)抗凝血(或胎肝、胎脾等)。

淋巴细胞分离液、CMF-Hanks 液。

培养基

- 1、RPMI 1640 培养基：(RPMI + 10mmol /LHEPES + 2mmol /L 谷氨酰胺 + 庆大霉素 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 2、LAK 培养基：RPMI 1640 培养液 + 10% 人 AB 型血清 + IL-2 1000 μml 。
- 3、X-VIVO 15 培氧液。

器皿与仪器。6 孔平底组织培养板 75cm² 培养瓶、 CO_2 孵箱。

实验操作

- 1、外周血单个细胞(PBMC)的制备：取病人自体或 O 型供血者肝素抗凝血 40ml (病人或供血者，最好经 3 天 IL-2 的体内诱导后采血)，加等量 CMF-Hanks 液稀释，用淋巴细胞分离液梯度离心 ($\times 2000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min)，从分离液界面吸取淋巴细胞，即 PBMC。(参见第一章第一节)。
- 2、用 CMF-Hanks 液或 PBSPBMC2 次，用 LAK 培氧基 (RPMI 1640 培氧液 + 10% AB 型血清 + 1000 μml IL-2) 或用含有 1000 μml IL-2 的 X-VIVO 15 培氧液竟 PBMC 细胞浓度调至 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，

竟细胞悬液移至 6 孔平板培养板内，置 5%CO₂ 孵箱，37℃ 培养 4 - 5 天。

- 3、将增殖后的细胞悬液以 280Kg、离心 5min，收集上清液，冻存于 -20℃ 待用（用于 TIL 细胞培养）。
- 4、用 RPMI 1640 培氧液或 X-VIVO15 培氧液洗离心的细胞 2 次。
- 5、经细胞计数，用输液用生理盐水重新悬浮细胞，调整细胞总数达 5×10^8 - 1×10^9 回输给病人。同时用形态学及功能分析等方法检测细胞活性，包括 FACS 扫描分析、CTL 活性与 NK 活性，检测等。

[质控与提示]

- 1、LAK 细胞是从功能上而不是形态上定义的。这些细胞可表达多种表型，包括别激活的 NK 细胞（CD56⁺、CD3⁻、CD25⁺）和细胞毒 T（CTL）淋巴细胞（CD3⁺、CD8⁺），而且 CTL 细胞也长表达 CD56⁺ 标志，这些细胞对 NK 抵抗性靶细胞（如 RaJi）也具有细胞毒性。
- 2、制备 LAK 细胞时，可用 AIM-V 培氧液或加有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 代替 X-VIVO15 培氧液。当用于治疗时禁用牛血清培养 LAK 细胞。

第四节 TIL 细胞的培养

肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL）是从手术切除的肿瘤组织或转移的淋巴结中分离的淋巴细胞，经细胞因子（如 IL - 2）诱导活化，经大量增殖后回输给原病人。TIL 细胞是一种较 LAK 细胞杀瘤效果好、特异性高，而扩增时对 IL - 2 的作用浓度要求更低的肿瘤杀伤细胞。

试剂和材料

手术切除的肿瘤组织

淋巴细胞分离液（100%及用 1640 配制 75%浓度）

培养液：RPMI 1640 培养液 + 10%AB 型血清 + IL - 2（200u/ml）或 X - VIVO15 培养液

消化液：IV 型胶原酶（230u/g）、I 型 DNA 酶 3600u、V 型透明质酸酶（1500u/g）

器皿与仪器：75cm² 培养瓶，15ml 聚丙烯试管，手术刀、剪、镊，CO₂ 孵箱，三角烧瓶，磁力搅拌器等

实验操作

1. 在无菌条件下将切除新鲜瘤体组织去除坏死部分与结缔组织，用 RPMI 1640 培养液冲洗干净，移至无菌平皿内用手术剪将肿瘤组织剪碎至 1 - 2mm³ 小块，置于 3600u DNA 酶、50μg 胶原酶和 125u 透明质酸酶的 RPMI 1640 培养液 40ml 中，混匀并移至带有磁棒的无菌三角烧瓶内，于 37℃ 恒温的磁力搅拌器上搅拌 1 - 2 小时。

2. 用 200 目孔径的不锈钢滤网将酶消化后的细胞悬液过滤，以除去未消化好的肿瘤组织块。经 1500r/min 收集单个细胞，用 RPMI 1640 或 X - VIVO15 培养液洗细胞 2 次，将细胞再悬浮。

3. 梯度离心分离 TIL 细胞：如图 2 - 2 所示，于无菌离心管内分层放入 100%及 75%的淋巴细胞分离液，其上再沿管壁轻轻加入细胞悬液，经 2000r/min 离心 20min，收集 100%分离液界面上的细胞为富含 TIL 细胞的悬液（75%的界面上是肿瘤细胞），再用 RPMI 1640 或 X - VIVO15 培养液将 TIL 细胞洗 2 次，以除去细胞分离液。

4. 将洗过 2 次的 TIL 细胞用含 10%AB 型血清、20%LAK 细胞培养上清液及 200u/ml IL - 2 的 RPMI 1640 培养液再悬浮。（或用 20%LAK 细胞培养上清液及 200u/ml IL - 2 的 X - VIVO15 培养液代替 RPMI 1640 培养液），细胞浓度调至 $3 - 5 \times 10^5$ / ml，分装于 75cm² 培养瓶中，置 5%CO₂ 孵箱中 37℃ 培养。约每周换液 1 - 2 次，培养 15 - 20 天左右可回输给原病人。TIL 细胞最多可培养 3 个月。

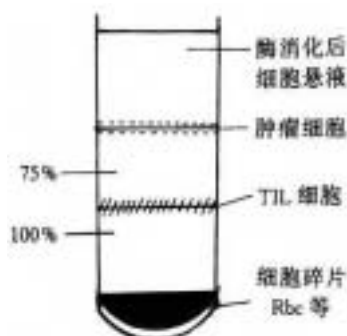


图 2 - 2 梯度离心

质控与提示

1. TIL 细胞在低浓度 (50u/ml) 或高浓度 (1000u/ml) 的 IL-2 作用下才能扩增, 而 LAK 细胞只能在高浓度 (1000u/ml) IL-2 下才能扩增。

2. 来源于黑色素瘤及肾细胞癌组织中的 TIL 细胞, 扩增培养的成功率在 70%。扩增失败的原因常由于肿瘤标本的大部分已坏死或浸润淋巴细胞数量太少之故。

3. 若加入饲养层细胞 (feeder cell), 如用 EB 病毒感染的同种异体 B 淋巴细胞 (B-EBV) 作为饲养细胞, 可加快 TIL 的扩增速度, 但此技术仅限于研究用。为增强 TIL 杀伤自身肿瘤细胞的活性, 有些研究人员在培养 TIL 细胞的环境中加入自体肿瘤细胞。

第五节 T 细胞克隆的制备

细胞克隆, 是将一个单细胞从细胞群中分离出来单独培养, 使之重新繁衍成一个新的单一细胞群的培养技术。未经克隆化的细胞具有异质性, 经过克隆得到的是均一细胞集团。这里仅介绍 T 细胞与 NK 细胞的克隆方法。

基本原理

用有限稀释克隆形成法制备 T 细胞克隆时, 并非依赖细胞 的特性, 而是将 T 细胞在细胞培养板上稀释到统计学的浓度, 即从理论上达到每孔 1 个细胞, 其中加入 IL-2 和 PHA 可增强细胞的生长, 而加入的同种异体 PBMC 作为饲养细胞, 在这种体系中, 单个 T 细胞可增殖生长成细胞集团, 即 T 细胞克隆。

试剂和材料

提纯 T 细胞 (参见第一章之第六节)

饲养细胞 (以 50GY 射线照射): 从两个不同供者获得的同种异体 PBMC (参见第一章之第一节) 从理论上认为两者的每一演变均不同。

培养基: RPMI 1640 培养液 (RPMI 1640 液 + 1mmol/L 丙酮酸钠 + 2mmol/L 谷氨酰胺 + 100u/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素) 再加入热灭活的 10% 的 AB 型血清。

按说明书所述, 将 PHA-A 溶于双蒸水中。

含有 10^4 u/ml hrIL-2 的 PBS 液中加入 1% 牛血清白蛋白 (BSA)。

器皿、仪器: 96 孔 U 型低细胞培养板及 24 孔细胞培养板, 垂直气流超净台, CO₂ 孵箱, 倒置显微镜等。

实验操作

1. 培养板的准备

1) 应用典型的有限稀释克隆形成法, 以 0.5 个/孔、1 个/孔、5 个/孔等三种不同细胞浓度准备三块 96 孔 U 型培养板, 以及半块为 10 个/孔浓度的 96 孔培养板。

2) 准备含有 5×10^5 /ml 饲养细胞 (经 射线照射) 的 RPMI 1640 培养液, 并加入 20u/ml 的 IL-2 和 1μg/ml PHA-A。

3) 在 3 块半 96 孔板上, 每孔均加入 100μl 饲养细胞 (50000 个)。

4) 准备稀释 T 细胞的培养

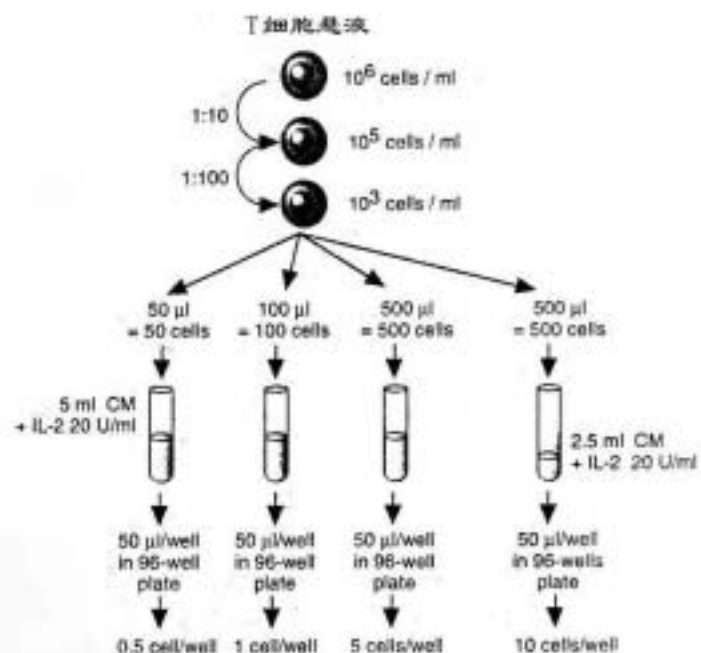


图 2-3 T 细胞有限稀释克隆法操作

液 + 20u/ml 的 IL - 2 , T 细胞始用浓度为 10^6 / ml , 将其稀释为 10^5 / ml 和 10^3 / ml (即稀释液 C) (图 2 - 3)

5) 如图 2 - 3 所示, 准备 3 支 15ml 试管, 内含 5ml 细胞培养液 (CM) 加 20u/ml IL - 2 , 将 4 支试管分别稀释并接种 96 孔板, 步骤如下:

(1) 第 1 管加 50 μ l 稀释液 C, 相当 50 个细胞, 混匀后加在 96 孔板上, 50 μ l / 孔, 此板为 0.5 细胞 / 孔。

(2) 第 2 管加 100 μ l 稀释液 C, 相当 100 个细胞, 混匀后加在 96 孔板上, 50 μ l / 孔, 此板为 1 细胞 / 孔。

(3) 第 3、4 管各加 500 μ l 稀释液 C, 相当 500 个细胞, 第 3 管为 500 细胞 / 5ml CM, , 混匀后加在 96 孔板上, 50 μ l / 孔, 此板为 5 细胞 / 孔; 第 4 管为 500 细胞 / 2.5ml CM, , 混匀后仅够加半个板, 50 μ l / 孔, 此板为 10 个细胞 / 孔。

4 块 96 孔板上有 50 μ l 不同浓度 T 细胞悬液加到含有 100 μ l 饲养细胞的各孔中 (IL - 2 的终浓度应为 20u/ml)。

2. T 细胞克隆培养

1) 如图 2 - 4 所示, 每隔 2 - 3 天吸弃 50 μ l 培养上清液, 加入 50 μ l 含有 IL - 2 的新鲜培养液, 使其终浓度达 20u/ml; 每隔 10 - 15 天吸弃 50 μ l 培养上清液, 加入 50 μ l 含有新鲜饲养细胞 (50000 / 孔) IL - 2 (终浓度达 20u/ml) 和 PHA - A (终浓度达 1 μ g/ml) 的培养液。

2) 经 21 - 25 天后出现克隆细胞生长孔, 首先在 10 细胞 / 孔的板上出现, 当在 1 细胞 / 孔的板上出现克隆生长时, 即可将 5 细胞 / 孔和 10 细胞 / 孔的两块板丢弃。

3) 当 0.5 细胞 / 孔和 1 细胞 / 孔两板上长出的细胞克隆变大时, 将该孔的 100 μ l 培养液悬浮混匀, 分装于 96 孔板 2 个孔内, 50 μ l / 孔, 而且每孔已预先加有上述饲养细胞 (50000 / 孔)。

4) 随着细胞的继续生长, 用同法可将同一克隆细胞分装扩充为 4 孔, 当分装成 8 孔时, 可汇总这 8 孔的细胞转移至 24 孔板的 1 孔内。

5) T 细胞克隆可在如此条件下维持其生长, 即每隔 2 - 3 天更换含有 IL - 2 (20u/ml) 的新鲜培养液, 每隔 10 - 15 天更换含有新鲜饲养细胞、IL - 2 (20u/ml) 和 PHA (1 μ g/ml) 的培养液, 其中加入饲养细胞的比率应为 T 细胞克隆细胞数 $0.5 - 1 \times 10^6$ 细胞需 10^6 饲养细胞。

质控与提示

1. 细胞克隆的性能可用抗 TCRV 片段的抗体在流式细胞仪上进行检测, 或用分子生物学方法 (如 RT - PCR) 去检测 TCR - V 转录产物。

2. 最好在一检出阳性克隆时就开始进行亚克隆。

3. 某些 T 淋巴细胞亚群不能在这一系统 (如饲养细胞 + PHA 环境) 中增殖, 但此系统对获得克隆的总体要比接种细胞的数量更为有效。

4. 必须使饲养细胞受到充分照射, 以保证长出的细胞是 T 细胞克隆, 而不是饲养细胞。 (可用流式细胞仪、分子生物学方法或 HLA 分型等检测)

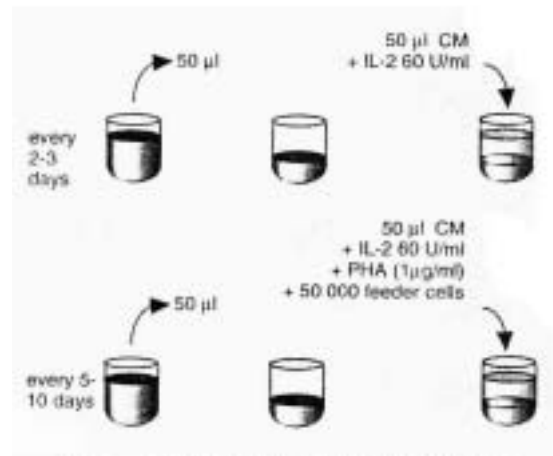


图 2 - 4 T 细胞克隆培养期间换液操作

第六节 人 NK 细胞克隆的制备

基本原理

NK 细胞克隆来源于 NK 细胞，该细胞的分离方法参见第一节之四。这些 NK 细胞与经 射线照射的饲养细胞而获得的 NK 细胞克隆。

试剂和材料

植物血凝素 (PHA) 母液为 100 μ g/ml

重组 IL - 2 (rIL - 2) 母液为 10⁵u/ml，分装小瓶 (0.5ml/瓶)，置 - 20 长期保存，或置 4 下短期存放。应避免反复冻融，IL - 2 不能用滤器过滤除菌处理。

培养基

1. 接种培养液：RPMI 1640 + 10%FCS + 0.5 μ g/ml PHA + 200u/ml IL - 2 + 10g/L 谷氨酰胺 + 100u/ml 青霉素 + 100 μ g/ml 链霉素 + 1mmol/L 丙酮酸钠。

2. 饲养细胞培养液：RPMI 1640 + 10%FCS + 10g/L 谷氨酰胺 + 100u/ml 青霉素 + 100 μ g/ml 链霉素 + 1mmol/L 丙酮酸钠。

3. NK 克隆培养液：RPMI 1640 + 10%FCS + 10g/L 谷氨酰胺 + 100u/ml 青霉素 + 100 μ g/ml 链霉素 + 1mmol/L 丙酮酸钠，经 0.2 μ 滤板过滤再加入 100u/ml IL - 2。

4. 培养液：RPMI 1640 + 10%FCS。

饲养细胞：自体或同种异体 PBMC

器皿和仪器：96 孔细胞培养板、多头移液管、微量移液管、倒置显微镜、CO₂ 孵箱、低温离心机、垂直气流超净台

实验操作

1. NK 细胞的制备

1) 制备 NK 的方法参见第一章之第四节。

2) 悬浮 NK 于接种培养液中，细胞浓度调至 10⁶ / ml。

2. 接种 NK 细胞

1) 制备饲养细胞 (PBMC) 方法参见第一章第一节。

2) 于 4 用 300 \times g 离心饲养细胞 12min。

3) 被离心的饲养细胞悬浮于饲养培养液中，细胞浓度调至 2 \times 10⁶ / ml。

4) 用强度 5000rad 射线照射饲养细胞，于 4 用 300 \times g 离心饲养细胞 12min，将离心细胞再悬浮于饲养细胞培养液中，饲养细胞浓度调至 2 \times 10⁶ / ml。

5) 在 6 块 96 孔培养板的各孔中加 100 μ l 上述饲养细胞悬液 (总量用 60ml 饲养细胞悬液，含 1.2 \times 10⁸ 个饲养细胞)。

6) 将 96 孔板置 37 孵箱预温，直到加入 NK 细胞。

7) 将 NK 细胞悬浮于接种培养液中，并于预温的 96 孔板中加入 100 μ l NK 细胞，使成为 10 细胞 / 孔、5 细胞 / 孔和 2.5 细胞 / 孔的三种类型板，而且每种类型重复二块板。

8) 将培养板置 5%CO₂ 孵箱中 37 培养。

3. NK 细胞的再刺激 (接种后 2 - 3 天，主要依赖于饲养细胞)

1) 从每孔中轻轻移弃 100 μ l 上清液。

2) 每孔中加入含有经照射的饲养细胞 (2 \times 10⁶ 细胞 / ml) 的 NK 克隆培养液 100 μ l。此培养液的制备方法如下：

(1) 融化饲养细胞，移至 50ml 试管中。

(2) 轻轻地加入培养液 30ml，混匀后用 5000rad 射线照射饲养细胞。

(3) 用 300 \times g 离心饲养细胞 12min，并计数饲养细胞数量。

(4) 按细胞计数结果，将饲养细胞悬浮于 NK 克隆培养液中，调至细胞浓度为 2 \times 10⁶ / ml。

4. 换液 (6 - 8 天) 从每孔中轻轻移弃 100 μ l 上清液，并加入新鲜 NK 克隆培养液 100 μ l。

5. 检测 NK 细胞的生长状况 (9 - 10 天) 如检查有细胞生长，按第 8 天的操作换液。

6. 分离克隆 (11 - 15 天)

1) 当培养液颜色变黄时，证明细胞已生长，在 96 孔板上将生长的 NK 按 1 孔分为 2 孔，2 孔

分为 4 孔，4 孔分为 8 孔的方式分离克隆培养。

2) 在 96 孔板上扩增克隆，并重复第 7 天的操作。

质控与提示

1. 每天需检查细胞生长情况。
2. NK 细胞克隆只生长在 96 孔板上，NK 细胞总是用 96 孔培养板进行克隆培养。
3. 目前了解，鼠 NK 细胞克隆的制备仅限于短期培养。

第七节 细胞培养污染的检验与去除

一、细菌与霉菌的污染

由于环境条件差和操作不当等原因，常可发生细菌和霉菌的污染。常见污染的细菌有革兰阴性菌如：大肠埃希菌、枯草杆菌、假单胞菌等；革兰阳性菌有葡萄球菌等，真菌污染常可发生，尤其炎热、潮湿的季节十分常见，如烟曲霉、黑曲霉、毛霉菌、孢子苗等。霉菌和细菌生长迅速，能在短时间内抑制细胞生长，或产生有害物质杀死细胞。镜下可见脑浆内出现大量颗粒，细胞变圆或崩溃，从瓶壁脱落。霉菌污染容易发现，大多形成白色或浅黄色菌团漂浮于培养液表面，肉眼可见，有的散在生长，镜下可见丝状菌丝，纵横交错于细胞之间。细菌污染如果较严重时培养基上清混浊，较轻时镜下可见小的菌体在细胞间运动，同时可涂片染色镜检或进行细菌培养基培养，加以确定。

抗生素及抗霉菌制剂对预防或排除细菌、霉菌污染均有效。工作中要特别注意和防止所用培养液和血清的污染，日前应仔细检查有无混浊和菌丝存在，以防止在培养细胞时造成污染。

二、支原体污染的检测与去除

(一) 支原体的检测

1. PCR 法

原理 该法是通过 PCR 技术将支原体 16srRNA 基因特异性扩增，来检测培养细胞中污染的支原体。PCR 引物选自 16sr RNA 基因上的支原体特异片段，此片段与其他细菌的序列无交叉性杂交反应。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳，经溴乙啶 (EB) 染色后在紫外透射仪上进行检测。

- ◆ 16sr DNA 引物用水稀释至 40umol/L。
 - (1) .正向引物：5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'
 - (2) .反向引物：5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'
- ◆ 质粒 pBR322 引物用水稀释至 40umol/L。
 - (1) .正向引物：5'-CATCTCGGGCAGCGTTGGGT-3'
 - (2) .反向引物：5'-AGCGCAAGCGGAGTCAGTGAGC-3'
- ◆ 裂解缓冲液：10mmol/L Tris-HCL(pH8.3), 50mmol/L KCL, 2.5mmol/L Mgcl₂, 5g/L Tween20 和 5g/L TritonX-100。
- ◆ 蛋白酶 K (proteinase K) 贮存液：蛋白酶 K 20 mg/ml 溶于 50%甘油中，于-20⁰C 贮存。
- ◆ 耐热 DNA 聚合酶 (如 Taq 聚合酶) 与相应的 10X TAE 缓冲液 (见附录 A1)
- ◆ 琼脂糖 (分子生物学级); 溴乙啶 (10mg/ml 溶于水中并避光保存)。
- ◆ 6X 加样染液 (40%甘油、0.125%溴酚蓝和 125mmol/L EDTA)。
- ◆ DNA 分子量标志 (50ng/ml) pBR322 DNA。
- ◆ DNA 扩增仪、台式离心机、微波炉、电泳装置、紫外透射仪 (UV)、加样枪、PCR 管 (0.5ml 或 0.2ml)。

方法与步骤

1) 样品制备

- (1) 将 10^6 细胞悬液或贴壁细胞刮下来的悬液放 1.5ml 微离心管内,以最大转速离心 15min。
- (2) 弃去上清,将细胞再悬浮于 100ul 裂解液中,然后加蛋白酶 K,使终浓度为 60ug/ml。
- (3) 置微波炉内 60°C 孵育 1h,然后升至 95°C 10min,再将样品置室温中降温。

2) PCR 扩增

- (1) 在冰浴中对各样品制备 PCR 重要混合物,对每个样品均加入:

10X PCR 缓冲液	5.0ml
25mmol/L dNTPs 混合物	0.4ul
40umol/L 16sr DNA 引物	每种引物 1.0ul
40umol/L pBR322 DNA 引物	每种 2.0ul
pBR322 DNA 1pg/ml	2.0ul
DNA 聚合酶 (5U/ml)	0.2ul
三蒸水	35.4ul
总量	45ul

- (2) 用无菌去离子水稀释样品为 1:10, 1:100。
- (3) 于每个 eppendorf 管中加 45ul PCR 扩增混合物,每管中分别加入样品原液及 1:10, 1:100 稀释液各 5ul,操作均在冰浴中进行。
- (4) 在每个 eppendorf 管中轻轻加入 50ul 无菌矿物油,覆盖在液面上。如 DNA 扩增仪带有制式热盖,此步骤可省略。
- (5) 将各管放入 DNA 扩增仪的孔槽内,并执行以下循环指令:
 - 95°C 10min 一个循环
 - 95°C , 30S 58°C 1min 72°C 1min, 共 30 个循环。
 - 最后 72°C 10min 延长循环。

3) PCR 产物分析

- (1) 制备含有 EB 染料 (0.1ug/ml) 的 1%琼脂糖凝胶 (用 TAE 缓冲液制备)
- (2) 从 PCR 扩增仪中取出样品管,取 10ul PCR 扩增产物加到 2ul 带有染液的加样液中,混匀后加样到琼脂糖凝胶加样孔中,同时在对照孔中加 10ul 标准 DNA 分子量标志。
- (3) 凝胶置 TAE 缓冲液中,电压 80V,电泳 60-90min。
- (4) 凝胶电泳完毕,将凝胶置紫外透射仪下观察,有无被 EB 染料着色的红色荧光 DNA 条带,样品孔与标准 DNA 孔进行比较并拍照。

质控与提示

1) 阳性对照

- (1) 如果支原体 DNA 可查到,则 10ngDNA 即呈阳性结果。
- (2) 如得到已知支原体感染的细胞培养,细胞可同样品一样处理,作为阳性对照,处理的细胞置 -20°C 冻存,可重复使用。

2) 阴性对照

- (1) 用 45ul PCR 扩增液加 5ul 无菌去离子水混匀,作为阴性对照。
- (2) 在含 45ul PCR 扩增液的 eppendorf 管中建立一个对照孔,以 2ul 无菌去离子水替代 pBR322 DNA (1pg/ml)。
- (3) 有时样品中可能含有聚合酶的抑制物,可阻抑 PCR 扩增,这种情况很易被 pBR322 扩增片段的缺失所识别。遇此情况是,应从同一培养物中另取少量细胞 (10^5 个) 重新制备一份样品,如果这样做仍无扩增片段出现,就将细胞在无抗生素的培养基中试生长 2-3 周,然后再作支原体检测。因为抗生素能结合双链 DNA,故有人怀疑抗生素具有抑制 Taq 聚合酶的活性。

2. DNA 荧光染色法

原理 DNA 荧光染色法是以 Hoechst 或 4',6-二氨基-2-苯基吲哚 (4',6-di amino-2-phenyl indole, DAPI) 试剂为荧光染料,使支原体 DNA 着色,用荧光显微镜在感

染的靶细胞的胞质中辨认出荧光，证明试验样品中存在支原体。

试剂与仪器

靶细胞 CKI - 1 (IF05003, JCRB0008) 或 Vero 细胞 (ATCC CCL82)

试验样品 约 10^6 个细胞的培养上清液 1ml

支原体 *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 29052) *M. orale* (IFO 14477)

培养液 MEM + 10% FBS (无抗生素) 无钙镁 PBS 固定液 ; 甲醇 : 醋酸为 3 : 1

荧光染液 浓缩染液 (100ml PBS 中加 Hoechst Dye 5mg 防腐剂 thimerosal 10mg 用磁力搅拌器助溶 30min, 每瓶分装 1ml, 严格避光保存于 -20 冰箱内) 使用液 : 将冻存的浓缩液取 0.15ml 加入 100ml PBS 中, (最终浓度为 $0.075 \mu\text{g/ml}$ 的 Hoechst Dye $0.15 \mu\text{g/ml}$ 的 thimerosal 防腐剂) 用磁力搅拌器搅拌助溶 30min, 使色素完全溶解。(使用前调制)

荧光显微镜、各种吸管、60mm 玻璃平皿、10ml 离心管、4 个带有可活动玻片的培养皿、盖玻片 (无荧光)

方法与步骤

(1) 检验材料的制备

检体细胞的培养 : 被检细胞在不含有抗生素的培养中传代培养 3 次以上 (不低于 3 次) 在最后一次传代培养增殖期中换新鲜培养液, 经 2 - 3 天培养。

细胞回收 : 培养细胞上清液, 以及用橡胶刮匙从培养皿上刮上的细胞, 吸入离心管内, 于 4 下, 1200r/min, 离心 10min。吸弃上清, 留下约含 10^6 个及大约 1ml 上清液。

冻融 : 将离心细胞收集到冻存管内置 -20 冻结, 30min 后置 37 孵箱内融解, 如此反复操作 2 次, 于 4 1200r/min 离心 10min, 吸取上清液作为检体。

(2) 标记靶细胞培养与检体的接种

将液氮 (-196) 冻存的 CKI - 1 或 Vero 细胞解冻 (37 1 分钟内迅速解冻) 计数活细胞达 $2 - 3 \times 10^3 / \text{ml}$, 植入 4 个带有可活动的切片在皿底的培养皿中, 每培养皿 1ml, 置 CO_2 孵箱内培养。

孵育 24h 后在显微镜下见细胞呈适当的密度 (高倍镜下见 160 - 240 个细胞 / 视野) 时, 弃去培养液, 于每个带可活动切片平皿内换新鲜培养液 0.9ml, 在 i 号皿内接种冻融检体 0.1ml 在 ii 号皿内加 0.1ml 培养液, 作为阴性对照, iii 与 iv 号皿内加入 100cfu/0.1ml 的 *M. hyorhinis* 和 *M. orale* 支原液体, 作为阳性对照。将 4 个培养皿置 CO_2 孵箱内培养 6 天。

(3) 细胞固定、染色、封片观察

吸弃培养液, 用 CMF - PBS 洗涤细胞加在可活动玻片上 1ml 固定液, 固定 10min。

吸弃固定液, 风干后各加染色液 ml 置室温染色 30min。

吸弃染色液, 用蒸馏水洗 3 次, 取下可玻片的杠架和垫圈, 取下可活动玻片。

滴入封片液, 其上复上盖玻片并赶除气泡和多余的封片液, 四周用封片胶封闭。

启动紫外系统, 用荧光显微镜观察 (放大约 $\times 400 - 600$ 适宜)

(4) 结果判定

在细胞质中观察有无荧光, 试验样品与阳性、阴性对照对应观察。

计数 1000 个细胞, 有 5 个以上的细胞质中见荧光着色, 可判定为阳性。

质控与提示

(1) 标记的靶细胞除 CKI - 1 和 vero 细胞外, 3T6 细胞 (ARCCCL96) 也可使用。本法成功的要点之一是用作靶细胞质控的管理应严格, 必须预先确认该细胞无支原体的污染才能冻存使用。

(2) 要明确本检体的结果判定, 必须使用不含抗生素的培养液。

(3) 染色液 : Hoechst 染液不稳定, 故每次检测前须新鲜配制, 使用 DAPI 也可以, 均应新鲜配制。

- (4) 试验检体：被试细胞回收时用橡胶刮匙刮下，不能用胰蛋白酶等水解酶类消化，制备好的检体细胞保存在 -80℃ 冰箱中可存放数月。
- (5) 阳性对照：本试验采用支原体 *M. hyorhinitis* 和 *M. orale* 为阳性对照，要十分注意避免有新的污染源。
- (6) 特异性与敏感性：本法不是支原体的特异性检出法，对 DNA 进行染色观察，对其他微生物（细胞内寄生的霉菌、细菌等）的污染，也可看出同样的荧光染色，甚至检体会含有细胞的 DNA 颗粒，都是引起结果判定混乱的原因。但细胞培养所污染的支原体，*M. hyorhinitis*、*M. orale*、*M. salivarium*、*M. hominis*、*M. fermentans* 等约占支原体污染的 97%，本法针对这些支原体污染的检出敏感度为 1cfu，而一般污染细胞中的支原体浓度为 $10^3 - 10^8$ cfu/ml，故本法仍具有很好的实用性。

(二) 支原体的去除

由于支原体对细胞培养的交叉污染严重并在无意识之中发生，故对支原体检测为阳性的细胞株应丢弃；只对某些贵重的细胞株而言，才设法去除支原体。常用方法有药物法、免疫法、稀释法、加热法等。从感染的细胞系中去除支原体较简单的方法是用阻碍支原体 DNA 或 RNA 合成的抗支原体类抗生素处理细胞。普遍的抗生素在细胞培养液中对支原体是无效的。而用于去除支原体的药物均为喹诺酮类和/或四环素类抗生素的衍生物。

试剂与仪器

- ◆ 抗支原体药物：四环素与截短侧耳素的复合物 (BM-cyclin)；卡那霉素、二甲胺四环素与胍胍素协同使用，氟代喹诺酮类抗生素等，已有成品供应。
- ◆ 细胞培养基：25cm² 组织培养瓶
- ◆ 金属通风橱、CO₂ 孵箱、离心机等

方法与步骤

1. 药物法 细胞的去除支原体处理

- (1) 支原体污染的细胞以 10^5 个细胞/ml (25cm² 培养瓶中约 10ml) 接种于常规培养基并加有抗支原体药物，药物浓度为理论 (想) 值 IC₅₀，即采用 5~10 倍于常用量的冲击法。
- (2) 培养 48h 后，去除培养液，恢复原先处理，并在 1 周内重复同样的处理。
- (3) 培养 1 周后，将细胞接种于常规培养基内。
- (4) 常规培养 2 周后，用前法所述检测细胞有无支原体污染，如果无支原体检出，则重复实验。2 至 3 周后再次检测以确定该结果，经这样处理的细胞认为是无支原体污染的。

2. 免疫法

要用抗支原体抗体或人及动物血清中的补体与污染细胞株于体外培养。支原体结合并裂解破坏支原体。或用动物接种法将污染支原体的肿瘤细胞接种于同种系动物皮下或腹腔，或接种于裸鼠腹腔，利用动物体内免疫系统杀伤支原体。

3. 克隆法

克隆法即有限稀释法 (见本章第一节)。将污染支原体的细胞进行有限稀释，接种于 96 孔培养板，使之每孔只接种一个细胞，进行克隆培养，经前法检测，挑取无支原体污染的细胞克隆，这种方法对污染较轻的细胞株效果好。

4. 加热除去

根据支原体对热耐受性较差的特点，将受支原体污染的细胞置于 41⁰C 中作用 5~10h，最长可达 18h，以杀灭支原体，但 41⁰C 对培养细胞本身也有伤害，故在处理前应欲试验摸好条件。另外有人利用软琼脂技术，经 50⁰C 加热 (4~6min) 灭活污染细胞的支原体，再于 37⁰C 培养 1~3 天，使琼脂中抗生素与支原体进一步作用，使热灭活的支原体彻底被清除。

质检与提示

三、内毒素污染的检测与去除

(一) 内毒素含量测定

原理 本法应用鲎变形细胞溶解物 (limulus amoebocyte lysate, LAL) LAL 来检测和 / 或定

量革兰氏阴性细菌的内毒素，称鲎试验，鲎试验的机制是内毒素活化 LAL 中前凝固酶而使凝固蛋白原变不凝固蛋白，使 LAL 出现肉眼可见的凝胶从而可定量测知内毒素的含量。

试剂和材料

待测样品

用 λ 表示鲎试剂的敏感性单位（例如， $\lambda = 0.125\text{EU/ml}$ ）（有商业成品）

对照标准内毒素（CSE）（有商业成品）

不含内毒素的水（即 LAL 水）（有商业成品）

硼硅酸盐制，锥形终末反应试管（内径 10mm, 长 75mm）（内毒素测定专用，有商业成品）

不含内毒素的氢氧化钠（ 0.1mol/L ）

不含内毒素的盐酸（ 0.1mol/L ）

未被内毒素污染的硼硅酸玻璃制成的稀释用试管。

指示温度计

37 ± 1 恒温水浴箱。

200 和 1000 μl 的微量移液管有未被内毒素污染的管头。

无内毒素吸管（10、5、2 和 1ml）

PH 计或 PH 试纸

螺旋搅拌器

能够保持 250 1 小时的干烤箱。

聚膜（parafilm）

方法与步骤

测定内毒素水平需要进行两步（1）确定 LAL 试剂的敏感度（2）检测待测样品中是否存在可能导致假阴性结果的干扰因素。

1. 确证鲎试剂的敏感度

（1）根据 CSE 的初浓度，用 LAL 水将 CSE 连续二倍比稀释，稀释后的浓度为 2^{-1} ， 2^{-2} ， 2^{-3} ， 2^{-4} ， 2^{-5} （例如，如果 $\lambda = 0.125\text{EU/ml}$ ，则浓度分别为 0.0625 ， 0.03125 ， 0.015625 ， 0.0078125 ， 0.00390625EU/ml ）（稀释管的体积是 0.1ml）

（2）将各 0.1ml CSE 稀释液转移到锥形末反应管中，然后向各管中加入 0.1ml 的 LAL 试剂。

（3）用封口膜封闭管口并轻轻混匀。

（4） 37 ± 1 下孵育 60 分钟，轻柔地倒置试管（ 180° ），不要振荡，观察结果。

当内容物形成坚实的凝胶，倒置试管后，凝胶仍然附着在管底，该结果为阳性。在每组稀释液中，具有最低稀释浓度的 CSE 稀释液应呈阴性结果，如果均呈阳性结果，应提高稀释倍数，再进行试验。

（5）测定的终点是每组稀释液中最后出现阳性结果的稀释液的浓度。

$GEP = 10^m$ ， $m = e/f$ ，其中 e 为各组稀释液的终点的 log 值的总和，f 为稀释液的组数。

如果计算出的 GEP 介于 0.5 与 2 之间，可确证鲎试剂的敏感度。

2. 对干扰因素的检测

（1）用待测样品将 CSE 稀释成上述终浓度。

（2）测定混合液的 pH 值，并用不含内毒素的 NaOH 或 HCL 将该混合液的 pH 值调至 6.5—7.5。

（3）重复上述测定 GEP 的步骤，计算 GEP 值。如果 GEP 值介于 0.5 和 2 之间，则样品中不包含干扰因素。否则，提高样品的稀释倍数，重复测定。

3. 对样品的定量测定

（1）A：准备两试管，分别盛浓度为 2^{-1} 和 2^{-2} 的 CSE。（0.1ml，用 LAL 水二倍比稀释）

B：用 LAL 水将样品稀释，准备两组样品稀释液。（终体积为 0.1ml，二倍比稀释）

C：用 LAL 水作为阴性对照。（0.1ml）

D：向样品中加入 CSE 至 CSE 浓度为 2^{-1} ，以此作为指示样品中是否含有

(2) 干扰因素的对照(0.1ml)

重复前述步骤,向各管中加入0.1ml的LAL试剂。

(3) 如果实验有效,则必须:

呈阴性结果(排除因试剂中含有内毒素而导致假阳性)

呈阳性结果(排除干扰因素)

确证了细胞溶解产物的敏感度。

(4) 样品内毒素浓度: $\times B$ 的终点。

质控与提示

(1) 对于一般性的内毒素,可用CSE代替较贵的参考标准内毒素(RSE),使用时将CSE和BSE对比较正。

(2) 使用前,剧烈振荡CSE,使其悬浮。

(3) 轻柔振荡鲎试剂使其悬浮,避免起泡。

(4) 实验应在空气不流动的房间里,无菌的操作台上进行,使用未被内毒素污染的材料。

(二) 内毒素的去除

原理

本法用于去除实验用玻璃器皿上的内毒素。将玻璃器皿置于烤箱中,加热到250℃,持续30min,即可去除内毒素。

方法与步骤

1. 内毒素去除效率的评估

(1) 制备浓度分别为1000和10000EU/ml的CSE溶液。按方法(一)检测这些溶液。

(2) 向所有待去除内毒素的玻璃器皿滴入1ml的CSE溶液。(每种类型的玻璃器皿至少有3EU的CSE。)

(3) 将玻璃器皿置入烤箱中,在60℃下,干烤持续30min,烘干,然后在烤箱中,250℃下,干烤30min。

(4) 加入适量的LAL水,剧烈振荡5min,以清洗玻璃器皿,然后测量清洗后的LAL水中的内毒素的浓度。

(5) 比较原来的内毒素含量和现存的内毒素浓度。

当内毒素含量至少减少了3-log时,该方法有效。必要时,重复操作,去除内毒素。用鲎试验法计算内毒素去除的百分比。

2. 去除实验玻璃器皿上的内毒素

确定可使内毒素含量下降3-log的最佳方案。

对于用来配置无同一内毒素溶液的玻璃器皿,重复操作,直至内毒素含量下降3-log。(例如,1000-1EU和10000-10EU)

数个加热循环后,用前述的鲎试验法,测定内毒素含量。

对照

阴性对照 用只盛有LAL水的玻璃器皿,在250℃下,干烤30min并用LAL法测量内毒素的含量。

阳性对照 干燥(60℃,30min)每种玻璃器皿中的内毒素溶液,不经过干烤(250℃,30min)去内毒素的操作,然后测定其内毒素含量。

质控与提示

(1) 确保烤箱散热均匀,为此,在操作过程中,可将玻璃器皿放置在烤箱中的每一层上,当温度在250℃后,温度的波动不要超过 $\pm 15^\circ\text{C}$ 。

(2) 用含1000EU的内毒素进行的检测,可用来确定去内毒素的效率。用含10000EU的内毒素进行的检测,可用来确定对内毒素含量较高的器皿去除内毒素的效率。

(3) 如果结果不理想,可增加每一次操作的时间和操作次数。

(4) 其他技术适用于培养基的去内毒素，例如，超滤，反向渗透，但比较昂贵。选取有效的滤过膜，确保去内毒素后，培养基的营养成分不丢失并且内毒素含量下降 3 - log。

(张卓然、孟庆丽、陈琰、陈彦伟)

参考文献

1. Immunological techniques made easy P24-34.P68-72.
2. Rosenberg, S A. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to the immunotherapy of cancer. JNCI 1985,75:595-603.
3. Rosenberg, S A. a new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 1986.223:1318-1321
4. 张卓然 实用细胞培养技术 北京人民卫生出版社 1999
5. 竹内昌明 ニイコブテス又検出法，组织培养の技術 P62 - 65.