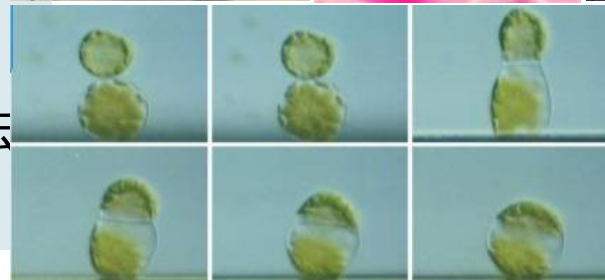
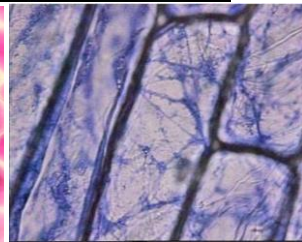
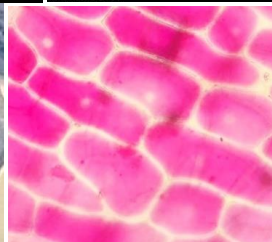
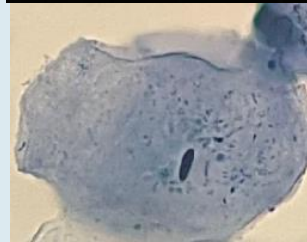


回顾

1. 显微镜的“专业”操作。
2. 标准的生物科研绘图。
3. 暗视野下神奇的世界。
4. 实验设计：单盲、双盲、阳性对照、阴性对照。
5. 误差的产生、组内重复、组间差异和组内差异。
6. 染色：
 - ①詹纳斯绿B染色
 - ②中性红染色
 - ③考马斯亮蓝染色
7. 单细胞获得的方法、细胞融合的方法及应用。



实验七 动物细胞培养的 无菌化准备



第一节 动物细胞培养实验室及仪器设备

第二节 动物细胞培养的基本试剂

第三节 动物细胞培养的基本操作



动物细胞实验室及基本操作

动物细胞实验室基本配置

无菌室的基本设计

基本实验室、辅助实验室

无菌室的基本设备

净化台、CO₂培养箱、倒置显微镜等

培养所需器皿

培养器皿、盛装器皿、金属材质用具等

动物细胞培养基本试剂

基本培养液、血清、PBS、胰蛋白酶溶液等

无菌、pH、分装、储存

动物细胞培养基本准备

清洗

包装

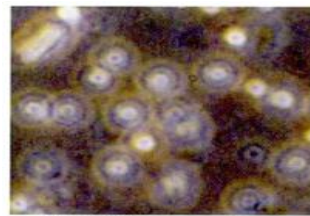
灭菌与消毒

无菌操作

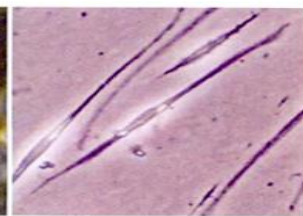
物理消毒, 干热灭菌, 湿热灭菌, 滤过除菌, 化学消毒等

外植体 (explants) :

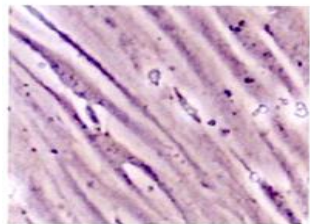
- 离体条件下生物有机体的组织，器官，细胞，乃至细胞器都会作为我们的培养对象。



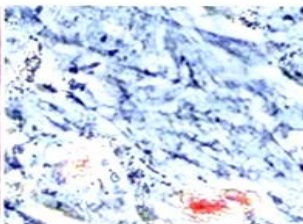
A 原代接种后 24h ($\times 400$)



B 原代接种后 4 天 ($\times 400$)



C 原代接种后 10 天 ($\times 400$)



D 原代成脂油红 O 染色 ($\times 400$)

图 1 细胞形态学观察

如果，

我们试图在**体外**培养动物的外植体
(eg: 肝脏细胞)，

我们需要为它提供什么样的**环境**？



体外培养根本原则是模拟体内的生长条件：



(1) 生长环境 (PH值、温度等)

恒定的温度： $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

最适PH：7.2-7.4

(2) 营养供给

培养基，培养液

(3) 无菌环境 (无菌操作)





第一节

动物细胞培养实验室及仪器设备



1. 基础实验室

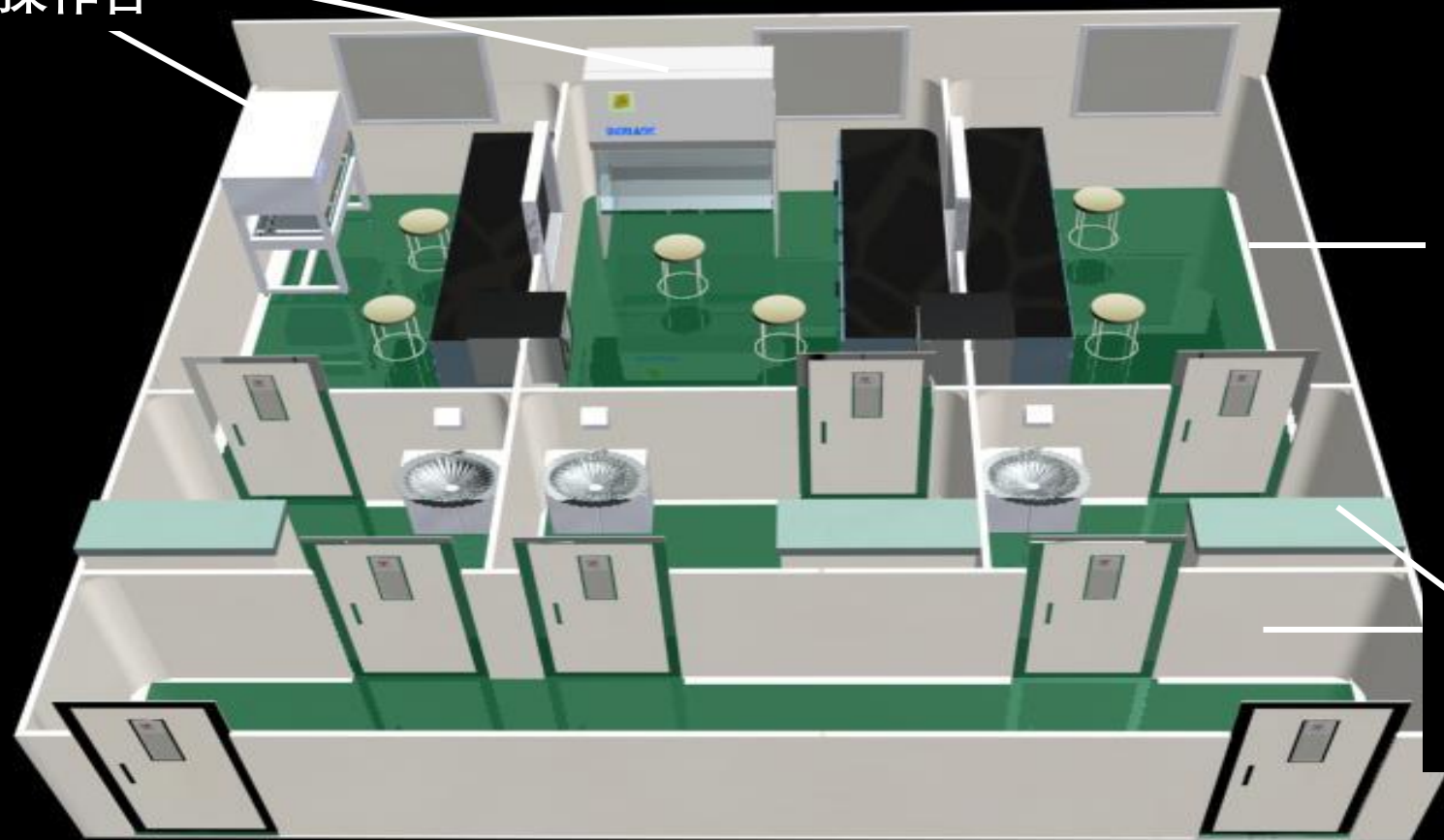


设计上的共同原则：**无菌操作**。

- ④ **基本操作区**：洗涤区，灭菌区，储藏区，培养基配制区；
- ④ **无菌操作室**：缓冲准备室，接种室；
- ④ **培 养 室**：恒温培养箱，培养架，摇床，
- ④ **鉴定分析室**：倒置显微镜，等仪器。



无菌操作台



接种区

缓冲准备区

操作室的级别

美国联邦标准 (USA Federal Standard)

空气中微粒的洁净等级对照

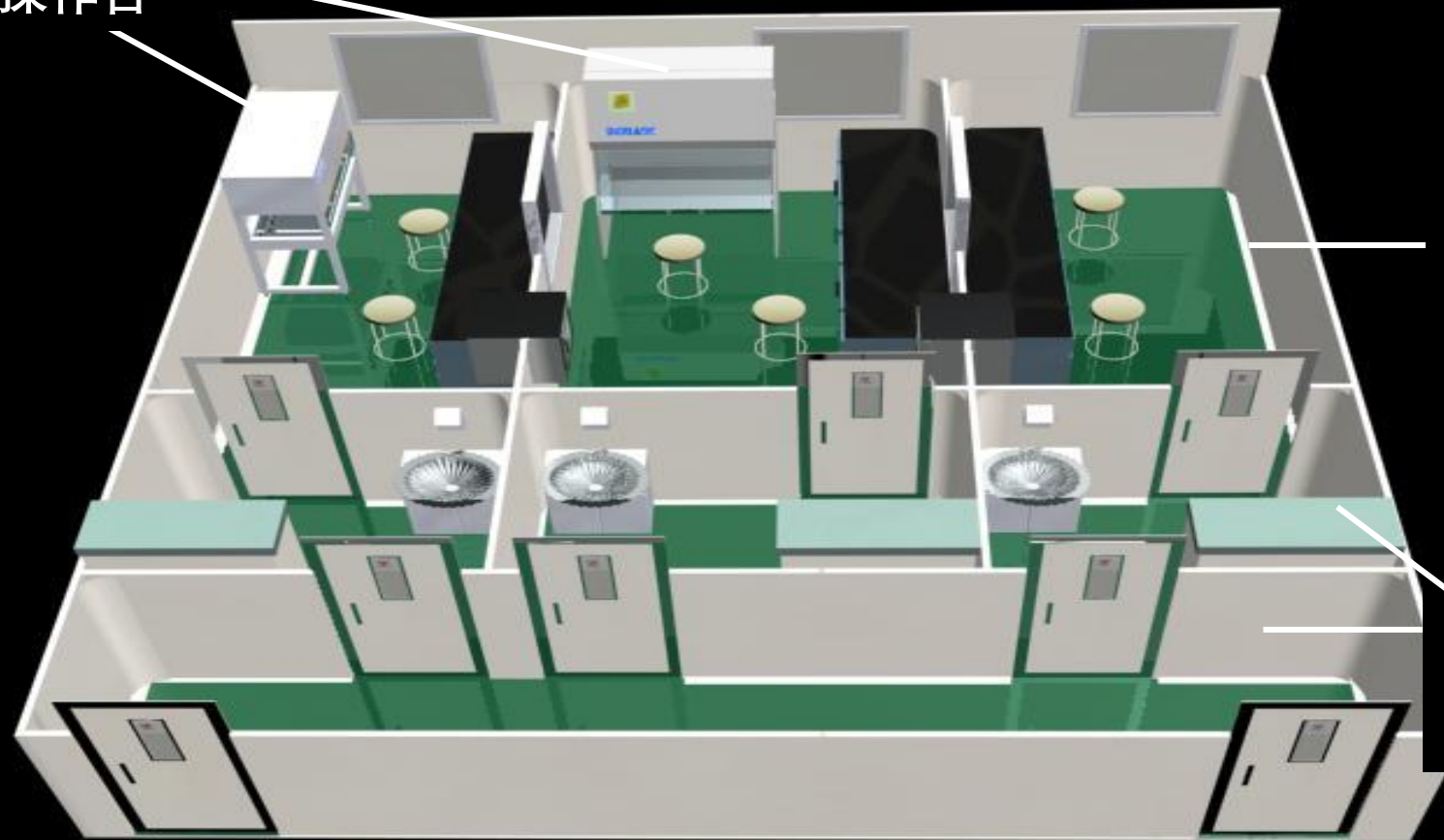
空气微粒洁净等级 (每立方米, 每立方英尺) 微粒的最大浓度限值

ISO14644-1	FED STD 209E		CLASS	Number of Particulate per Cubic Meter by Micrometer Size					
ISO Class	English	Metric		0.1um	0.2um	0.3um	0.5um	0.5um	5um
				m ³	m ³	m ³	ft ³	m ³	
1			ISO1	10	2				
2			ISO2	100	26	10		4	
3	1	M1.5	ISO3	1,000	265	106		35	
4	10	M2.5	ISO4	10,000	2,650	1,060	10	353	
5(百级)	100	M3.5	ISO5	100,000	26,500	10,600	100	3,530	29
6(千级)	1,000	M4.5	ISO6	1,000,000	265,000	106,000	1000	35,300	293
7(万级)	10,000	M5.5	ISO7				10000	353,000	2,930
8(十万级)	100,000	M6.5	ISO8				100000	3,530,000	29,300
9			ISO9				1000000	35,300,000	293,000

2. **最**基础的设备

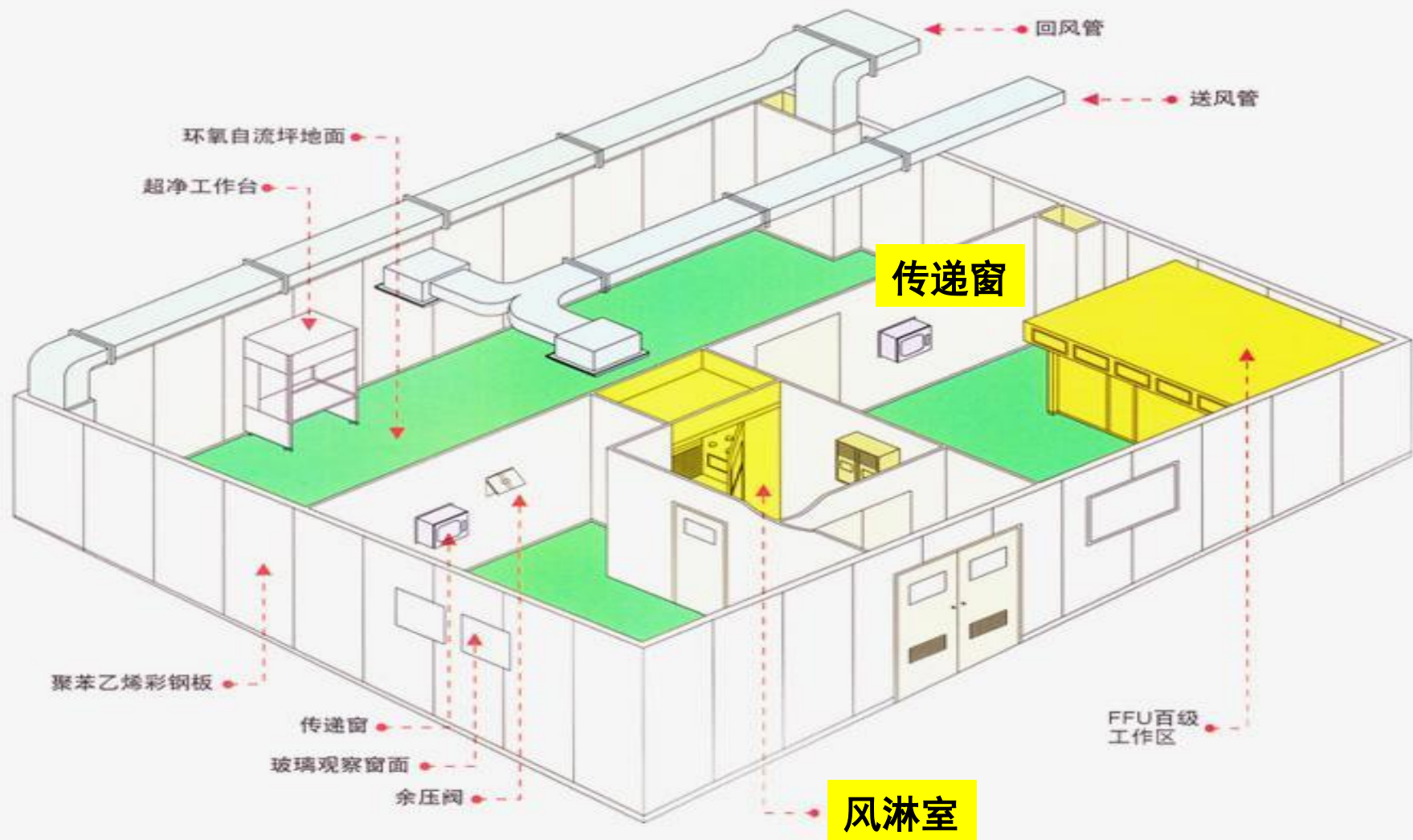


无菌操作台



接种区

缓冲准备区



4	和风	5.5-7.9	吹起尘土、纸张、灰尘、沙粒	小浪白沫波峰	1.0
5	轻劲风	8.0-10.7	小树摇摆，湖面泛小波，阻力极大	中浪折沫峰群	2.0
6	强风	10.8-13.8	树枝摇动，电线有声，举伞困难	大浪到个飞沫	3.0
7	疾风	13.9-17.1	步行困难，大树摇动，气球吹起或破裂	破峰白沫成条	4.0
8	大风	17.2-20.7	折毁树枝，前行感觉阻力很大，可能伞飞走	浪长高有浪花	5.5
9	烈风	20.8-24.4	屋顶受损，瓦片吹飞，树枝折断	浪峰倒卷	7.0
10	狂风	24.5-28.4	拔起树木，摧毁房屋	海浪翻滚咆哮	9.0
11	暴风	28.5-32.6	损毁普遍，房屋吹走，有可能出现“沙尘暴”	波峰全呈飞沫	11.5
12	台风 (太平洋西北部和南海海域) 或飓风 (大西洋及北太平洋东部)	32.7-36.9	陆上极少，造成巨大灾害，房屋吹走	海浪滔天	14.0

2.1 风淋室：25m/s以上的高风速，0-99s

2.2 传递窗





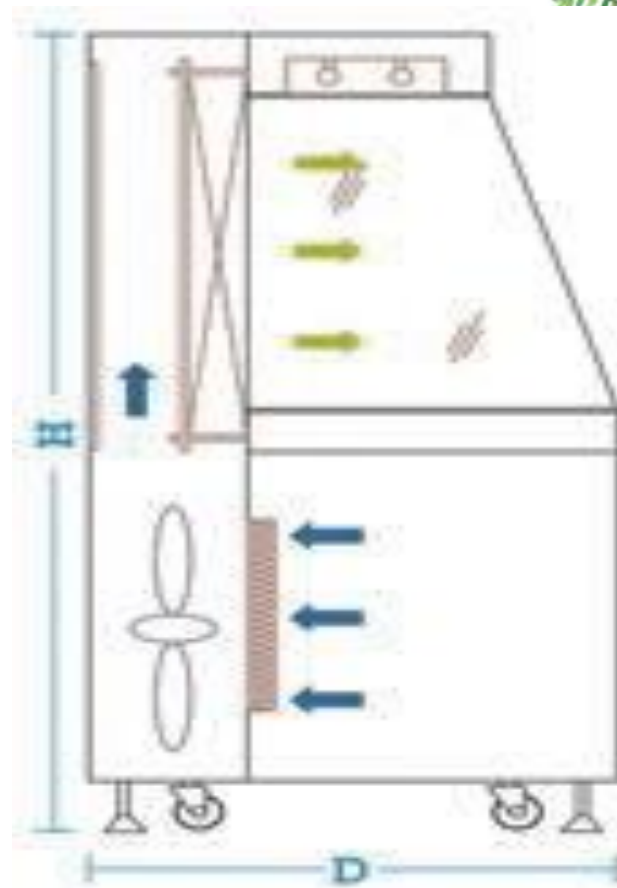
2.3 净化台

又称超净工作台，是目前已普及应用的**无菌操作装置**。



✚原理：

✚ 利用鼓风机，驱动空气通过高效滤器净化后，徐徐通过工作台面，使工作场地构成无菌环境。



室内空气

过滤

洁净空气

U. V (紫外灯)

避免来自柜外的污染

避免交叉污染

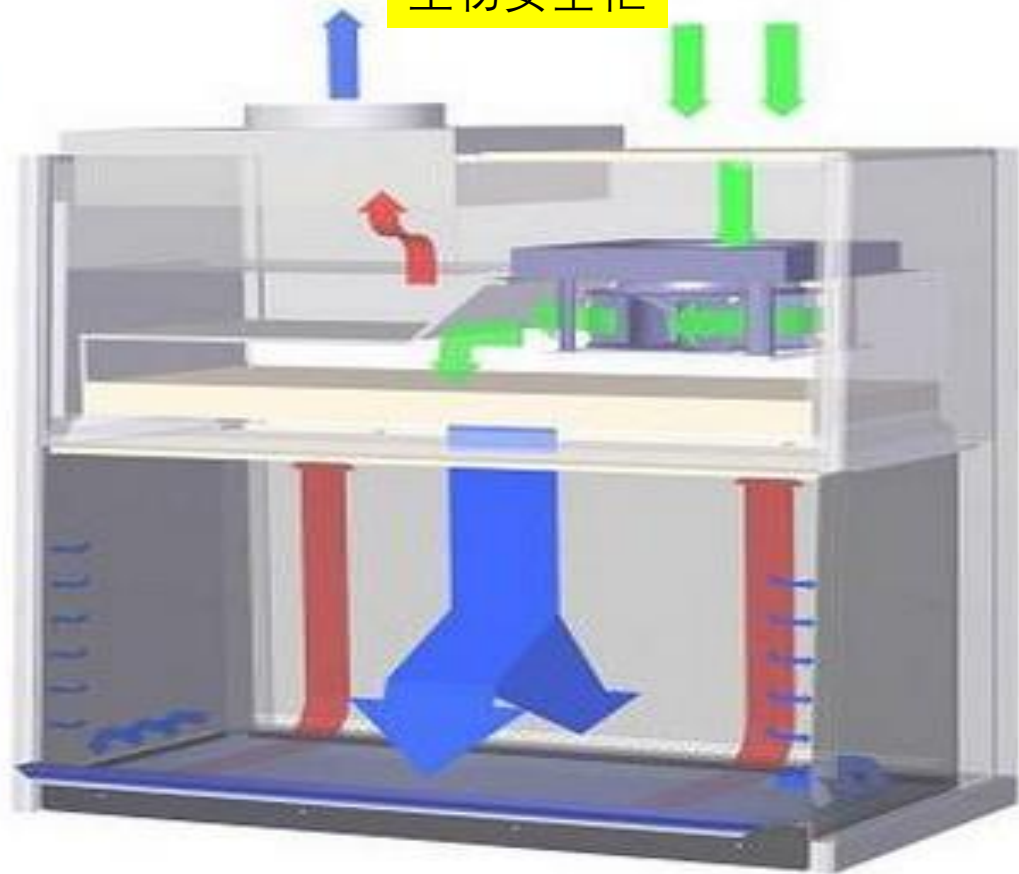
病毒培养？



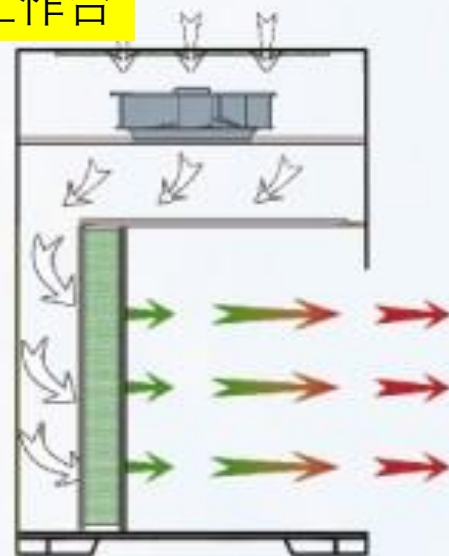
生物安全柜是一种负压的净化工作台



生物安全柜



超净工作台

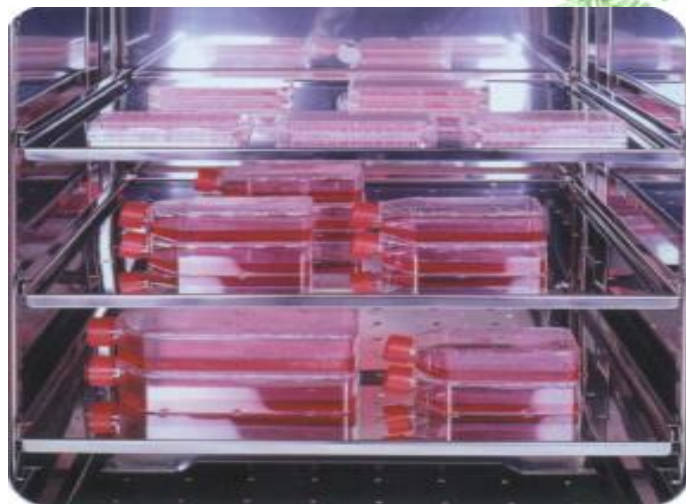


水平类型



2.4 CO₂ 恒温培养箱





二氧化碳恒温培养箱的设定？



- 恒温动物：37 °C ± 0.5 °C ； 耐寒
- PH: 7.2-7.4； 耐酸
- 5%CO₂（二氧化碳含量2-10%）
- 无菌
- 保持一定湿度（饱和）



2.5 倒置显微镜





94117
就是显微镜



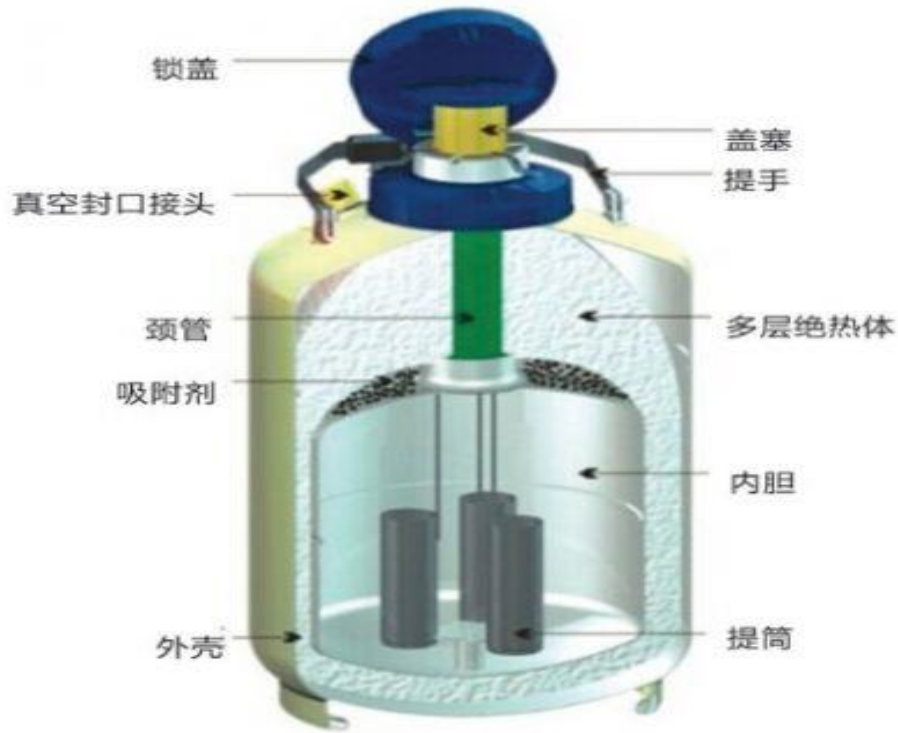


2.6 液氮罐



盛装液氮 ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), 用来长期冻存细胞。





贮存型



运输型

- ✦由内胆、外壳、提筒以及连接内外胆的颈管所组成
- ✦内外胆是由高强度的铝合金制成，内外胆之间是高真空，因此要轻拿轻放。



精子银行



2.7 灭菌设备

■ 蒸汽压力灭菌锅、干热消毒柜、过滤灭菌装置、喷雾消毒器、紫外灯。



2.8 其它

✚ 光温控制设备： 时间程序控制器、空调及温度感应器。

✚ 基本设备： 冰箱（4，-20，-80℃）、电子天平、酸度计、纯水器等。







酸度计





磁力搅拌器







動物細胞培養實驗室
蛋白質純化策略設備



動物細胞培養實驗室全景



動物細胞培養實驗室
蛋白質電泳分析儀



動物細胞培養實驗室
中空纖維細胞培養裝置



動物細胞培養實驗室
高效液相層析儀



微生物反應器實驗區
生化反應器一隅



動物細胞培養實驗室
試量產膨脹床設施



動物細胞培養實驗室
細胞培養反應器





微生物反應器實驗區
線上即時磁場式質譜儀



動物細胞培養實驗室
膠片影像分析儀



微生物反應器實驗區
元素分析儀(CNPS)



微生物反應器實驗區
絕對分子量測定設備



微生物反應器實驗區
生化分析室一隅



微生物反應器實驗區
粒徑形象分析儀



微生物反應器實驗區
傅立葉紅外光譜儀



现在：

有个房子

有个箱子

有个台子

有一堆仪器。





3、 动物细胞培养的基本器皿



3.1 培养器皿：

接种物生长的器皿

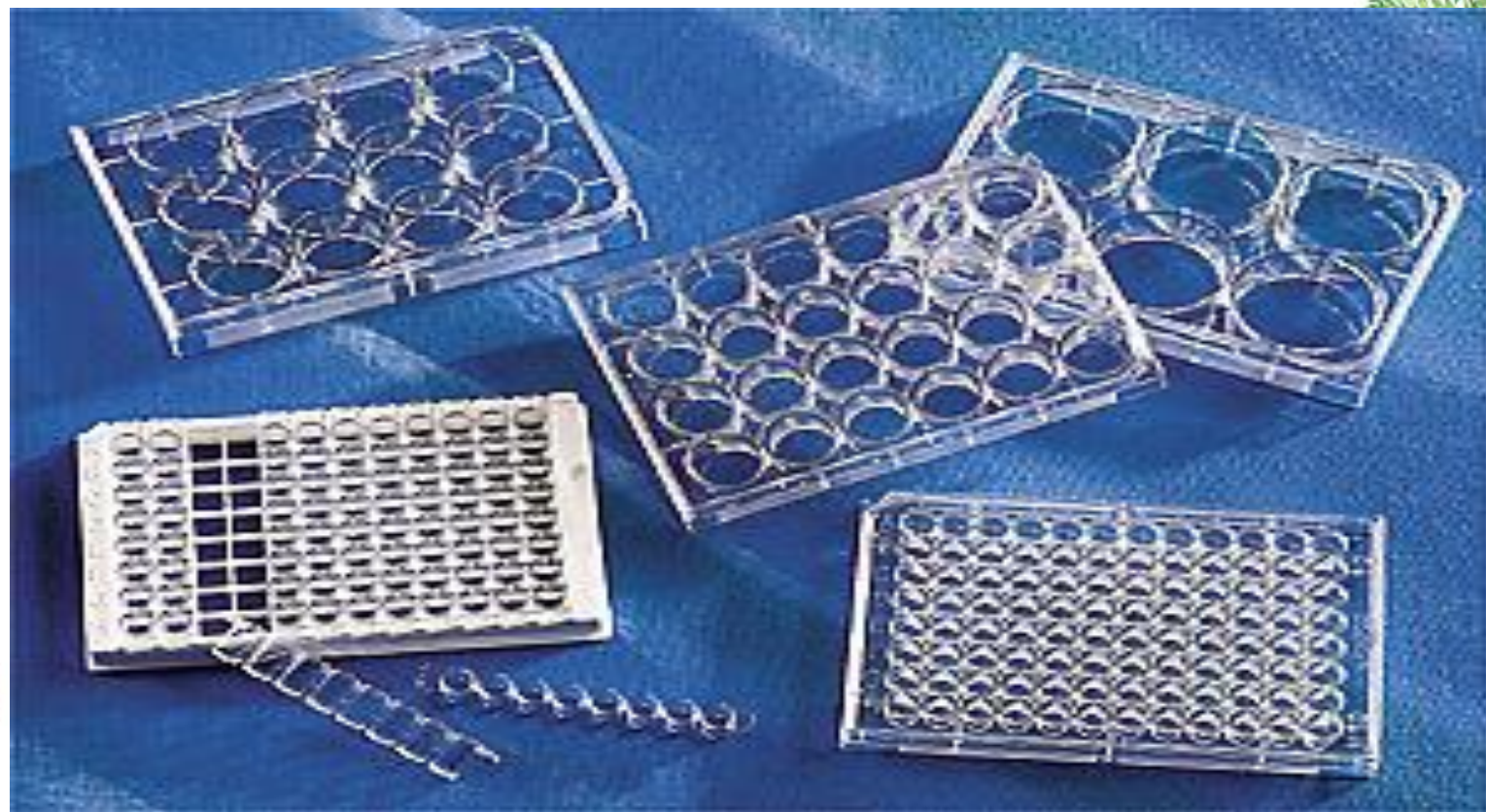
根据培养目的的要求不同，主要有培养瓶，培养皿，多孔培养板。



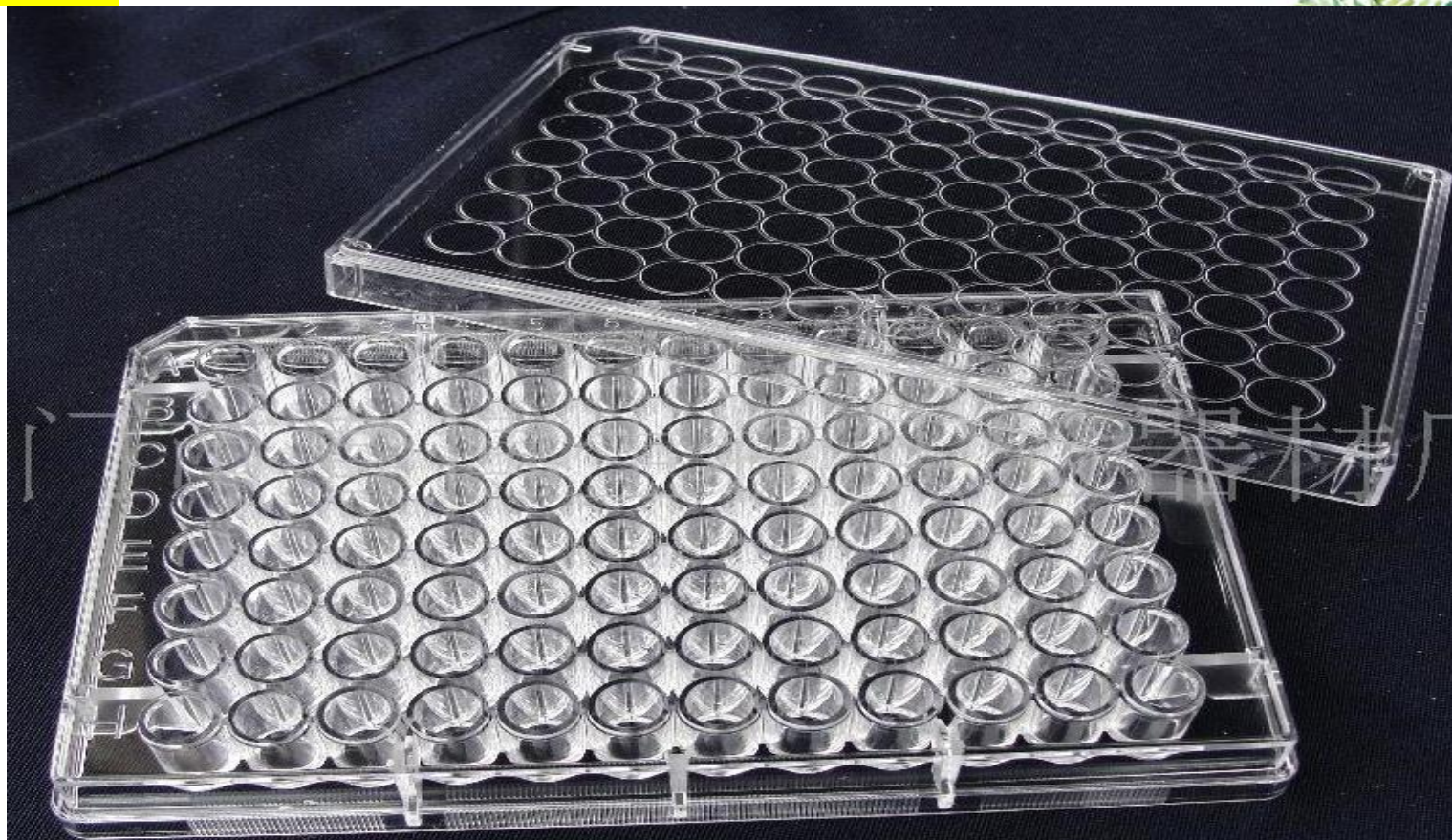
培养面积	最大容积	工作容积
21cm ²	17ml	6-7ml
58cm ²	70ml	16-17ml
75cm ²	250ml	15-38ml
175cm ²	650ml	20-85ml
25cm ²	50ml	5-10ml
83.6cm ²	110ml	20-40ml



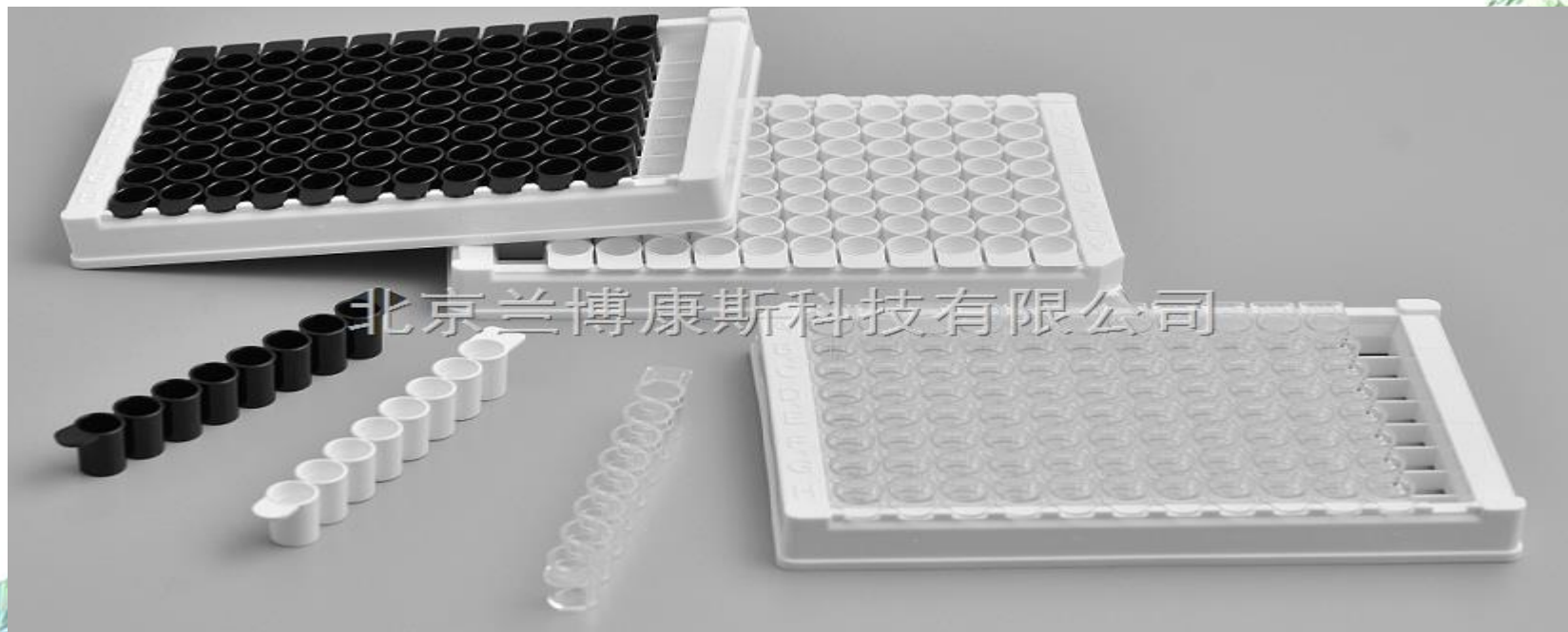




96孔板



酶标板



培养皿



✚ 3.2 盛装器皿：

✚ 药品溶解或各种培养基母液储备，包括常用各种规格的烧杯和试剂瓶。



•封口膜





量筒,





八通道微量移液器

玻璃胶头滴管



⊕ **金属用具：**主要用于解剖，取材，剪切组织，常用刀剪镊。





回顾：

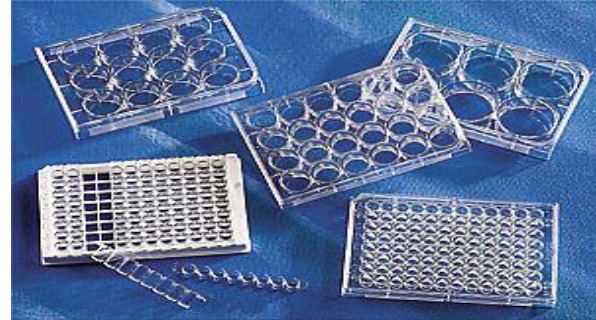
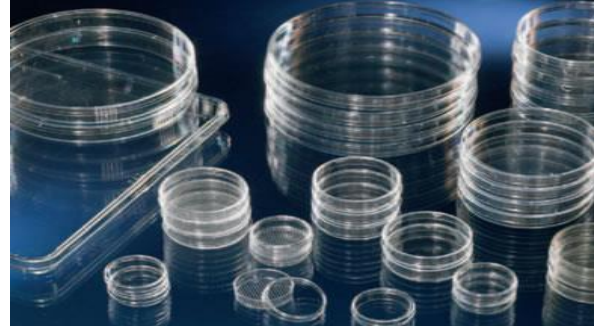
有个房子

有个箱子

有个台子

有一堆仪器。





**外植体
(explant)
细胞培养体外
环境**



动物细胞实验室及基本操作

动物细胞实验室基本配置

无菌室的基本设计

基本实验室、辅助实验室

无菌室的基本设备

净化台、CO₂、培养箱、倒置显微镜等

培养所需器皿

培养器皿、盛装器皿、金属材质用具等

动物细胞培养基本试剂

基本培养液、血清、PBS、胰蛋白酶溶液等

无菌、pH、分装、储存

动物细胞培养基本准备

清洗

包装

灭菌与消毒

无菌操作

物理消毒, 干热灭菌, 湿热灭菌, 滤过除菌, 化学消毒等

第三节

动物细胞培养的基本技能



细胞工程学的基础技能主要是**围绕着**
无菌这个主题进行的，主要包括三个方面：

清洗，消毒，无菌操作。

清洗与消毒是细胞培养实验的准备阶段，分门别类有不同的游戏规则。



(一) 清洗

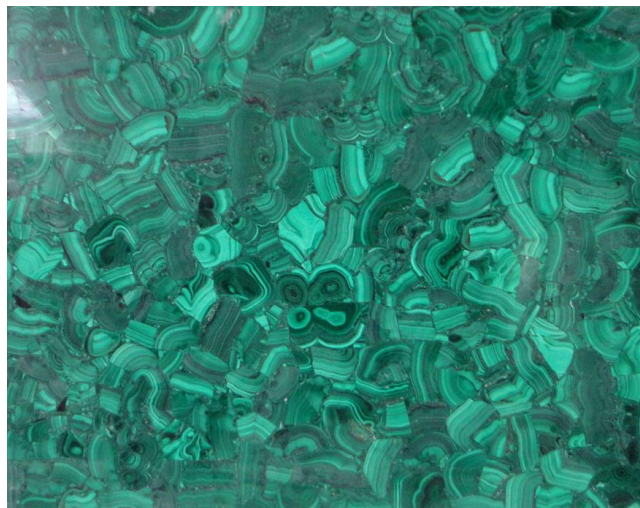


1、洗液：硫酸-重铬酸钾溶液。

洗液可根据需要配制成不同的强度(见下表)。


成分↕	强酸洗液↕		次强酸洗液↕	
重铬酸钾↕	63...g↕	3 150...g↕	120...g↕	6 000...g↕
浓硫酸(工业)↕	1 000 mL↕	50 000 mL↕	200 mL↕	10 000 mL↕
蒸馏水↕	200 mL↕	10 000 mL↕	1 000 mL↕	50 000 mL↕





洗液配置



- (1) 将**重铬酸钾**放入大烧杯中，加入蒸馏水，放在石棉网上加热至沸腾并搅拌，使重铬酸钾充分溶解。
 - (2) 将重铬酸钾液倒入酸缸中，然后**缓慢加入硫酸**并用一长玻璃棒不断搅拌，充分混合溶解。
- 操作时务必**注意安全**，穿戴好耐酸手套，防止洗液溅到皮肤和衣物上。万一不慎溅到皮肤上应立即用大量清水冲洗。
- 

2、清洗的原则：

所有东西都要非常仔细的，反复的、分门别类的洗……





- **新玻璃器皿**的清洗：

- 先用自来水刷洗，再浸泡5%稀盐酸以中和玻璃表面的碱性物质和其他有害物质。





✿新胶塞:

- (1) 应先用清水清洗之后, 再用0.2%NaOH煮沸10-20min。
- (2) 自来水清洗10次。
- (3) 再用1%稀盐酸浸泡30 min。
- (4) 自来水清洗10次, 蒸馏水涮洗3次。晾干, 高压灭菌。

✿旧胶塞不必用酸碱处理可直接用洗涤剂煮沸和清洗数次, 过蒸馏水, 晾干, 包装并高压灭菌后, 便可使用。





✿ 使用过的玻璃器皿, 耐酸塑料的清洗

(1) 使用过的培养用品应立即浸入清水, 加入洗涤剂, 避免干涸难洗。

(2) 清洗玻璃器皿, 自来水清洗数遍, 倒置自然干燥。

(3) 浸酸性洗液, 浸没, 过夜。

(4) 从酸性洗液捞出后, 自来水冲洗10-15次去除残余酸液, 蒸馏水(一蒸, 双蒸, 三蒸)涮洗3次, 倒置烘干。

(5) 包装(牛皮纸或医用饭盒), 贮存备用



浸泡

自来水，洗涤剂

刷洗

软毛刷，晾干

浸酸

酸液，过夜，不
少于6个小时


清洗

晾干
自来水15次，重蒸
水、三蒸水各5次，

包装

牛皮纸，铝制饭盒



- 动物细胞体外培养条件
 - 培养器皿
 - 动物细胞常用溶液：
 - 培养液，胰酶，平衡溶液，双抗。
 - DMEM, 1640, PBS, Hank' s,
 - 维持，生长，合成，人工，条件，完全，基本培养液。
 - 细胞培养的三大操作：洗，灭菌，无菌操作
- 

第二节

动物细胞培养的常规试剂



1、细胞培养液

● 根据其是否能促进细胞生长, 可分为:

● **生长培养液 (growth medium)** : 细胞快速生长。

● **维持培养液 (maintenance medium)** : 细胞存活, 不分裂, 如病毒疫苗的生产。





- **条件培养基 (condition medium) 。**
- 在培养过程中, 有些细胞可能会分泌活性物质到培养液中, 这种培养过某种细胞以后, 含有细胞分泌物的培养液

如：培养过子宫上皮细胞的培养液！



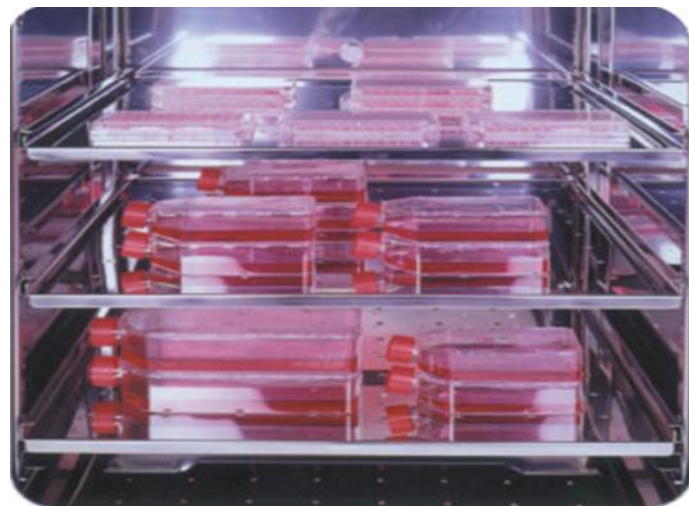
tic medium) 和天然



● 合成培养基（维持培养液，基本培养液）：

Earle's MEM, DMEM, RPMI1640

● 成分明确，人工合成；无菌，PH值稳定



合成培养液的基本成分



- 无离子水
- 无机盐类：形成稳定的等渗溶液
- 维生素
- 缓冲系统： $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 系统（酚红指示：中性时为红色，酸性时为黄色，碱性时为紫粉色）
- 能源和碳源：葡萄糖，丙酮酸等
- 氮源：成分明确与不明确的氨基酸





功能

实验

来源

维持培养基

基本培养基

合成培养基

=



生长培养基

=

完全培养基

=

天然培养基 + 合成培养基

完全培养液=9基本培养液+1胎牛血清



注意！



● 常规培养使用的培养基为**完全培养液**，基本培养液以90ml为单位进行分装。**4℃保存。**

● 基本培养基（**合成培养基，DMEM, 1640等**）+ **天然培养基（小牛血清）**按一定比例（**9：1**）**配制而成。**

● **抗生素（双抗）：青链霉素100单位/ml，-20℃，分装保存。**



2、平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS)



PH?

- 用做洗涤细胞, 组织或配制各种培养用液的基础溶液, 如Hank, s , PBS等。
- 具有维持渗透压, 调控酸碱平衡的作用
- 能供给细胞生存所需的能量和无机离子成分

PBS：磷酸缓冲盐溶液——具有pH缓冲作用的等渗盐溶液。

pbs

Hank's液

- 磷酸二 **不含钙镁的：D-PBS, D-HANKS**

- 磷酸氢二钠，

- KCl；

- CaCl_2 ；

- **Hank's液**

- **平衡盐溶液——无机盐和葡萄糖浓度接近大部分动植物细胞的水平，可作为动植物细胞短期培养（保存）。**





3、胰蛋白酶溶液(胰酶)

- 一种常用的细胞消化液；
- 常用胰酶活力为1：125或1：250；
- 0.02%EDTA溶液。
- 注意：配制胰酶溶液时应选用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ；

● 固体胰蛋白酶用什么配置？PH？





胰蛋白酶：-20° C储存，开瓶即分装，9ml为基础单位



4 其它

●水：细胞培养用水必须非常纯净，不含有离子和其他的杂质。需要用**新鲜的**双蒸水、三蒸水或纯净水，超纯水。

●青、链霉素溶液（双抗）：使青链霉素的浓度最终为100单位/ml 。

●**二甲基桉枫DMSO**：分析级，细胞冻存液

所有试剂基本处理标准：



- 1、无菌化
- 2、分装：新开封试剂必须小包装分装，如培养液90ml分装，血清、胰蛋白酶10ml分装，
- 3、储存：培养液4℃，胰酶，血清，双抗皆-20℃储存。





二、无菌化—消杀



动物细胞实验室及基本操作

动物细胞实验室基本配置

无菌室的基本设计

基本实验室、辅助实验室

无菌室的基本设备

净化台、CO₂、培养箱、倒置显微镜等

培养所需器皿

培养器皿、盛装器皿、金属材质用具等

动物细胞培养基本试剂

基本培养液、血清、PBS、胰蛋白酶溶液等

无菌、pH、分装、储存

动物细胞培养基本准备

清洗

包装

灭菌与消毒

无菌操作

(二) 灭菌消毒

- 物理消毒法
 - 紫外消毒
 - 湿热灭菌
 - 干热灭菌
 - 过滤除菌法
- 化学消毒法



1 紫外消毒



革兰阴性菌最为敏感，

的抵抗力最弱

顶奇而使其
射产生的臭

So, 不能对什么样的东东进行消毒（照射）？





- **对象：** 实验室空气，操作工作台，不能接触高温灭菌的物品（塑料制品之类）。



- 紫外灯的消毒效果同紫外灯的**辐射强度和照射剂量**呈正相关, :
- **离地面2米的30W灯可照射9平方米房间**, 2.5米照射效果较差。
- 紫外灯照射工作台的距离不应超过1.5米, **照射时间15—20分钟为宜。**



2 高温湿热灭菌



● **压力蒸汽灭菌**是最常用的高温湿热灭菌方法。

● **高温湿热灭菌不能对什么物质进行灭菌？**





- 对生物材料有良好的穿透力, 能造成蛋白质变性凝固而使微生物死亡。

- 布类、玻璃器皿、金属器皿、胶塞和某些培养用液。











①首先查看高压锅内的水是否充足，放入物品盖好盖。

②加热灭菌锅。将放气阀打开，放气5—10 min，以排除锅内的冷空气。

③落下放气阀继续升温升压，玻璃器皿等用15磅(121℃)30 min，胶塞、塑料制品、溶液等可用10磅(115℃)20 min。


④停止加热，待压力自然下降至0再打开放气阀排汽，开盖，取出高压灭菌的物品烘干。





- 不同压力蒸汽所达到的**温度不同**,不同消毒物品所需的有效消毒压力和时间不同。

- 从压力蒸汽消毒器中取出消毒好的物品(**不包括液体**),应立即放到60-70℃烤箱内**烘干**,再贮存备用。



3 高温干热消毒

●干热灭菌：保证温度 160°C 以上，保持90–120min，用于RNA提取实验的用品则需 180°C ，保温5–8 h。杀死细菌和芽孢，达到灭菌目的。

●相对于湿热灭菌，高温干热消毒的方法有什么样的优劣势？

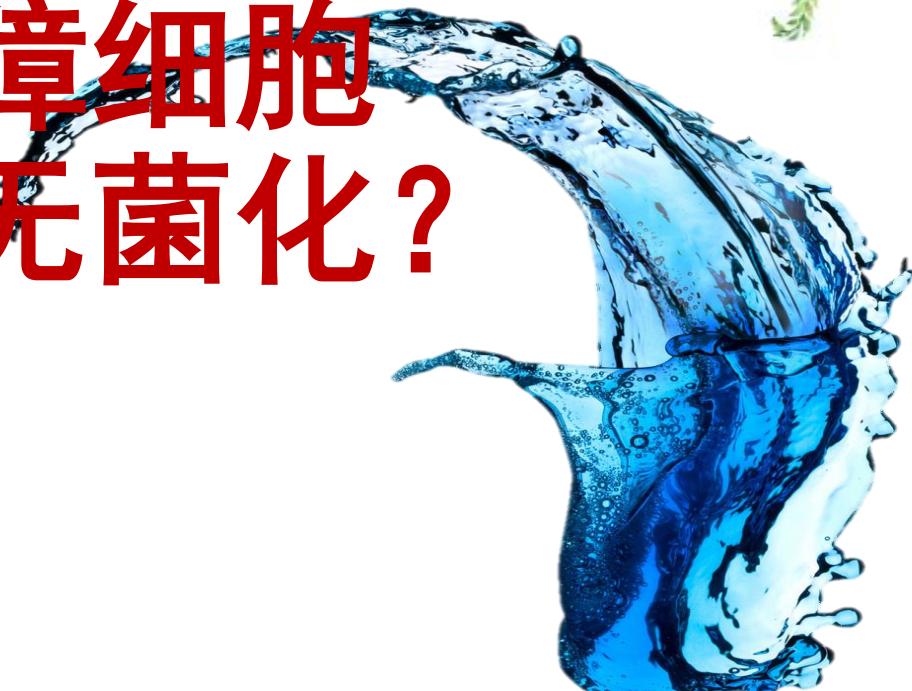


● **主要用于灭菌玻璃器皿（如体积较大的烧杯、培养瓶）、金属器皿以及不能与蒸汽接触的物品（如粉剂、油剂）。**

● **干热灭菌后要关掉开关，并使物品逐渐冷却后在打开，切忌立即打开，以免温度骤变而使箱内的玻璃器皿破裂。**



以上三种灭菌方法
是否可以保障细胞
培养工作的无菌化？



4 过滤除菌

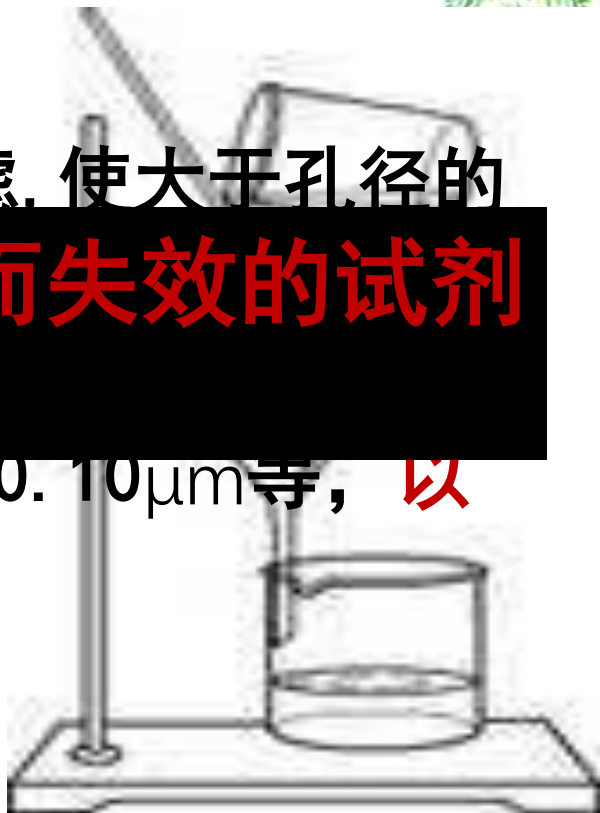


• 滤器：

• 原理：是将液体用微孔薄膜过滤，使大于孔径的

• 大多用于遇热容易变性而失效的试剂或培养液。

• 滤膜孔径有 $0.60\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.10\mu\text{m}$ 等，以 $0.22\mu\text{m}$ 除菌最为保险。

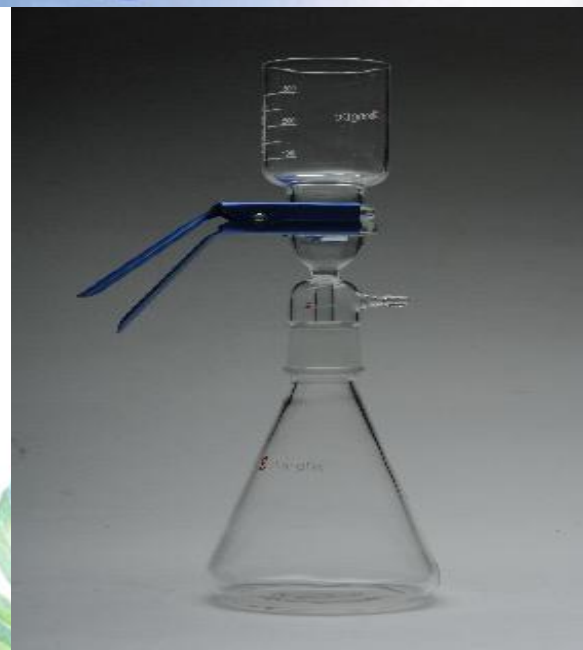




金属滤器 (直径90 mm、100 mm、142 mm……等),
配以过滤泵使用。

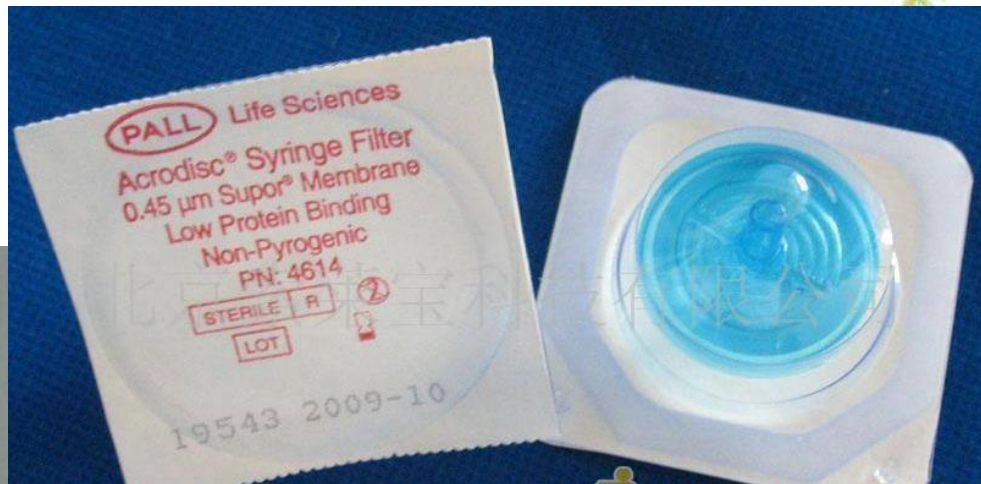


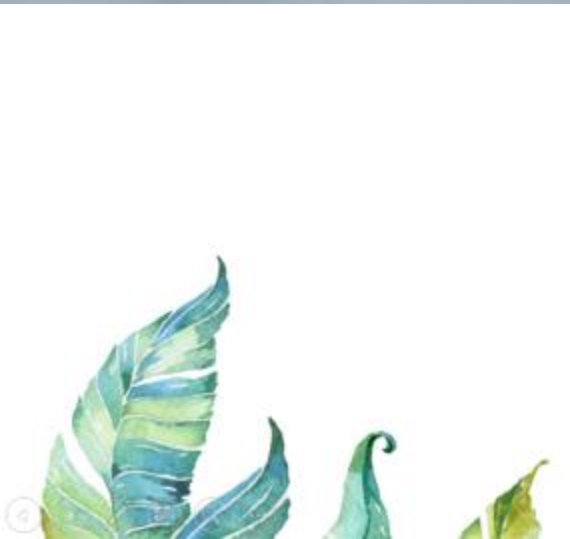






- 过滤量较小的液体常用注射器推动的**塑料小滤器**(直径20 mm、25 mm等)。







一次性真空式过滤器



参数 对象

- 紫外消毒
- 高压湿灭
- 高压干灭
- 过滤除菌



还有没有？



5 化学消毒法

常用的消毒液有如下几种：

(1) 70% (或75%) 酒精：超净台里常备70%酒精棉球(医用酒精)，用于手和一些金属器械或工作台面的消毒。

(2) 0.1%新洁尔灭：现用现配，手和前臂的清洗以及工作后超净台面的清洁。



(3) 来苏儿水(甲酚皂溶液)：主要用于无菌室桌椅、墙壁、地面的消毒和清洗，以及空气喷撒消毒。



(4) 0.5%过氧乙酸：是强效消毒剂，10 min即可将芽孢菌杀死。用于各种物品的表面消毒，用喷撒和擦拭方式进行。

(5) 乳酸蒸气：将乳酸放入坩锅内用酒精灯或电炉加热至沸腾为止。将门窗紧闭1—3 d。可将空气中漂浮的微生物杀死。

(6) 37%甲醛加高锰酸钾：使用前先紧闭门窗。将37%甲醛用酒精灯或电炉加热至沸腾后断电或灭火。用一张纸盛好适量的高锰酸钾，迅速放入已加热好的甲醛中形成蒸气。1—3d后方可达到消毒空气的目的。

- 
- **臭氧：为溶菌级方法**，杀菌彻底，无残留，杀菌广谱，可杀灭细菌繁殖体和芽孢、病毒、真菌等，并可破坏肉毒杆菌毒素。另外，对霉菌也有极强的杀灭作用
 - **臭氧对人体呼吸道粘膜有刺激**，消毒后至少过30分钟才能进入。
 - **强氧化剂**，对多种物品有损坏。
- 

● 烧灼也是灭菌方法之一，常利用台面上的酒精灯的火焰对金属器皿及玻璃器皿口缘进行烧灼消毒。

● 煮沸





不耐热的塑料制品的消毒



(1) 浸泡在70%乙醇1H以上，备用。

(2) 临用前从70%乙醇中取出，在超净台内紫外线照射1H左右方可使用。



PBS

DMSO

刀剪镊

抗生素

血清

细胞培养箱

二甲苯

三蒸水

胰蛋白酶

滤膜

离心机

抗生素

DMEM

老鼠体表

96孔培养板

操作台

实验室地面

培养瓶

离心管

解剖器械

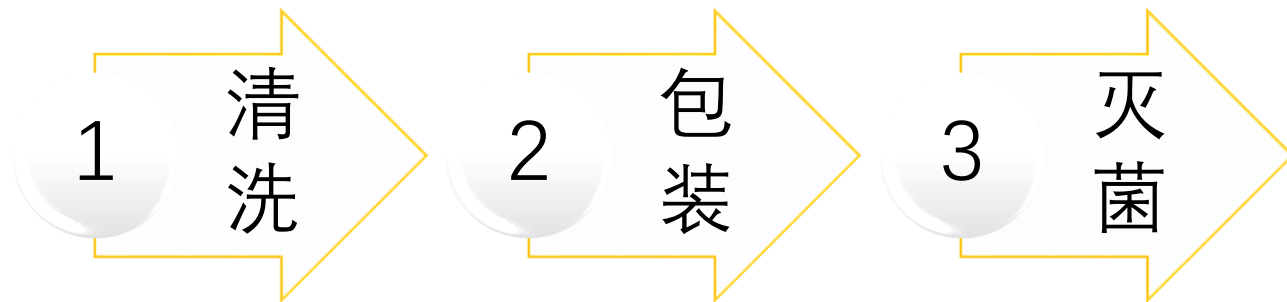
手

地面

显微镜

Hank's液







四、 无菌操作的基本原则

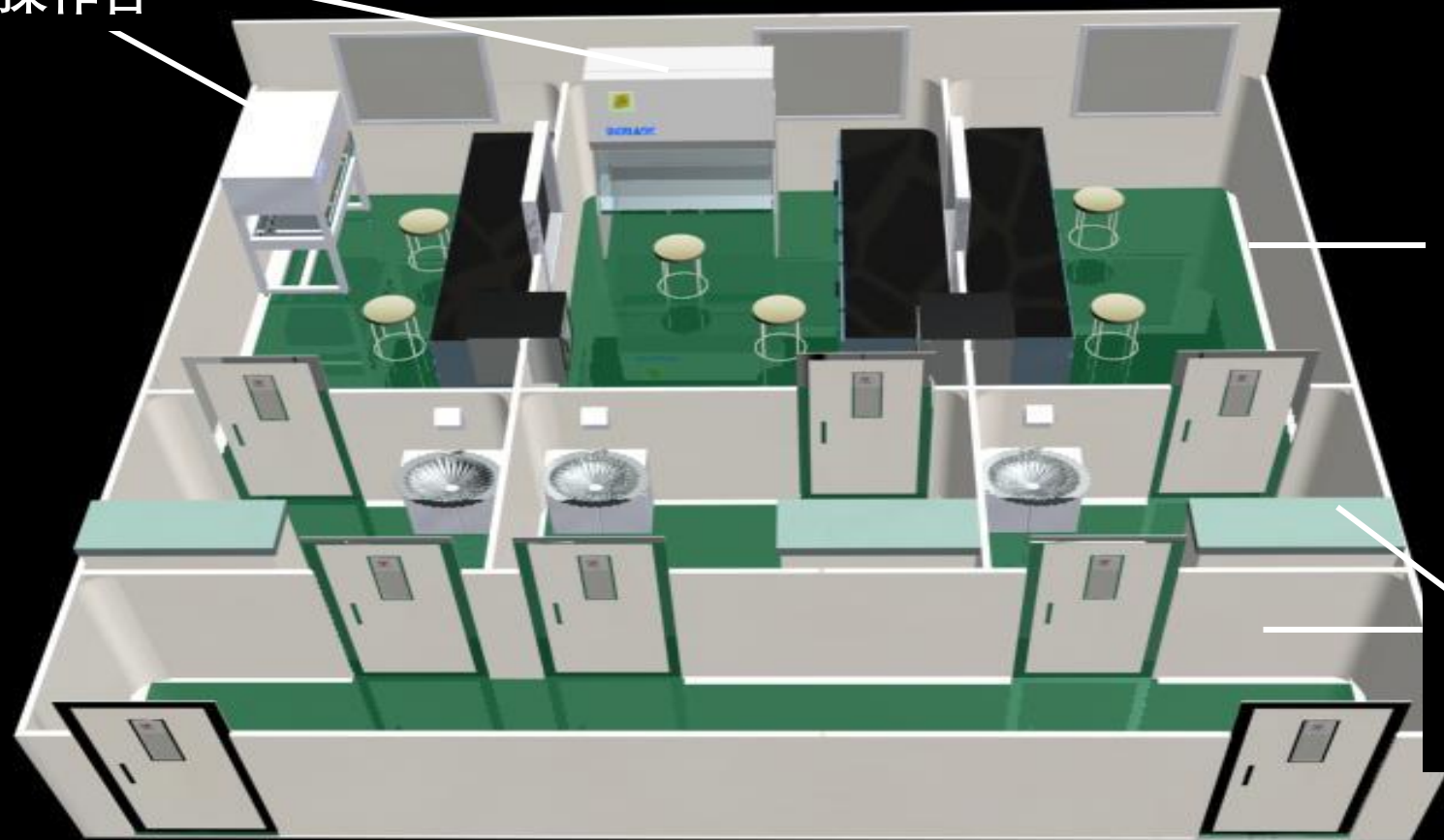


大概安排

- 周值日
- 日消毒-夜消毒
- 进进出出都要酒精消毒
- 酒精灯前操作，每次操作都要灼烧
- 合理安排格局与计划，减少出入
- 少开盖，少人，少说话，少生病



无菌操作台



接种区

缓冲准备区

动物细胞实验室及基本操作

动物细胞实验室基本配置

无菌室的基本设计

基本实验室、辅助实验室

无菌室的基本设备

净化台、CO₂培养箱、倒置显微镜等

培养所需器皿

培养器皿、盛装器皿、金属材质用具等

动物细胞培养基本试剂

基本培养液、血清、PBS、胰蛋白酶溶液等

无菌、pH、分装、储存

动物细胞培养基本准备

清洗

包装

灭菌与消毒

无菌操作

物理消毒, 干热灭菌, 湿热灭菌, 滤过除菌, 化学消毒等

本节要点

- 动物细胞体外培养条件。
- 细胞培养液（配方），胰蛋白酶，血清的储存原则。
- 各消毒灭菌方式的针对性应用。
- 各消毒灭菌的操作参数（时间，压力，温度等）。
- 玻璃器皿，塑料器皿的清洗步骤。
- 综合训练：一个空房间改造成无菌室，要求：交付时，可以立刻开展细胞培养实验。