在普通实验室开展本科生动物细胞培养教学实验的设想

陈思怀, 高继业, 唐发书 (西南大学动物科学学院, 重庆 402460)

摘要 分析了在普通实验室开展细胞培养需解决细胞培养箱的替代、具备细胞显微观察工具和实验全程无污染 3 个关键问题, 并提出解决的措施与可行性方案。以期在普通实验室完成细胞培养, 为本科生的细胞生物学教学实验开设提供参考。

关键词 细胞培养; CO₂ 培养箱; 倒置显微镜; 细胞污染

中图分类号 S-01 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)09-0220-02

Ideas of Carrying out Teaching Experiments of Animal Cell Culture for Undergraduate in General Laboratory

CHEN Si-huai, GAO Ji-ye, TANG Fa-shu (College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460)

Abstract Three key problems about carrying out cell culture in general laboratory were analyzed, including replacement of cell incubator, microscopic observation and no pollution in whole experiment. According to the problems, the measures and practical schemes were also worked out. From this paper, we hoped that cell culture could be completed without special laboratory and provide some references for experimental teaching of cell biology.

Key words Cell culture; CO₂ incubator; Inverted microscope; Cell contamination

细胞生物学是我国生命学科的四大学科之一, 其实验课程的开设有助于学生对理论知识的深入理解、实验原理和基本实验技能的掌握^[1]。本科段的实验项目主要包括验证性实验、综合性实验、创新性实验; 其内容主要包括细胞的原代和传代培养、细胞核型分析、细胞融合、细胞免疫化学染色、细胞的基因转染、细胞凋亡检测等, 开设的实验均涉及细胞培养或以培养的细胞作为实验材料。而完成细胞培养需具有净化操作间(万级)、细胞培养箱和倒置显微镜 3 种必备的实验设备。然而在我国高等农林院校中虽建有标准的细胞培养室和购置有相关细胞培养设备, 但相关仪器放置于细胞培养室, 主要用于教师和研究生的科研实验, 未对本科生开放。究其原因主要是本科学生人数众多, 细胞室无法容纳以及人员与物品的频繁出入势必造成细胞室的污染。这也是较多高校开设细胞生物学仅有理论教学而无实验课程的根本原因。在拥有生化培养箱、超净工作台、水浴锅、低速离心机等常规仪器设备的普通实验室能否开展细胞培养及其相关实验关键要解决以下 3 个问题: 细胞培养箱的替代、细胞显微观察工具和实验全程无污染。笔者针对此 3 问题分析其解决措施与可行性设想, 以期在普通实验室完成细胞培养, 为本科生的细胞生物学实验开设提供参考。

1 细胞培养箱的替代

1.1 CO₂ 培养装置的必要性 细胞的生长需要合适的温度、湿度、培养基、稳定的 pH 以及理想的气体环境。其中商品化的培养基, 如 MEM、DMEM、M199、RPMI1640、IMDM、DMEM/F12 以及 McCoy's 5A 等均以 HCO₃⁻/CO₂ 作为维持 pH 恒定的缓冲体系; 同时 CO₂ 既是细胞的代谢产物, 也是细胞生长所必需的营养成分, 故培养环境中需要 CO₂^[2]。若细胞采用开放式培养体系, 由于 HCO₃⁻ 的水解, 生成的 CO₂ 逃逸, OH⁻ 增多致 pH 升高, 细胞生长受影响或死亡^[3]。但应用

CO₂ 培养箱或三气(O₂/N₂/CO₂) 培养箱供给稳定的 CO₂ 即可解决 pH 恒定和细胞所需 CO₂。由于仪器的昂贵, 通常配置于细胞室, 而在普通实验室仅有生化培养箱。目前应用生化培养箱开展细胞培养有 2 种方式: 一是采用封闭培养系统如密闭培养瓶则靠高密度接种细胞的代谢生成 CO₂ 以满足气体的需要, 但这种方式存在瓶内气体交换障碍、瓶内因冷空气受热、水蒸气、水解或代谢释放 CO₂ 等导致气压升高等缺陷, 严重影响细胞的增殖; 另一种方式采用美国 celartia 公司生产的 Petaka 培养板, 利用其独特的 O₂ 交换设计和 CO₂ 累积系统, 可在普通培养箱完成细胞培养^[4]。但该培养板使用成本高(50 元/块)以及不能完成需多水平、多重复的细胞培养实验分组。除这 2 种方式自身缺陷外, 在实际细胞培养时常采用透气型培养瓶以及培养皿、多孔培养板、培养玻片等本身无法密闭的培养器皿, 这些决定细胞培养应采用开放体系, 开展细胞培养需要 CO₂ 培养装置。

1.2 CO₂ 培养箱的替代 普通实验室无 CO₂ 培养箱, 则通过制作简易 CO₂ 培养装置予以代替。郭进林等^[5] 报道了应用氯仿把 3 块有机玻板黏结成无底的正方体, 倒扣于盛有硫酸铜溶液的水槽中作为细胞培养瓶存放空间, 定量 NaHCO₃ 与稀硫酸制备所需浓度(5%) CO₂ 并输入简易装置内, 成功开展了杂交瘤细胞的培养^[5]; 皮至明等^[6] 应用生化培养箱作温度源, 干燥器作为局部密闭空间, 通过定量 NaHCO₃ 与稀盐酸制备所需浓度(5%)的 CO₂, 对 B95-8 细胞株、Raji 细胞株连续培养 3 个月, 细胞生长良好并保持细胞原有特性^[6]。这 2 种简易装置虽有 CO₂ 培养箱的功能, 但有待改进的地方, 如取放细胞培养瓶/板时需把装置移出培养箱; 装置的四壁为热的不良导体, 装置内培养液到达 37 °C 所需时间较长; 培养箱开门后冷空气的进入导致装置壁上有冷凝水。为此, 欲进行简易装置的如下改良: 以薄壁不锈钢钢板焊制两个边长相差 1~2 cm 的无顶正方体, 小正方体固定于大正方体中, 间隙填充饱和磷酸氢二钠溶液, 制作高 5~7 cm 的长方体盖浸没于两正方体的溶液中。并在正方体底侧开孔, 连接硅胶管作为定量 NaHCO₃ 与稀盐酸制备 CO₂ 的输

基金项目 西南大学实验教改项目(SYJ2016053)。

作者简介 陈思怀(1975—), 男, 四川泸州人, 副教授, 硕士, 从事动物胚胎学、细胞生物学的教学与科研。

收稿日期 2017-11-28

入,在盖上开排放空气的开关孔和连接气压平衡小管的孔,气压平衡管的末端连接直径极小的毛细管或胚胎吸管,既控制 CO₂ 扩散速度,又可平衡箱内气压,保证细胞培养 48~72 h 换液或观察时剩留一定的 CO₂。该装置模拟培养箱的水套式加热,温度波动小,开盖简单,取放培养物方便。实现无 CO₂ 培养箱的条件下完成细胞的开放式培养。

2 细胞的观察与拍照

学生完成细胞的观察及其拍照需解决 3 个问题,即显微工具、培养基的 pH 变化以及得到细胞图片。通常细胞研究室购有倒置显微镜、倒置相差显微镜或者倒置荧光显微镜,但因用于细胞研究常把这些仪器放置在细胞培养室,同样在普通实验室没有倒置显微镜。为了观察细胞的生长状况和实验结果,可根据李新发^[7]的方法对废旧正置普通光学显微镜进行改造,自制倒置显微镜。以 6~15V 灯泡作光源,目镜中的透镜作聚光镜,物镜转化器固定于载物台下方的暗盒上,物镜的成像经三棱镜和平面镜改变光线方向进入目镜,同样在 100×、400× 放大倍率依托原显微镜的调焦螺旋调焦观察到细胞^[7]。若实验结果需要荧光倒置显微镜观察,如观察细胞转染绿色荧光蛋白基因(GFP)后的表达情况,则建议改变实验方案,变为 GFP 基因的 mRNA 的表达检测。需对观察视野拍照时,可在目镜筒上固定一个手机夹,利用智能手机拍照;也可以插入黏贴有高分辨率电脑摄像头的目镜,通过电脑截图^[8];若有条件则可在目镜筒上安装带电荷耦合装置(CCD)的电子目镜完成拍照。学生观察培养物时由于人数与分组多,导致细胞离开 CO₂ 环境时间较长,培养基中 HCO₃⁻ 的水解致 PH 升高,对细胞的后续培养不利。为了解决此问题,可以在培养基中添加两性离子 HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)稳定 pH;也可采用磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、β-甘油磷酸钠构成缓冲体系的培养基消除 pH 的升高^[9]。

3 实验全程污染的解决

在解决细胞培养条件后,细胞能否成功培养关键要消除细胞的细菌、病毒、真菌等微生物在实验用品准备、取材、细胞分离、细胞培养以及细胞观察等实验全程的污染。实验用品的除菌包括玻璃器材的干热灭菌、塑料及金属器材的湿热灭菌、培养用液的过滤除菌;在取材上根据细胞培养类型尽量让学生取材健康无菌的动物组织器官,尤其避免取材于皮肤、消化道、气管等需严格处理的器官;细胞的分离过程中严格遵守无菌操作,实验对象移出超净台必须封盖或封口包

装。操作全程要求学生克服在超净台内以倾倒方式转移液体、器材掉落台面继续使用、手触碰移液管以及手经常伸出超净台等不良习惯与错误操作;细胞培养过程中由于生化培养箱与简易 CO₂ 培养箱装置的空气均是污染的,欲消除或降低培养物的污染可采取以下措施:培养基中添加如青霉素、链霉素、两性霉素 B 等抗生素以抑制细菌或真菌的生长;细胞培养瓶则选用带滤膜(0.1 μm)瓶盖的一次性培养瓶;细胞培养皿、培养板以及培养载玻片等培养器材则选用医用灭菌纸塑包装袋包装,实现无污染的开放培养^[10]。观察细胞时可将体积小、重量轻的自制倒置显微镜放置超净工作台中心(目镜在挡板外),对开放性器皿观察完毕后换新的灭菌纸塑包装袋重新密封,完成后续培养。

4 结语

通过简易 CO₂ 培养装置、自制倒置显微镜的替代,实验全程污染控制措施的实施,在普通实验室完成细胞培养教学实验的方案是可行的,但还需经过细胞培养操作实践予以检验,尤其对成纤维型、上皮型、悬浮细胞型、细胞株/系等不同类型细胞的原代或传代培养。在简易培养装置的 CO₂ 扩散规律、细胞形态与功能是否改变、培养物微生物污染检测等方面还需深入研究;替代的自制装置仍需改进改良;教师根据教学大纲、人才培养方案对实验项目进行优化设计,以期使本科生的细胞生物学实验课程能成功开设。

参考文献

- [1] 王颖,何成明,胡仁建. 细胞生物学实验创新性教学改革初探[J]. 实验室科学,2013,16(6):90-92.
 - [2] 谷鸿喜,张凤民,凌虹. 细胞培养技术[M]. 北京:北京大学医学出版社,2012:23-24.
 - [3] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:46-50.
 - [4] HERRERA G, DÍAZ L, BARBERÁ-GUILLEM E, et al. Novel hermetic cell culture containers (Petaka™) and cytotoxic assays for testing sustained in vitro toxicity and general cell biological research[J]. Toxicology letters, 2010, 196:147.
 - [5] 郭进林,吴惠联,张玉昆. 一种简易实用的 CO₂ 培养装置[J]. 细胞生物学杂志,1992(3):144-145.
 - [6] 皮至明,成积儒. 自制简易 CO₂ 温箱在细胞培养实验中的应用[J]. 癌症,1995,14(1):66-67.
 - [7] 李新发. 用废旧显微镜改装成倒置显微镜[J]. 第四军医大学学报,1989,10(6):426-427.
 - [8] 洪亚平,侯小改. 低成本制作光学显微镜(正立、倒置)/解剖镜的实时观察与记录系统[J]. 生物学通报,2007,42(4):51.
 - [9] VISTICA D T, SCUDIERO D A, SKEHAN P, et al. New carbon dioxide-independent basal growth medium for culture of diverse tumor and nontumor cells of human and nonhuman origin[J]. Journal of the national cancer institute, 1990, 82(12):1055-1061.
 - [10] 夏银凤,陈建斌,王志杰. 透析纸阻菌性研究[C]//中国造纸学会第十五届学术年会论文集. 北京:中国造纸学会,2012:263-266.
- (上接第 216 页)
- 报,2017,36(7):159-161.
- [5] 乔连全. 我国研究型大学“大学生创新性实验计划”的现状与反思[J]. 高等教育研究,2011(3):81-87.
 - [6] 张英. 论本科生科研与教学之融合:美国加州大学伯克利分校本科科研措施之启示[J]. 当代教育论坛,2012(2):87-90.
 - [7] 王立霞,李璟琦. 食品科学与工程专业实践教学与科研相结合的教学体系的探讨[J]. 农产品加工,2015(11):82-83,86.
 - [8] 张立超,刘飞. 将最新科研成果融入本科教学以激发学生的创新思维之探讨[J]. 安徽农学通报,2013,19(16):152-153.
- [1] 况伟,刘志伟,张晨,等. 我国大学本科食品专业现状调查与分析[J]. 广州化工,2015,42(1):135-136.
 - [2] 武国剑,柏祝玲,张金锋,等. 食品类专业本科毕业生就业状况调查与分析[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):14436-14438.
 - [3] 孙璐,武靓靓,孙娜,等. 将科研引入实践教学,加强《食品卫生学》教学效果[J]. 时代教育,2015(13):65-66.
 - [4] 夏滨,汤晓,潘鸿. 本科生科研实践能力培养论析[J]. 长春师范大学学