

原代细胞的培养与建系

凡是来源于胚胎、组织器官及外周血，经特殊分离方法制备而来的原初培养的细胞称之为原代细胞。细胞的纯化或细胞克隆技术是细胞培养工作的基础。

原代细胞的取材

人和动物细胞的取材是原代细胞培养成功的首要条件，直接影响细胞的体外培养。

一、取材的基本要求

- .1. 取材要注意新鲜和保鲜
- .2. 应严格无菌
- .3. 防止机械损伤
- .4. 去除无用组织和避免干燥
- .5. 应注意组织类型、分化程度、年龄等
- .6. 作好记录

二、各类组织的取材技术

皮肤和粘膜的取材

内脏和实体瘤的取材

血液细胞的取材

骨髓、羊水、胸/腹水细胞取材

动物组织取材

人胚体组织取材

鸡（鸭）鸟类胚胎组织取材鸡（鸭）鸟类胚胎组织取材

皮肤和粘膜的取材

主要取自于手术过程中的皮片，方法似外科取断层皮片手术操作，但面积一般 2~4 平方厘

米。

内脏和实体瘤的取材

内脏除消化道外基本是无菌的，但取材时要明确和熟悉所需组织的类型和部位，实体瘤取材时要取肿瘤细胞丰富的区域，要避免破溃、坏死液化部分，以防污染，尽量去除混杂的结缔组织。

血液细胞的取材

血细胞、淋巴细胞的取材，一般多抽取静脉外周血，或从淋巴组织中（如脾、扁桃体、胸腺、淋巴结等）分离细胞，取材时应注意抗凝。

骨髓、羊水、胸/腹水细胞取材

严格无菌，注意抗凝，还要尽快分离培养，离心后，用无钙、镁 PBS 洗两次，再用培养液洗一次后即可培养，不宜低温存放。

动物组织取材

1、鼠胚组织取材

首先用引颈或气管窒息致死法处死孕期合适的动物，然后将其整个浸泡在含有 75%酒精的烧杯中，5 分钟后（注意时间不能太长，以避免酒精从口或其他通道进入体内，影响组织活力），取出动物，在消毒过的木板上可用无菌的图钉或大头针固定四肢，切开皮肤，用无菌操作法解剖取胚或用无菌止血钳挟起皮肤、用无菌眼科剪沿躯干中部环形剪开皮肤，用止血钳分别挟住两侧皮肤拉向头尾，把动物反包，暴露躯干，然后再固定，更换无菌解剖器材，采用无菌操作法解剖取出胚胎。

2、幼鼠胚肾（或肺）取材

幼鼠采用上述方法处死消毒后，腹部朝上固定在木板上，先切开游离毛皮并拉开至两侧：然后采用无菌法打开胸腔取肺，或背部朝上固定在木板上，先将背部毛皮切开游离并拉向两侧，

然后采用无菌法从背部打开腹腔取肾。

人胚体组织取材

取材方法与鼠类相同

鸡（鸭）鸟类胚胎组织取材步骤

- (1) 取孵化至适当胚龄（9~12 天）的胚蛋，用照蛋灯在暗处灯检，若有丰富血管、胚体有运动的胚蛋，说明胚体发育良好，并用有色笔划出气室和胚体位置。
- (2) 将胚蛋置于蛋架上，先用温水清洗蛋壳，再用 75%酒精棉球擦干；
- (3) 经碘酒、75%酒精消毒后，在无菌条件下采用无菌法用剪刀或中号镊子打开气室，沿气室边缘去除蛋壳；
- (4) 用眼科镊撕去壳膜，暴露出鸡胚；
- (5) 用弯头镊轻挑起胚头，取出胚胎，放入无菌平皿中，解剖取材。

原代细胞的分离和制作

人或动物体内（或胚胎组织）由于多种细胞结合紧密，不利于各个细胞在体外培养中生长繁殖，必须将现有的组织块充分散开，使细胞解离出来。

一、悬浮细胞的分离方法

组织材料若来自血液、羊水、胸水或腹水的悬液材料，最简单的方法是采用 1000r/min 的低速离心 10 分钟。经离心后由于各种细胞的比重不同可在分层液中形成不同层，这样可根据需要收获目的细胞。

二、实体组织材料的分离方法

对于实体组织材料，由于细胞间结合紧密，为了使组织中的细胞充分分散，形成细胞悬液，可采用机械分散法（物理裂解）和消化分离法。

（一）机械分散法

方法:特点:简便、快速,但对组织机械损伤大,而且细胞分散效果差,适用于处理纤维成分少的软组织。

（二）消化分离法

组织消化法是把组织剪切成较小团块（或糊状），应用酶的生化作用和非酶的化学作用进一步使细胞间的桥连结构松动，使团块膨松，由块状变成絮状，此时再采用机械法，用吸管吹打分散或电磁搅拌或在摇珠瓶中振荡，使细胞团块得以较充分的分散，制成少量细胞群团和大量单个细胞的细胞悬液，接种培养后，细胞容易贴壁生长。

1. 酶消化分离法

酶消化分离法常采用胰蛋白酶和胶原酶

胰蛋白酶分散原理：胰蛋白酶是一种胰脏制品，对蛋白质有水介作用，主要作用于赖氨酸或精氨酸相连接的肽键，使细胞间质中的蛋白质水介而使细胞分散开。

影响胰蛋白酶作用的主要因素

细胞类型.酶的活力.酶的浓度.温度.pH .无机盐离子.消化时间

胶原酶（Collagenase）消化法

胶原酶是一种从细菌中提取出来的酶，对胶原有很强的消化作用。适于消化纤维性组织、上皮组织以及癌组织，它对细胞间质有较好的消化作用。

2. 非酶消化法（EDTA 消化法）

EDTA 是一种非酶消化物，又称螯合剂或 Versene，全名为乙烯二胺四乙酸。常用不含钙、镁离子的 PBS 配成 0.02%的工作液，对一些组织，尤其是上皮组织分散效果好，该化学物质能与细胞上的钙、镁离子结合形成螯合物，利用结合后的机械力使细胞变圆而分散细胞或使贴壁细胞从瓶壁上脱离。

3. 消化分离法的操作步骤

剪切.加液漂洗.消化.弃去消化液.漂洗.机械分散

4. 消化分离法的注意事项

(1) 组织块必须漂洗 2-3 次以除去组织中的钙、镁离子和血清对胰蛋白酶和 EDTA 的抑制作用。

(2) 胰蛋白浓度不宜过高，作用时间不能太长，以避免毒性作用。

(3) 消化后组织不仅要尽量弃去消化液，以避免毒性产生，而且动作要轻，以避免膨松的细胞随漂洗而丢失。

三、原代细胞的培养方法

原代细胞的培养也叫初代培养是从供体取得组织细胞在体外进行的首次培养，是建立细胞系的第一步，是一项基本技术。

原代细胞最接近和最能反映体内生长特性，适宜用于药物敏感性试验、细胞分化等实验研究。

(一) 组织块培养法

组织块培养是常用、简便易行和成功率较高的原代培养方法。

其基本方法是将剪成的小组织团块接种于培养瓶（或皿）中，瓶壁可预先涂以胶原薄层，以利于组织块粘着于瓶壁，使周边细胞能沿瓶壁向外生长。

(二) 消化培养法

(三) 悬浮细胞培养法

对于悬浮生长的细胞，如白血病细胞、淋巴细胞、骨髓细胞、胸水和腹水中的癌细胞和免疫细胞无需消化，可采用低速离心分离，直接培养，或经淋巴细胞分层液分离后接种培养。

(四) 器官培养

器官培养是指从供体取得器官或组织块后，不进行组织分离而直接在体外的特定环境条件下

培养,

器官培养可保持器官组织的相对完整性,可用于重点观察细胞间的联系、排列情况和相互影响,以及局部环境的生物调节作用。

原代和传代细胞的培养和维持

原代细胞的培养与维持

原代细胞培养的首次传代

传代细胞的传代培养

传代细胞的建系和维持

一、原代细胞的培养与维持

(一)原代细胞培养:

1. 静置贴壁细胞(包括半贴壁细胞的培养)培养
2. 悬浮细胞的培养

静置贴壁细胞(包括半贴壁细胞的培养)培养要求

细胞要通过充分漂洗,以尽量除去消化液的毒性;

细胞接种时浓度要稍大一些,至少为 5×10^8 细胞/L;

培养基可用 Eagle(MEM)或 DNEM 培养;

小牛血清浓度为 10%-80%;

应在 37°C 5% CO_2 的培养箱中培养;

在起始的 2 天中尽量减少振荡,以防止刚贴壁的细胞发生脱落,漂浮;

待细胞基本贴壁伸展并逐渐形成网状,应将原代细胞换液;

用骨髓或外周血中的悬浮细胞经静置培养 1 周时,应将细胞悬液经低速离心后换液;

悬浮细胞的培养要求

原代培养时要尽量去除红细胞；

短期培养，可在含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基中进行；

细胞浓度可在 $5-8 \times 10^9/L$ 范围内，.进行分瓶试验；

长期培养时，淋巴细胞中要加入生长因子，白血病细胞中要加入少量的原患者血清，以利细胞生长；

细胞换液一般每隔 3 天需半量换液一次；

细胞传代一般待细胞增殖加快、细胞密度较高时才能进行；

(二)原代细胞的维持

贴壁细胞长成网状或基本单层时，未达到饱和密度，需采取换液方式来更新营养成分以满足细胞继续生长繁殖的需要；

换入等量完全培养基或换成含 2%小牛血清的维持液；

悬浮细胞细胞培养基中不仅会发生转化而且会发生分裂繁殖，此时培养基中的营养成分并不能维持细胞的营养需求，需进行换液。通常采用半量换液的方法；

二、原代细胞培养的首次传代

原代培养后由于悬浮细胞增殖，数量增加甚至达饱和密度；贴壁细胞的相互汇合，使整个瓶底逐渐被细胞覆盖，细胞难以继续生长繁殖，需要进行分瓶培养，这种使原代细胞经分散接种的过程称之为传代。

首次传代应注意以下几点：

(1)细胞生长密度不高时，不能急于传代。

(2)原代培养的贴壁细胞需控制消化时间。

(3)吹打已消化的细胞应减少机械损伤。

(4)首次传代时细胞接种数量要多一些。

(5)首次传代培养的 pH 应偏低些。小牛血清浓度可加大至 15%~20%左右

三、传代细胞的传代培养

传代细胞，可根据不同细胞采取不同的方法进行细胞传代。贴壁生长的细胞用消化法传代，部分贴壁的细胞用直接吹打或用硅胶软刮的刮除法传代。悬浮细胞可采用加入等量新鲜培养基后直接吹打分散进行传代，或用自然沉降法加入新培养基后再吹打分散进行传代。

贴壁细胞的消化传代步骤

(1)吸除或倒掉原瓶中的旧培养基（以 25mL 培养瓶为例）。

(2)每瓶加入 2mL，无钙、镁 PBS，漂洗一次后倒掉。

(3)每瓶加入 1mL 消化液（0.25%胰蛋白酶或 0.02%EDTA 或混合液），轻轻摇动培养瓶，经消化液铺满所有细胞表面，待细胞层略有松动，肉眼可观察到“薄膜”现象时，倒掉消化液，再继续作用 2~3 分钟，轻轻摇动，细胞层可随残留的消化液呈片状从瓶壁上脱落下来，在显微镜下可发现细胞回缩变圆，细胞间隙增大，此时应立即终止消化。

(4)加入完全培养基 5mL，用吸管反复吹打瓶壁上的细胞，吹打时要按顺序进行，以确保所有瓶壁均吹打到，吹打时动作要轻柔，不要用力过大，尽可能不要出现泡沫，以避免细胞的机械损伤。

(5)用计数板计数，计算细胞的浓度，并用培养基调整适当的细胞浓度后再分瓶培养。

四、传代细胞的建系和维持

细胞系的维持通过换液传代再换液、再传代和细胞种子冻存来实现；

对每一个细胞系来说都有其自身的特点，要做好建系的维持必须记录好细胞档案,换液传代和做好细胞系（或株）的鉴定和管理工作；

原代细胞的纯化和克隆

体外培养的细胞绝大多数都呈混合生长，为了保证实验结果的可靠性、一致性、稳定性和可

重复性,要求采用单一种类细胞来进行实验,因而培养细胞的纯化就成为实验研究的重要一步。

一、细胞的纯化

细胞的纯化分为(一)自然纯化:长期传代过程中靠自然淘汰法,不断排挤其他生长慢的细胞,最后留下生长优势旺的细胞,达到细胞纯化的目的。如肿瘤突变细胞通过此方法建立细胞系。

(二)人工纯化:利用人为手段造成某一细胞生长有利的环境条件,抑制其他细胞的生长从而达到纯化细胞的目的。主要有以下 5 种方法。

1. 细胞因子依赖纯化法:通过加入某些特殊的细胞因子而纯化出只依赖于这种细胞因子生长的细胞系。

2. 酶消化法:利用上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶的耐受性不同,使两者分开,达到纯化的目的。另外对贴壁细胞与半贴壁及粘附细胞间的分离纯化也是十分有效的。

(1) 上皮细胞与成纤维细胞的分离纯化

两者在胰蛋白酶的作用下,由于成纤维细胞先脱壁,而上皮细胞要消化相当长的时间才脱壁,特别是在原代细胞初次传代和早期传代中两种差别尤为明显,故可采用多次差别消化方法将上皮细胞和成纤维细胞分开,

(2) 骨髓基质肌样细胞的纯化

在血液细胞和骨髓细胞静置培养时,常有许多肌样细胞和骨髓基质细胞贴壁生长,但也有许多淋巴细胞、单核细胞、粒细胞粘附其上,种类混杂,鉴于粘附细胞贴壁不牢固,也可用酶消化法使粘附细胞脱壁分离,以达到骨髓基质细胞或血液中肌样细胞与淋巴细胞分开和纯化的目的。

3. 机械刮除法

原代培养时,如果上皮细胞和成纤维细胞为分区成片混杂生长,每种细胞都以小片或区域性

分布的方式生长在瓶壁上。可采用机械的方法去除不需要的细胞区域而保留需要的细胞区域，

4. 反复贴壁法

成纤维细胞其贴壁过程快，能在短时间内完成附着过程，而上皮细胞在短时间内不能附着或附着不稳定，稍加振荡即浮起，利用此差别可以纯化细胞。

5. 电烙筛选法

在贴壁细胞转化时，在培养瓶的细胞层中会出现分散的转化灶，细胞密集、排列规则，有明显生长趋势，与周边未能转化的细胞有明显的区域界限，可用机械刮除法去除或用电烙筛选法烫死未转化细胞而保留转化灶细胞。

二、细胞的克隆化

细胞克隆技术又称单个细胞分离培养技术，即从细胞群体中分离出一个细胞，并使其在体外培养体系中能繁殖成新的细胞群体，这种由单个细胞所形成的细胞群（或集落）称为一个克隆，这种纯化后的细胞群体称为细胞株。

主要的克隆方法有 5 种

- (一) 毛细管克隆法
- (二) 有限稀释克隆法
- (三) 平皿克隆分离法
- (四) 软琼脂克隆分离法
- (五) 单细胞显微克隆法

毛细管克隆法：

- (1) 将一定量的细胞悬液（如 $10^5/\text{mL}$ 或更低）稀释至 1 个细胞/mL；
- (2) 取 10mL 稀释的细胞悬液，用直径为 0.5mm，长为 8mm 的毛细玻璃管若干（30~50 只），在负压作用下，使悬液吸入各毛细管中；

(3) 在倒镜下检查出每管只进入一个细胞的毛细管，然后放入适应性培养基或有饲养层细胞的培养瓶（或培养板）内；

(4) 在 CO₂ 培养箱中培养，由一个细胞在毛细管繁殖后，并向管外扩展，并形成单个克隆的细胞群体。

有限稀释克隆法：

(1) 取对数生长期的细胞制成悬液(贴壁细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后吹打分散制成)，经台盼蓝染色计数，测定活细胞数及浓度（细胞存活率及单个细胞百分率应高于 90%以上）。

(2) 将细胞悬液在试管中稀释，用培养基将细胞稀释至 50 个细胞/mL、10 个细胞/mL、5 个细胞/mL，将 3 种稀释度的细胞分别接种于 96 孔板中，每孔为 0.1mL，于 37℃5%CO₂ 下培养。

(3) 次日在倒置显微镜下观察培养板各孔中的细胞数，挑选只含一个细胞的孔，做好标记并补加 0.1mL 培养液继续培养。

(4) 培养期间，视 pH 值的变化决定是否换液或补加培养液，一周左右，孔中有明显克隆出现。

(5) 待克隆长至孔底面的 1/3 ~ 1/2 时，可用消化法将 96 孔中的单一克隆的细胞分别移至 24 孔板中进行扩大培养。

平皿克隆分离法：

(1) 将对数生长期细胞制备单个细胞悬液（悬浮细胞用吸管吹打分散，贴壁细胞先用 0.25% 胰蛋白酶消化后，再用培养基吹打分散）计数并用培养基调整细胞浓度，使 5mL 培养液内含有 50 ~ 200 个细胞（细胞存活率及单个细胞百分率应大于 90%以上）。

(2) 将上述细胞悬液迅速移入 60mm 平皿中，在 37℃5% CO₂ 下培养 1 周或更长。若有明显的克隆形成时方可进行克隆分离，方法有两种：

①套环法：在倒置显微镜下观察克隆形成的情况，标记单个克隆周边，吸干培养基，用涂有少量无菌硅脂的无菌金属套环，套住标记的克隆，在套环内滴加少量 0.25%胰蛋白酶，待细胞脱离时，用注射器针头轻轻吹打分散后，转入小平皿或 24 孔板或 6 孔板中扩大培养。

②玻片法：在接种细胞悬液前，预先在 60mm 平皿中放入无菌小玻片，加入细胞悬液，培养一定时间后，在倒置显微镜下标记上含一个克隆的玻片，然后用无菌镊子取出标记玻片转入 24 孔培养板中继续培养。

软琼脂克隆分离法：

(1)将对数生长期的细胞制成单个细胞悬液(单个细胞)作活细胞计数，调整细胞浓度至 1×10^6 细胞/L，然后根据实验要求再作梯倍稀释。通常以 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个细胞/L 为佳。

(2)制备底层琼脂取 5%琼脂置沸水中，使琼脂完全溶化，取出一份 5%琼脂，移入小烧杯中，待冷至 50°C ，迅速加入 9 份预温 37°C 的新鲜培养液（即成为 0.5%琼脂），混匀后立即注入 24 孔培养板中，每孔含 0.5% 琼脂 0.8mL，置室温使琼脂凝固备用（此层也可以省略）。

(3)制备上层琼脂取 37°C 保温的、不同浓度的细胞悬液 9.4mL，移入小烧杯中，加入 50°C 5% 琼脂 0.6mL 迅速混匀，即配成 0.3%琼脂培养基，立即浇入铺有底层琼脂的 24 孔培养板中，每孔 0.8ml，置室温使琼脂凝固。

(4)于 37°C 5% CO_2 下培养 1~2 周或更长，若需培养更长时间可补加 0.8mL/孔含琼脂的培养液，待有明显集落形成为止。

(5)集落（克隆）计数在倒置显微镜下观察并计数直径大于 $75\mu\text{m}$ 或含有 50 个细胞以上的克隆。

生成克隆数集落(克隆)形成率(%)= _____ $\times 100\%$

每皿接种细胞数 单个细胞的数目

单个细胞百分率(%) = _____ $\times 100\%$

单个细胞数目+2 个以上细胞群数目

单细胞显微克隆法:

是借助显微操纵器,在显微镜监控下将单个细胞逐个吸出,移入含有饲养层细胞的培养板中进行培养克隆的方法。

(1) 饲养层细胞的制备:

①用 0.25%胰蛋白酶消化单层贴壁生长的 3T3 细胞,调整细胞浓度为 108 细胞/L,在 96 孔板中每孔加入 0.1mL 细胞悬液于 37°C5% CO₂ 中培养至单层。

②将已形成单层的 3T3 细胞板,用 60Co γ 线以 4000 ~ 6000 拉得辐射或在培养液中加入丝裂霉素(终浓度为 10⁻⁶mol/L)作用 16h。其目的是使细胞有丝分裂能力丧失,但仍可短期存活,有代谢功能,不仅可维持 pH 而且还可为克隆细胞提供必要的养分及刺激生长的因子。

(2)制备单个细胞悬液方法同上。

(3)分离单个细胞方法多样,如:

①毛细管吸入法同上述毛细管法,在显微镜下将只有一个细胞的毛细管取出。

②微滴法将经稀释至 10³ 个细胞/L 的单个细胞悬液,用无菌的 1mL 注射器逐滴加在平皿中制成散滴,在显微镜下挑选出单个细胞的液滴,再用毛细管取出单个细胞悬滴。

③液体石蜡法将经稀释至 10³ 个细胞/L 的单个细胞悬液,用无菌的 1mL 注射器逐滴加入充满无菌液体石蜡的平皿底部,在倒置显微镜下挑选只有一个细胞液滴,仔细用毛细吸管取出有一个细胞的液滴。

④玻璃小球附着法将稀释至 10³ 个细胞/L 的细胞悬液加入表面涂有无菌凡士林石蜡的小玻璃珠的平皿中,混匀后,在倒置显微镜下挑选玻璃珠表面只粘附一个细胞的玻珠,仔细用镊子取出。

(4)将采用上述方法分离出的单个细胞,放入预先制备饲养层细胞的 96 孔培养板中,于 37℃ 5% CO₂ 下培养 1~2 周或更长。

(5)待细胞克隆明显,并使孔底覆盖 1/3 ~ 1/2 时,即可将细胞转种于 24 孔板进行扩大培养 (贴壁细胞仍需用 0.25%胰酶消化法取出转种)。

人或动物体内(或胚胎组织)由于多种细胞结合紧密,不利于各个细胞在体外培养中生长繁殖,即使采用 1mm³ 的组织块,也只有少量处于周边的细胞可能生存和生长,若需获取大量细胞,必须将现有的组织块充分散开,使细胞解离出来,常采用的方法如下:

一、悬浮细胞的分离方法

组织材料若来自血液、羊水、胸水或腹水的悬液材料,最简单的方法是采用 1000r/min 的低速离心 10 分钟,若悬液量大,可适当延长离心时间,但速度不能太高,延时也不能太长,以避免挤压或机械损伤细胞,离心沉淀用无钙、镁 PBS 洗两次,用培养基洗一次后,调整适当细胞浓度后再分瓶培养,若选用悬液中某些细胞,常采用离心后的细胞分层液,因为,经离心后由于各种细胞的比重不同可在分层液中形成不同层,这样可根据需要收获目的细胞。不同比重的分层液的配制和具体分离方法详见淋巴细胞分离培养的章节。

二、实体组织材料的分离方法

对于实体组织材料,由于细胞间结合紧密,为了使组织中的细胞充分分散,形成细胞悬液,可采用机械分散法(物理裂解)和消化分离法。

(一)机械分散法

所取材料若纤维成分很少,如脑组织,部分胚胎组织可采用剪刀剪切、用吸管吹打分散组织细胞或将已充分剪碎分散的组织放在注射器内(用九号针),使细胞通过针头压出,或在不锈钢纱网内用钝物压挤(常用注射器钝端)使细胞从网孔中压挤出。此法分离细胞虽然简便、快速,但对组织机械损伤大,而且细胞分散效果差。此法仅适用于处理纤维成分少的软组织。

(二)消化分离法

组织消化法是把组织剪切成较小团块(或糊状),应用酶的生化作用和非酶的化学作用进一步使细胞间的桥连结构松动,使团块膨松,由块状变成絮状,此时再采用机械法,用吸管吹打分散或电磁搅拌或在摇珠瓶中振荡,使细胞团块得以较充分的分散,制成少量细胞群团和大

量单个细胞的细胞悬液，接种培养后，细胞容易贴壁生长。

1、酶消化分离法

酶消化分离法常采用胰蛋白酶和胶原酶，其分离方法如下：

(1) 胰蛋白酶分散技术

胰蛋白酶(简称胰酶)是广泛应用的消化剂。胰蛋白酶是一种胰脏制品，对蛋白质有水介作用，主要作用于赖氨酸或精氨酸相连接的肽键，使细胞间质中的蛋白质水介而使细胞分散开，在常用的蛋白酶中由于产品的活力和纯度不同，对细胞的消化能力也不同，胰蛋白酶对细胞的作用，取决于细胞类型、酶的活力、配制的浓度、消化的温度、无机盐离子、pH 以及消化时间的长短等。

①细胞类型 胰蛋白酶适于消化细胞间质较少的软组织，能有效地分离肝、肾、甲状腺、羊膜、胚胎组织、上皮组织等。而对含结缔组织较丰富的组织，如 乳腺、滑膜、子宫、纤维肉瘤、肿瘤组织等就无效，但若与胶原酶合用，就能增加其对组织的分离作用。

②酶的活力 市售的胰蛋白酶，其活力都经过测定而有效，但配制时必须新鲜，需保存在低温冰箱中，消化时的 pH 和温度都要适宜，否则会影响活力，细胞的分散直接与酶的活力有关，最终使用活力为 1:200 或 1:250,56°CpH8.0 时活力最强。

该酶为粉剂，保藏时要防潮，室内温度不宜过高，保存时间不能太长，若粉剂结团块，说明该部分受潮或失效。

③酶的浓度 胰蛋白酶一般采用的浓度为 0.1%-0.25%(活力 1:200 或 1:250)，但遇到难消化的组织时，浓度可适当提高，消化时间适当延长。浓度高对细胞有毒性，而较低浓度的胰蛋白酶在培养液中可促进细胞的增殖，若培养液中加入血清，其少量胰蛋白酶可被血清中抗胰蛋白酶因子所清除。

④温度 一般认为胰蛋白酶在 56°C时活性最强，但由于对细胞有损害而不能被采用，常使用

的温度为 37℃，通常在 37℃进行消化比室温作用快。

⑤pH pH8~pH9 是胰蛋白酶活力适宜范围，但随碱性的增加其活力也随之减少，活性强分散快，细胞也容易被消化下来，消化分离细胞时 PH 只能选用 7.6~8.0 之间，否则对细胞有损伤。

⑥无机盐离子 若用含有钙和镁的盐类溶液来配制胰蛋白酶时，可以发生抑制胰蛋白的消化作用。因此，在配制时应采用无钙镁离子的 PBS 配制。

⑦消化时间 如果细胞消化时间过长，可以损害细胞的呼吸酶，从而影响细胞的代谢，一般消化时间为 20 分钟为宜，冷消化时使用低浓度消化液，于 4℃过夜也可。

分离方法如下：

①过夜冷消化 将取得的组织用 Hanks 液洗三次，剪成碎块大小为 4 毫米左右，用 Hanks 液洗 2~3 次以除去血球和脂肪组织，再加入 0.25%的胰蛋白酶，摇匀后放 4℃过夜，次日再用 Hanks 液洗涤，弃去上清，共洗 2~3 次，然后，加入少量营养液吹打分散，细胞计数，按适当的浓度分瓶培养。

②多次提取消化法 多次提取消化法有以下三种：

热消化多次提取--将剪碎的细胞块加入 0.25%胰蛋白酶 37℃水浴中消化 15~20 分钟，然后经洗涤后用营养液分散制成细胞悬液，按合适的浓度分瓶培养，然后将留下的未彻底消化的组织按上述方法操作，再消化提取细胞。

冷消化多次提取--方法同上，只是消化温度为 4℃。

先热消化后冷消化--将组织块先用胰蛋白酶于 37℃下消化 20 分钟经洗涤后用营养液分散，制成悬液，剩余未消化的小组织块经洗涤后用胰酶于 4℃下过夜，次日再提取细胞，分散成悬液，分瓶培养。

(2) 胶原酶(Collagenase)消化法

胶原酶是一种从细菌中提取出来的酶，对胶原有很强的消化作用。适于消化纤维性组织、上皮组织以及癌组织，它对细胞间质有较好的消化作用，对细胞本身影响不大，可使细胞与胶原成分脱离而不受伤害。该酶分离效果好，即使有钙、镁离子存在仍有活性，故可用 PBS 和含血清的培养液配制，即操作简便又可提高细胞成活率，最终浓度 200u/mL 或 0.1~0.3mg/mL。此酶消化作用缓和，无需机械振荡，但胶原酶价格较高，大量使用将增加实验成本。

经过胶原酶消化后的上皮组织，由于上皮细胞对酶有耐受性，可能有一些上皮细胞团块尚未被完全消化开。成小团块的上皮细胞比分散的单个上皮细胞更易生长，因此不必要再进一步消化处理。

鉴于胰蛋白酶和胶原酶的生物学活性(见表 4-1)和在不同浓度下消化各种组织小块所需的时间(小时)有差异(见表 4-2)，以及两者价格不等，有人采用胶原酶与胰蛋白酶并用，同时还可加透明质酸酶(对细胞表面糖基有作用)，采用两者的联合消化作用，对分散大鼠和兔肝、癌组织非常有效。

表 4-1 胰蛋白酶和胶原酶生物活性的差别

项 目	胰蛋白酶	胶原酶
消化特性	适用于消化软组织	适用于消化纤维多的组织
用 量	0.01%~0.5%	0.1~0.3mg/mL (200u/mL)
消化时间	0.5~2 小时 (小块)	1~12 小时
pH	8~9	6.5~7.0
作用强度	强烈	缓和
细胞影响	时间过长有影响	无大影响

血清、钙、镁离子	有影响	无影响
----------	-----	-----

表 4-2 胰蛋白酶和胶原酶在不同温度下消化各种组织小块时所需时间(小时)(0.5~1cm³)

酶 种 类	较 硬 组 织			软 组 织		
	4℃ 室 温 37℃			4℃ 室 温 37℃		
胰蛋白酶 (0.25%)	24~48	1~6	1~2	12~24	1~2	0.5~1
胶原酶 (200u/mL)	24	6	6.5	12	3	0.25
两者联合 (对冲)	12~46	12~24	4~12	12~24	6~12	1~2

除上述两种最常用的消化酶外，还有链霉蛋白酶、粘蛋白酶、蜗牛酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶，近年来，还有一种从灰霉菌中提取的 Pronase 新酶分散细胞更佳。

2、非酶消化法(EDTA 消化法)

EDTA 是一种非酶消化物，又称螯合剂或 Versene,全名为乙烯二胺四乙酸。常用不含钙、镁离子的 PBS 配成 0.02%的工作液，对一些组织，尤其是上皮组织分散效果好，该化学物质能与细胞上的钙、镁离子结合形成螯合物，利用结合后的机械力使细胞变圆而分散细胞或使贴壁细胞从瓶壁上脱离，缺点是细胞易裂解或贴壁细胞从瓶壁上脱离时呈片状，有团块，常不单独使用，但可与胰蛋白酶混合使用(1:1 或 2:1)，不仅利于细胞脱壁又利于细胞分散，可降低胰酶的用量和毒性作用。

消化分离法的操作步骤：

- (1)剪切 把组织块剪碎，呈 1~5mm³ 大小的组织块。
- (2) 加液漂洗 将碎组织块在平皿(或三角烧瓶)中用无钙镁 PBS 洗 2-3 次(采用倾斜，自然沉降法)。
- (3)消化 加入消化液(胰蛋白酶或胶原酶或 EDTA)于 37℃水浴中作用适当时间(中间可轻摇 1~2 次)，若组织块膨松呈絮状可终止，若变化不大可更换一次消化液，继续消化直至膨松

絮状为止。胰蛋白酶消化时间不宜过长。

(4)弃去消化液 采用倾斜自然沉降或低速离心法尽量弃去消化液。

(5)漂洗 将含有钙、镁离子的培养基沿瓶壁缓缓加入，中止消化反应，采用漂洗法洗 2-3 次后，加入完全培养基。

(6)机械分散 采用吸管吹打或振荡法，使细胞充分散开后用纱网或 3~4 层无菌纱布过滤后分瓶培养，若要求不高可采用倾斜自然沉降 5~10 分钟，吸上层细胞悬液进行分瓶培养。

注意事项如下：

(1)组织块必须漂洗 2-3 次以除去组织中的钙、镁离子和血清对胰蛋白酶和 EDTA 的抑制作用。

(2)胰蛋白浓度不宜过高，作用时间不能太长，以避免毒性作用。

(3)消化后组织不仅要尽量弃去消化液，以避免毒性产生，而且动作要轻，以避免膨松的细胞随漂洗而丢失。