

毫升;

(3) 将腹腔液滴在预冷的载玻片上, 每片1—2滴, 立即涂片, 并迅速放入冰箱(4℃), 细胞自行铺展;

(4) 30分钟后, 将玻片转入10%中性福尔马林(冰箱4℃), 固定30分钟;

(5) 自来水漂洗5分钟, 晾干(或甩干);

(6) 转入酸性磷酸酶作用液中, 37℃处理30分钟;

(7) 自来水漂洗片刻;

(8) 2%硫化铵处理3—5分钟;

(9) 自来水冲洗, 甩干;

(10) 用1:30的姬姆萨液染色15分钟;

(11) 自来水冲去染液, 甩干, 滴上磷酸盐缓冲液(pH 6.8)临时水封片, 镜检观察。

(12) 对照片的制作: 将腹腔液涂片放入50℃温箱处理30分钟, 中性福尔马林固定30分钟, 其余步骤同(5)——(11)。

### 结果观察

镜检可见, 巨噬细胞的细胞核染成紫红色, 而细胞质中则有许多大小不等的棕黑色或黑色的颗粒和斑块。在部分细胞之中, 由于酸性磷酸酶极丰富, 故整个细胞质甚至整个细胞皆被黑色反应沉淀物所掩盖。淋巴细胞的细胞质中也有少许黑色沉淀物。而中性粒细胞则呈现阴性反应<sup>[4]</sup>。

### 注意事项

(1) 酸性磷酸酶作用液的配制是本实验成

败的基础。硝酸铅和甘油磷酸钠混合时易产生絮状悬浮物, 使作用液有效浓度下降, 减弱酶的反应。配制时应注意: 一要严格控制pH值4.6, 二要分别稀释后缓慢混合, 混匀后方可调pH值至5.0;

(2) 小鼠腹腔注射, 不必要求严格消毒, 但注射生理盐水和抽液的进针部位应一致, 否则腹腔液难以抽出;

(3) 涂片置冰箱内, 应垂直插入玻片架上, 以利细胞铺展;

(4) 当室温低于20℃时, 可不用冰箱, 步骤(3)、(4)均在室温下进行也能取得较满意的效果;

(5) 福尔马林固定后, 水漂洗务必彻底, 同时玻片上水应该尽量甩干, 否则反应将不明显;

(6) 硫化铵处理后, 水冲洗干净, 也必须将玻片上水甩干, 否则将造成姬姆萨染色偏蓝, 影响观察效果。

### 参考文献

- [1] 孟瑞朝, 1955. 组织病理标本制作法, 146—147页。
- [2] 郑国辑, 1978. 生物显微技术, 156—157页。
- [3] 汪德耀, 1981. 细胞生物学实验指导, 336—338页。
- [4] 沈阳医学院, 1967. 临床血液学及细胞学图谱, 人民卫生出版社, 21—22页。

## 实验室细胞微载体培养装置的设计与初步应用\*

毕 圻

(中国科学院新疆化学研究所)

毕 刚

(苏州医疗用品厂)

van Wezel<sup>[1]</sup>1967年首先提出了细胞微载体培养技术, 它兼有单层细胞培养和悬浮细胞培养双重特点, 这种方法使细胞贴附生长于借轻度搅拌悬浮在培养液中的微载体珠粒表面,

既不改变细胞附着表面生长成单层的特性, 又可以全面控制各项培养条件, 特别是培养表面

\* 感谢卫生部药品生物制品检定所吴绍沅同志指导。

积与容积之比为传统使用转瓶培养的 50—100 倍, 并可采用大罐密闭培养大大降低了单层培养的污染损失。微载体培养还可应用于各种原代细胞、二倍体细胞和传代细胞系的培养, 对于大规模生产细胞、病毒和细胞产物(例如: 干扰素、单克隆抗体、病毒疫苗、酶和激素等) 是一种十分有前途的新技术。

实验室细胞微载体培养的研究一般采用 Bellco Glass Inc. 或 Wheaton Scientific 传统的电磁搅拌培育瓶<sup>[2]</sup>, Pirbright 英国动物病毒研究所 H.M. Smith 等<sup>[3]</sup> 设计的实验室细胞悬浮培养装置, Techne(Combrige) Ltd. 的球形杆搅拌培育瓶<sup>[2]</sup> 以及改良的梨形推进器搅拌培育瓶<sup>[2]</sup>。国内工作者分别自行制作了实验室微载体培养装置应用于研究中<sup>[4-6]</sup>。我们参考国内外情况自行设计制作了一种简易的细胞微载体培养装置, 并成功地进行了原代细胞和传代细胞的微载体培养, 应用于病毒研究中。

### 一、微载体培养装置的设计和制作

培养装置由电动磁力搅拌器、恒温水浴和球形杆搅拌培育瓶三部分组成, 实物和工作原理在图 1、2 中表示。

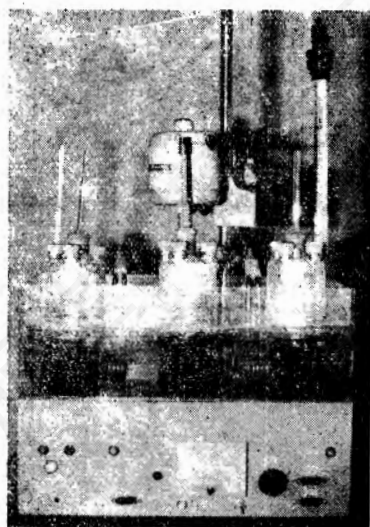


图 1 自制实验室细胞微载体培养装置

1. 电动磁力搅拌器采用直流步进电机, 通过皮带传动带动三组磁铁转动, 以直流稳压电源稳压, 调节电机输入脉冲使转速在 0—72

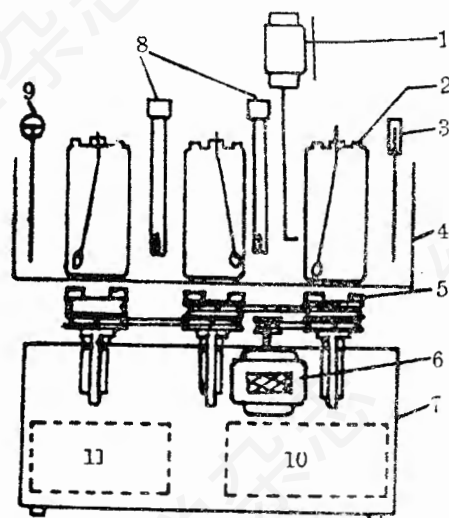


图 2 实验室细胞微载体培养装置工作原理图

1. 水浴搅拌电机; 2. 培育瓶; 3. 温度计; 4. 水浴; 5. 磁铁; 6. 步进电机; 7. 电动磁力; 8. 速热器; 9. 水银接触温度计; 10. 磁铁搅拌速度控制部分; 11. 温度控制部分。

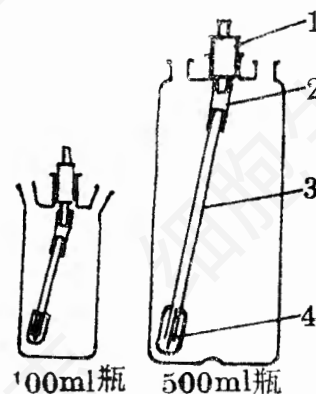


图 3 球形杆搅拌培育瓶

1. 橡皮塞; 2. 硅橡胶管; 3. 球形搅拌杆; 4. 磁铁。

转/分任意调节。

2. 恒温水浴是一个  $18 \times 38 \times 13 \text{ cm}^3$  的有机玻璃水槽, 以两个市售 300 瓦速热器串联加热, 以水银接触温度计和电子继电器控制恒温, 以电动搅拌器保持水浴温度的均匀。

3. 球形杆搅拌培育瓶为自行设计制作的, 有 500 毫升和 100 毫升两种容积, 均以硬质玻璃吹制而成, 并经二氯二甲基硅烷处理, 如图 3 所示。100 毫升瓶直径 4.5 厘米、高 8 厘

米, 上开三口, 中间口安装球形搅拌杆。500毫升瓶直径7厘米、高16厘米, 上开五个口, 中间口安装球形搅拌杆, 周围四个口需要时可以安装取样器、空气—CO<sub>2</sub>混合气体进出口等。球形搅拌杆下部为一空心玻璃球, 内装磁铁, 上部用橡皮塞固定在培育瓶中间口上, 中间以硅橡胶管联接。当电磁搅拌器上磁铁转动时, 由于磁力作用带动球形搅拌杆以一定角度围绕培育瓶垂直中心线搅动, 搅动营养液使微载体悬浮起来。

## 二、微载体培养装置的应用

我们使用自制实验室微载体培养装置成功地培养了鸡胚原代细胞, 用以繁殖新城鸡瘟病毒, 以及培养 BHK<sub>21</sub> 细胞, 用以繁殖口蹄疫病毒。在使用500毫升培育瓶时, 装液量200毫升, 微载体 Cytodex 1 2毫克/毫升, 搅拌转速35—45转/分, 接种原代鸡胚细胞40万/毫升, 细胞均能在微载体上很好地贴附, 贴球率接近100%, 3—4天基本长成愈合单层, 满球率为84.1%(图4见封四), 细胞产量为 $4.66 \times 10^6$ /毫升。接种新城鸡瘟病毒后48小时收获, 病毒滴度 $>7.5 \text{ TCID}_{50}$ /毫升。使用100毫升瓶, 装液量40毫升, 搅拌转速50—55转/分, 也得到了同样的结果。

在细胞微载体培养中搅拌是一个重要因素。必须使培育瓶中微载体成均匀的混浊悬液, 任何部分没有沉积物, 同时, 搅拌也要尽可能的温和, 防止因为搅拌产生的剪力(shear force)使细胞从微载体上剥离。要防止转速恒

定后的突跳现象。我们设计制作的电磁搅拌器在外界电压波动的情况下仍能维持恒定的转速, 采用球状杆搅拌器比通常的桨式搅拌器能够在较低的转速下使所有的微载体呈悬浮状态, 不产生沉积物。同时具有结构简单、容易制作的优点。采用水浴恒温, 温度控制精确( $\pm 0.2^\circ\text{C}$ ), 不需要放置在恒温室里, 同时, 电磁搅拌器产热和震动也不影响培育瓶中的微载体。总之, 这台实验室微载体培养装置具有体积小, 结构简单、使用方便、性能可靠的优点。

在培育瓶中营养液中 pH 变化, 在通常500毫升以下时可以通过营养液中所加指示剂酚红的颜色变化直接观察, 并通过更换营养液来控制 pH。我们也是采用上述方法来观察和调节 pH 的。如能采用通入一定比例的空气—CO<sub>2</sub>混合气体来维持 pH, 则能收到更好的效果。

## 参 考 文 献

- [1] van Wezel A. L., 1973. Tissue Culture Methods and Applications ed by paul F. Kruce, Academic Press p. 372—377.
- [2] Pharmacia Fine Chemicals, 1981. Microcarriers Cell Culture: principles & methods p. 35—37.
- [3] H. M. Smith et al., 1966. Laboratory Practice 15:864—866.
- [4] 张兴义等, 1978. 生物制品通讯 7(5):214—216.
- [5] 施坚等, 1982. 病毒学集刊, 1:143—148.
- [6] 朱德厚等, 1982. 细胞生物学杂志, 4(2): 32—36.

## 基础知识

### 细胞定量吸收光度方法及误差分析

胡 匡 祐

(中国科学院生物物理所, 北京)

细胞定量吸收光度方法对于生物学、医学和农学的研究有着十分重要的意义。该方法能对生物样品进行化学成份的超微量分析(小于

$10^{-15}$ 克)和光谱分析, 特别对微区(直径小于 $0.1 \mu\text{m}$ )样品的分析, 更显示其优越性。

当用统计方法研究一群细胞、组织或生物