

# 细胞工程技术实验指导

供医学检验技术本科（技术研发方向）学生使用

重庆医科大学检验医学院临床血液学教研室

2019年9月

# 实验一、染料配制、器材清洗、包装、和灭菌

## 【目的】

1. 掌握瑞氏染液的配置方法。
2. 掌握细胞培养用器材清洗、包装和灭菌的步骤和方法。

## 【原理】

1. 瑞氏染料是由碱性染料美蓝和酸性染料伊红组成。伊红钠盐的有色部分为阴离子，无色部分为阳离子，其有色部分为酸性，故称伊红为酸性染料。美蓝通常为氯盐是碱性的，美蓝的中间产物结晶为三氯化镁复盐，其有色部分为阳离子，无色部分为阴离子，其有色部分为碱性，恰与伊红钠盐相反。细胞内嗜酸性的物质易与伊红结合，染色偏红；嗜碱性物质易与美蓝结合，染色偏蓝。

2. 无菌无毒的操作环境是保证体外细胞生存的首要条件。与体内相比，体外培养细胞丢失了对微生物和有毒物质的防御能力，所以一旦被污染或自身代谢物质积累，细胞就会中毒死亡。因此，在体外培养过程中，必须保持细胞的生存环境无菌无毒，并及时清除细胞代谢产物。

## 【试剂与器材】

### 1. 器材：

量筒、乳钵、研磨棒、棕色滴瓶、饭盒、移液管、巴氏吸管、10ml 离心管、培养瓶、报纸、棉花、刷子、高压蒸汽灭菌锅、烤箱等。

### 2. 试剂：

瑞氏染料、甲醇、甘油、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、蒸馏水、5%稀盐酸、洗涤剂。

## 【操作】

### （一）瑞氏染液的配制

#### 1. 瑞氏染液

（1）称量：准备瑞氏染料 1.0 g、甲醇（AR 级以上）600 ml、甘油 15 ml。

（2）研磨：将全部染料放入清洁干燥的乳钵中，先加少量甲醇慢慢地研磨（至少 30 min），使染料充分溶解，再加入少许甲醇细研，如此多次研磨，直至染料全部溶解，甲醇用完为止。

（3）密封保存：最后再加 15 ml 甘油，密闭保存。

## 2. 磷酸盐缓冲液 (pH6.4~6.8)

(1) 称量: 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.3 g、磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.2 g。

(2) 加蒸馏水至 1000 ml, 配好后测定 pH, 必要时可用磷酸盐溶液校正 pH。  
也可配制成 10 倍浓缩液, 使用时再稀释。

(3) 塞紧瓶口贮存。

## (二) 细胞培养器材清洗、包装与灭菌

### 1. 玻璃器皿的清洗

(1) 浸泡: 新的玻璃器皿表面呈碱性, 表面常附有灰尘和一些如铅、砷等对细胞有害的物质。空气湿度高时, 玻璃器皿表面又易长霉, 因此使用前必须彻底清洗。首先用自来水初步刷洗, 5%稀盐酸溶液中浸泡过夜以中和玻璃表面碱性物质和除去霉斑。

(2) 刷洗: 浸泡后的玻璃器皿一般用毛刷沾洗涤剂或洗衣粉刷洗 (最好选用软毛刷和优质洗涤剂, 以避免损坏器皿表面光洁度和影响细胞生长), 以除去牢固附在器皿表面的杂质。刷洗时需注意: 刷洗要彻底, 不留死角, 要特别注意瓶角等部位的洗刷; 用力要适中, 防止损害器皿表面的光泽度。

(3) 冲洗: 自来水冲洗 6-10 遍, 蒸馏水冲洗 3 遍。

(4) 干燥。

### 2. 包装

(1) 玻璃培养瓶用报纸包好。

(2) 离心管、移液管、巴氏吸管装入饭盒。

3. 灭菌: 用高压蒸汽灭菌锅灭菌。

4. 烤干: 80℃烤箱烤干备用。

## 【注意事项】

1. 新鲜配制的瑞氏染液偏碱, 染色效果较差, 应在室温下贮存一定时间, 待亚甲蓝逐渐转变为天青 B 后使用, 该过程称为染料的成熟。因此染液配置后放置时间越久, 天青 B 越多, 染色效果越好。但染液应贮存于棕色瓶避光保存, 且瓶口须盖严, 以免甲醇挥发或氧化成甲酸。

2. 甲醇必须用分析纯 (AR 级以上), 不含丙酮。也可在染液中加入 3 ml 中性甘油, 防止甲醇挥发, 并使细胞着色更清晰。

3. 泡酸时器皿要充分接触稀酸，不能留有气泡，器皿不能露出液面，浸泡时间一般不少于 24 小时，至少不能低于 6 小时。
4. 刷洗细胞培养器材时需注意：刷洗要彻底，不留死角，要特别注意瓶角等部位的洗刷；用力要适中，防止损害器皿表面的光泽度。

## 实验二、悬浮细胞的传代培养

### 【目的】

掌握悬浮细胞传代培养的方法。

### 【原理】

细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就必须进行传代（再培养）。

传代培养也是一种将细胞保存下去的方法。同时也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。悬浮型细胞直接分瓶就可以，贴壁细胞需经消化后才能分瓶。

### 【试剂与器材】

#### 1. 器材：

超净工作台、离心机、饭盒、移液管、巴氏吸管、10ml 离心管、培养瓶、镊子、酒精灯、打火机、试管架等。

#### 2. 试剂：

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、消毒液等。

### 【操作】

#### 1. 传代前准备

(1) 预热培养用液：将 RPMI1640 培养基、胎牛血清放 37℃ 水浴箱预热。

(2) 消毒：用 75% 酒精或消毒液擦拭经过紫外线照射的超净工作台和双手。

(3) 正确摆放需要使用的器械，保证足够的操作空间，不仅便于操作而且可减少污染。

(4) 揭开酒精灯盖子，稍后片刻，再点燃酒精灯，注意酒精灯火焰大小要合适。

(5) 镊子过火，用镊子从饭盒夹取需要用到的物品，如离心管、移液管、巴氏吸管，每件物品均需过火灭菌。

#### 2. 配制含 10% 胎牛血清的完全培养基

揭开装有 RPMI1640 培养基（90 ml）的培养瓶瓶盖，瓶口过火。揭开装有胎牛血清的瓶盖，瓶口过火。用刻度移液管吸取 10 ml 血清加入 RPMI1640 培养基中，配制成 RPMI1640 完全培养基。注意移液管管口勿接触培养基瓶口以免污染。充分混匀。

### 3. 观察细胞

从培养箱取出细胞，注意取出细胞时要旋紧瓶盖。在倒置显微镜下观察细胞的生长状态、数量、是否污染等情况，以决定对细胞进行怎样的处理。如细胞生长状态好、数量多、无污染，则进行传代培养。

### 4. 收集细胞至离心管中

在超净工作台中旋开瓶盖，瓶口过火。用移液管或巴氏吸管将细胞培养液吸至已经准备好的离心管中。注意：如果是 K562 细胞，细胞呈半悬浮方式生长，需要用移液管或巴氏吸管吸取培养瓶内的培养基将附着在瓶壁上的细胞吹洗下来。如果是成团生长的细胞，可反复吹吸几次培养基使细胞呈单个散开。如果是单个生长的细胞，直接吸取培养基即可。

### 5. 离心

1000 rpm 离心 5 分钟。

### 6. 分瓶

吸弃上清，用新鲜的 RPMI1640 完全培养基重悬细胞，将细胞悬液平分至两个或三个培养瓶中，补充新鲜的 RPMI1640 完全培养基至培养瓶中至 5 ml。拧紧瓶盖，标记（细胞名称、日期、姓名），倒置显微镜下观察细胞的密度是否合适。

### 7. 培养

适当拧松瓶盖，置于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

#### 【结果】

24 小时后观察细胞的生长状况，传代培养好的细胞应该胞体透亮、背景干净无污染、细胞生长速度快几乎铺满培养瓶。

#### 【注意事项】

1. 进入细胞室前必须关闭紫外灯。
2. 全程严格的无菌操作，操作过程中不说话。
3. 正确使用倒置显微镜。
4. 正确使用酒精灯。先揭开酒精灯盖子，稍后片刻，再点燃酒精灯。
5. 吹吸细胞的动作要轻柔，避免对细胞的损伤。动作迅速，尽量减少细胞在培养箱外的时间，以免影响细胞的生长状态。
6. 手接触移液管的面积尽量小，且摸过的地方要过火。移液管或者巴氏吸管专

管专用，且必须冷却后使用。操作时悬空滴加液体，避免交叉污染。

7. 离心机必须配平。

8. 避免手有伤口，注意生物安全防护。

## 实验三、贴壁细胞的传代培养

### 【目的】

掌握贴壁细胞传代培养的方法。

### 【原理】

细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本上饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就必须进行传代（再培养）。

传代培养也是一种将细胞保存下去的方法。同时也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。悬浮型细胞直接分瓶就可以，贴壁细胞需经消化后才能分瓶。

### 【试剂与器材】

#### 1. 器材：

超净工作台、离心机、饭盒、移液管、巴氏吸管、10ml 离心管、培养瓶、镊子、酒精灯、打火机、试管架等。

#### 2. 试剂：

DMEM 培养基、胎牛血清、PBS、胰蛋白酶-EDTA 溶液、消毒液等。

### 【操作】

#### 1. 传代前准备

（1）预热培养用液：将 DMEM 培养基、胎牛血清、PBS、胰蛋白酶-EDTA 溶液放 37℃ 水浴箱预热。

（2）消毒：用 75%酒精或消毒液擦拭经过紫外线照射的超净工作台和双手。

（3）正确摆放需要使用的器械，保证足够的操作空间，不仅便于操作而且可减少污染。

（4）揭开酒精灯盖子，稍后片刻，再点燃酒精灯，注意酒精灯火焰大小要合适。

（5）镊子过火，用镊子从饭盒夹取需要用到的物品，如离心管、移液管、巴氏吸管，每件物品均需过火灭菌。

#### 2. 配制含 10%胎牛血清的完全培养基

揭开装有 DEME 培养基（90 ml）的培养瓶瓶盖，瓶口过火。揭开装有胎牛血清的瓶盖，瓶口过火。用刻度移液管吸取 10 ml 血清加入 DMEM 培养基中，配制成 DMEM 完全培养基。注意移液管管口勿接触培养基瓶口以免污染。充分

混匀。

### 3. 观察细胞

从培养箱取出细胞，注意取出细胞时要旋紧瓶盖。在倒置显微镜下观察细胞的生长状态、数量、是否污染等情况，以决定对细胞进行怎样的处理。如细胞生长状态好、数量多（90%以上的覆盖率）、无污染，则进行传代培养。

### 4. 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化细胞

（1）吸弃培养基，加入 PBS 或无血清的 DMEM 培养基洗涤一遍。

（2）加入胰蛋白酶-EDTA 溶液消化，胰蛋白酶-EDTA 溶液的量以覆盖细胞为宜，消化的最佳温度为 37℃。

（3）倒置显微镜下观察细胞，若胞质回缩，细胞之间不再连接成片，表明此时细胞消化适度。

（4）倒掉胰蛋白酶-EDTA 溶液，加入 DMEM 完全培养基终止消化反应。

### 5. 收集细胞至离心管中

用移液管或巴氏吸管吸取培养基反复地吹打瓶壁，使细胞从瓶壁上脱落下来。将细胞培养液吸至已经准备好的离心管中。

### 6. 离心

1000 rpm 离心 5 分钟。

### 7. 分瓶

吸弃上清，用新鲜的 DMEM 完全培养基重悬细胞，将细胞悬液平分至两个或三个培养瓶中，补充新鲜的 DMEM 完全培养基至培养瓶中至 5 ml。拧紧瓶盖，标记（细胞名称、日期、姓名），倒置显微镜下观察细胞的密度是否合适。

### 8. 培养

适当拧松瓶盖，置于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

#### 【结果】

24 小时后观察细胞的生长状况，传代培养好的细胞应该胞体透亮、背景干净无污染、细胞生长速度快几乎铺满培养瓶。

#### 【注意事项】

1. 进入细胞室前必须关闭紫外灯。
2. 全程严格的无菌操作，操作过程中不说话。

3. 正确使用倒置显微镜。
4. 正确使用酒精灯。先揭开酒精灯盖子，稍后片刻，再点燃酒精灯。
5. 选用管口平滑完整的移液管或者巴氏吸管用于吹打细胞，吹吸细胞的动作要轻柔，避免对细胞的损伤。动作迅速，尽量减少细胞在培养箱外的时间，以免影响细胞的生长状态。
6. 手接触移液管的面积尽量小，且摸过的地方要过火。移液管或者巴氏吸管专管专用，且必须冷却后使用。操作时悬空滴加液体，避免交叉污染。
7. 离心机必须配平。
8. 避免手有伤口，注意生物安全防护。
9. 消化的时间要适当，太短细胞消化不完全，细胞贴在瓶壁上吹打不下来；时间太长，细胞被损伤，不利于细胞继续生长。
10. 消化时，在加入胰蛋白酶-EDTA 溶液前一定要加入 PBS 或无血清的 DMEM 培养基润洗，以去除残留在细胞培养瓶中的血清。血清会抑制胰蛋白酶的活性，使细胞不易消化下来。

## 实验四、小鼠脾脏细胞的原代培养

### 【目的】

掌握小鼠脾脏细胞原代培养的方法。

### 【原理】

原代细胞培养是指直接从动物体内获取的细胞、组织和器官，经体外培养后，直到第一次传代为止。原代细胞培养，首先用无菌操作的方法，从动物体内取出所需的组织（或器官），经胰蛋白酶消化或研磨，分解成单个游离细胞，在人工培养下，使其不断的生长及繁殖。

### 【试剂与器材】

#### 1. 器材：

剪刀、眼科剪、镊子、不锈钢网（200目）、注射器、10 cm 培养皿、50-100 ml 小烧杯、超净工作台、离心机、饭盒、移液管、巴氏吸管、10ml 离心管、培养瓶、镊子、酒精灯、打火机、试管架等。

#### 2. 试剂：

6-8 周龄 Balb/c 小鼠、75%乙醇、RPMI 1640 培养基、生理盐水、胎牛血清、消毒液等。

### 【操作】

1. 颈椎脱臼法处死小鼠，75%乙醇浸泡 3 分钟。取出小鼠，腹部朝上置于无菌泡沫板上，大头针固定四肢。
2. 在小鼠左腹侧中部剪开小口，撕开皮肤，暴露腹壁，可见红色长条状脾脏。
3. 在脾脏下侧提起腹膜，剪开后上翻，暴露脾脏，用镊子提起脾脏，眼科剪分离脾脏下面的结缔组织，取出脾脏。
4. 将脾脏放入盛有 5 ml 无菌生理盐水的 10 cm 平皿中，轻轻漂洗，细心剥除脾脏周围的结缔组织。
5. 细胞获取（钢网研磨法）：将脾脏放置不锈钢网（200目）上，用注射器针芯轻轻研磨脾脏，使脾细胞通过网孔被挤压入装有生理盐水的平皿中，生理盐水反复冲洗细胞筛，获得单细胞悬液。
6. 将细胞悬液移至离心管中，1500 rpm/min 离心 5 分钟，弃上清，PBS 洗涤 1 次，离心，弃上清。

7. 加入 1 ml 1640 完全培养基（含 10%小牛血清），重悬细胞，取适量细胞加入培养瓶中培养。

### **【结果】**

24 小时后观察细胞的生长状况，原代培养好的细胞应该胞体透亮、背景干净无污染、细胞生长速度快几乎铺满培养瓶。

### **【注意事项】**

1. 同细胞培养的一般注意事项。
2. 抓小鼠时注意安全，防止咬伤。以右手抓小鼠尾巴，左手拇指、食指按住小鼠颈部，右手抓住尾巴用力往后拉即可使颈椎脱臼。
3. 将小鼠充分浸泡入 75%的乙醇中，浸泡时间要足够，以达到充分灭菌。
4. 要将脾脏周围的结缔组织以及脾脏表面的膜充分剔除干净，以使充分研磨。研磨时，要用生理盐水润湿不锈钢网。

## 实验五、瑞氏染色、吉姆萨染色、瑞氏-吉姆萨染色

### 【目的】

1. 掌握瑞氏染色、吉姆萨染色、瑞氏-吉姆萨染色的原理、结果判断及注意事项。
2. 掌握瑞氏染色、吉姆萨染色、瑞氏-吉姆萨染色的操作方法。
3. 熟悉瑞氏染色、吉姆萨染色、瑞氏-吉姆萨染色三种染色方法的优缺点。

### 【原理】

#### （一）瑞氏染色

瑞氏染料是由碱性染料美蓝和酸性染料伊红组成。伊红钠盐的有色部分为阴离子，无色部分为阳离子，其有色部分为酸性，故称伊红为酸性染料。美蓝通常为氯盐是碱性的，美蓝的中间产物结晶为三氯化镁复盐，其有色部分为阳离子，无色部分为阴离子，其有色部分为碱性，恰与伊红钠盐相反。细胞内嗜酸性的物质易与伊红结合，染色偏红；嗜碱性物质易与美蓝结合，染色偏蓝。

#### （二）吉姆萨染色

吉姆萨染料中含有美蓝和伊红两种染料，前者为碱性，后者为酸性，它们与细胞内的各种物质具有不同的亲和力，从而使其呈现出不同的色调，以便于辨认。

#### （三）瑞氏-吉姆萨染色

瑞氏-吉姆萨染色液是利用 Romanowsky Stain 技术原理改良而成的。细胞的着色过程是染料透入被染物并存留其内部的一种过程，此过程既有物理吸附作用，又有化学亲和作用。各种细胞及细胞的各种成分由于其化学性质不同，对瑞氏-吉姆萨染色液中的酸性染料（曙红）和碱性染料（亚甲蓝）的亲和力也不一样。因此，标本图片经瑞氏-吉姆萨染色液染色后，相应各类细胞呈现不同的着色，从而达到辨别其形态特征的目的。

### 【试剂与器材】

1. 器材：染缸、采血针、棉签、玻片、染色架、洗耳球
2. 试剂：甲醇、瑞氏染液、磷酸盐缓冲液、吉姆萨染液、瑞氏-吉姆萨染液、消毒液等

### 【操作】

#### （一）瑞氏染色

1. 采血：采集末梢血 1 滴置于载玻片一端 1 cm 处，也可以使用玻璃棒、微

量吸管、注射针头等取 EDTA 抗凝血 1 滴滴加于载玻片上，直径约 4 mm。

2. 推片：左手平执载玻片两端，右手持推片将其一端放在载玻片上血滴前方，向后慢慢移动并接触血滴，血液即沿推片与载玻片的接触边缘展开，保持推片与载玻片呈  $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$  平面夹角，匀速向前推动，载玻片上留下一层厚薄适宜的血膜，呈舌状，分头、体、尾三部分，且清晰可见。

3. 干燥：将推好的血涂片在空气中晃动，使其迅速干燥。

4. 标记：在载玻片的一端用铅笔或蜡笔编号，注明受检者姓名。

5. 蜡笔画线：用蜡笔在血膜两端画线，以防染色时染液外溢。

6. 染色：将玻片平置于染色架上，滴加染液数滴，以覆盖整个血膜为宜。0.5~1 min 后，滴加等量或稍多的缓冲液，轻轻摇动玻片或用洗耳球对准血涂片吹气，使染液与缓冲液充分混匀。室温下放置 5~10 min 后用流水冲去染液。

7. 待干，镜检。

## （二）吉姆萨染色

1. 血涂片晾干后用甲醇固定 1~3 分钟；

2. 将固定的血涂片置于吉姆萨稀释染色液（A 液：B 液=1:9）浸染 10~30 分钟（标本较少可用滴染），冬天温度低时可在  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中染色；

3. 浸染后取出用水冲洗；若是滴染，水洗（冲洗时不能先倒掉染液，应以流水冲去，以防有沉渣沉淀在标本上），待干燥后显微镜检查。

## （三）瑞氏-吉姆萨染色

1. 滴加适量瑞氏-吉姆萨染色液 A 液于涂片上，使染液覆盖整个标本涂片染色 1 分钟；

2. 再将瑞氏-吉姆萨染色液 B 液滴加于 A 液上面（滴加量为 A 液的 2~3 倍），以嘴或洗耳球吹出微风使液面产生涟漪状，使两液充分混合，染色 3~10 分钟；

3. 水洗（冲洗时不能先倒掉染液，应以流水冲去，以防有沉渣沉淀在标本上），干燥、镜检。

## 【结果】

### （一）瑞氏染色

红细胞呈粉红色；血小板呈紫色；白细胞的胞核染成紫红色，淋巴细胞胞浆呈蓝色或淡蓝色、中性粒细胞胞浆呈粉红色、嗜酸性粒细胞胞浆布满桔黄色颗粒、

嗜碱性粒细胞胞浆含粗大黑色的颗粒。

## （二）吉姆萨染色

红细胞呈粉红色；白细胞核染不同程度蓝色至暗蓝色，核染色质结构清晰，胞浆颗粒清楚，显各种细胞特有的色彩，如中性粒细胞颗粒呈紫色、嗜酸性粒细胞颗粒呈红色、嗜碱性粒细胞颗粒呈暗紫红色。

## （三）瑞氏-吉姆萨染色

红细胞呈粉红色，白细胞胞浆中颗粒清楚，并显示出各种细胞特有的色彩，细胞核染紫红色，核染色质结构清楚。

### 【注意事项】

1. 瑞氏染色、吉姆萨染色、瑞氏-吉姆萨染色时，血细胞要求新鲜全血或 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血。
2. 血涂片厚薄要适宜。
3. 血涂片必须充分干燥，否则染色时细胞易脱落。
4. 加染液时应适量，以覆盖整个血膜为宜。染液不宜过少，固定时间不宜过长（一般为 0.5~1 min），以免染液蒸发沉淀，难以冲洗掉。
5. 染色时间与染液浓度、细胞多少及室温有关，染液淡、细胞多、室温低则染色时间要长；反之，可缩短染色时间。冲洗前应先在低倍视野下观察有核细胞是否染色清楚，核质是否分明。因此染色时间应视具体情况而定，特别在更换新染料时必须经试染，摸索最佳染色条件，掌握染色时间和加缓冲液的比例。
6. 冲洗时不能先倒掉染液，应以流水冲洗，以防染料沉着在血涂片上。冲洗时间不能过久，以防脱色。冲洗完后血涂片应立放于支架上晾干，以免剩余水分浸泡引起脱色。
7. 染色过淡，可以复染，复染时应先加缓冲液，而后加染液，或加染液与缓冲液的混合液，不可先加染液。染色过深可用水冲洗或浸泡一定时间，也可用甲醇脱色。如有染料颗粒沉积，可用甲醇冲洗 2 次，并立即用水冲掉甲醇，待干后复染。
8. 瑞氏-吉姆萨染色用于骨髓涂片染色时，涂片制成后，应在空气中快速摇动或扇干，防止细胞皱缩变形或因空气潮湿而溶血，绝对不能用高温或火烤。

## 实验六、HE、巴氏染色

### 【目的】

1. 掌握 HE、巴氏染色的原理、结果判断及注意事项。
2. 掌握 HE、巴氏染色的操作方法。

### 【原理】

#### （一）苏木素—伊红染色（Hematoxylin-Eosin stain, HE 染色）

细胞中的细胞核由酸性物质组成，它与碱性染料（苏木素）亲和力较强；细胞浆含碱性物质，与酸性染料（伊红）亲和力较大。HE 染色主要用于显示各种组织正常成分及病变的一般形态结构，是生物学、组织学、病理学及细胞学等学科必不可少的基本的常规染色方法，在病理诊断、教学与科研中广泛应用，具有重要价值。

#### （二）巴氏染色

染色液中染核的盐基性染料和染胞浆的酸性染料，能与细胞中具有相反电荷的蛋白质结合，而染成各种不同的颜色，从而能清晰地区别各细胞的成分。

### 【试剂与器材】

1. 器材：染缸、玻片、采血针、采血管、棉签
2. 试剂：HE 染液、巴氏染液、消毒液、生理盐水、95%乙醇

### 【操作】

#### （一）HE 染色

##### 1. 样本要求

##### （1）石蜡切片

- ① 脱蜡：用无毒环保脱蜡剂或二甲苯脱蜡，每次 10~15 分钟，共两次。
- ② 梯度入水：样本玻片浸入 95%、70%、30%乙醇各 2 分钟，温水 2 分钟，如果脱蜡不干净，需再次温水 2 分钟。此时玻片上除样本部分略有水分外，玻片的其余部分均应无水珠。

##### （2）冰冻切片

- ① 回温：将预先制作好并保存在-20℃冰箱中的冰冻切片取出回温，可室内自然回温或放到 37℃孵箱中进行回温。
- ② 水合：将回温好的切片，水中浸泡 30~60 秒左右。

### (3) 血涂片及骨髓涂片

① 推片：取全血 3  $\mu$ l 左右置载玻片上，将推片保持与载玻片 30° 角度，置于血滴正前方，稍往后移与血滴接触，血滴沿推片下缘散开，再匀速沿载玻片平面平稳向前滑动，至血液铺完血膜为止。

② 涂片在空气中自然干燥，95%乙醇固定 2~3 分钟，水洗约 30~60 秒。

#### 2. 检验方法

① 染色之前用蒸馏水浸湿已脱蜡并已梯度入水的组织 1~2 分钟，甩掉水分，但要确保蒸馏水润湿整个组织，并均匀分布；

② 试剂一核染液染色 5 分钟左右，水洗 3~5 分钟；

③ 试剂二浆染液染色 10~30 秒，用试剂三增色液冲洗 1~2 次，滤纸吸干或自然晾干，封片镜检。

### (二) 巴氏染色

#### 1. 样本前处理

样本涂片自然干燥后用 95%乙醇固定 2~3 分钟，水洗 2~3 分钟。

#### 2. 玻片染色法（适用样本量少）

① 滴加试剂一核染液染色 30 秒~2 分钟，水洗 30~60 秒；

② 滴加试剂二浆染液染色 20 秒~2 分钟，不要倒丢，染色时间越长，浆染效果越好；

③ 立即滴加增色液增色 5 秒左右，再用增色液冲洗一遍，滤纸吸干。

#### 3. 染缸染液法（适合样本量大）

① 将涂片置于试剂一核染液染缸中染色 30 秒~2 分钟，水洗 30~60 秒；

② 移入试剂二浆染液染缸中染色 20 秒~2 分钟；

③ 再移入试剂三增色液染缸中染色约 10 秒，取出用滤纸吸干镜检。

### 【结果】

#### (一) HE 染色

组织切片、细胞涂片经 HE 染色后，细胞核被染成蓝色，细胞浆、肌纤维、胶原纤维等染成不同程度的红色，红细胞则呈橙红色。

#### (二) 巴氏染色

胞核染为蓝紫色：鳞状上皮基底层、中层及表层角化前细胞胞质染绿色，表层不

完全角化细胞胞质染粉红色，完全角化细胞胞质呈桔黄色；中性粒细胞和淋巴细胞、吞噬细胞胞质均为蓝色；红细胞染粉红色，粘液染成淡蓝色或粉红色。恶性细胞核大深染，高分化鳞癌细胞染成粉红色或桔黄色；腺癌胞质呈灰蓝色。

**【注意事项】**

1. 石蜡切片、冰冻切片，切片的厚薄要适宜；血涂片或骨髓涂片，涂片的厚薄要适宜，否则影响结果观察。
2. 石蜡切片脱蜡要充分，否则影响细胞着色效果。
3. 血涂片或骨髓涂片要充分干燥再进行后续实验，否则容易掉片。

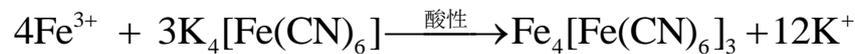
## 实验七、小鼠骨髓细胞铁染色

### 【目的】

1. 掌握骨髓铁染色(bone marrow iron stain)的原理、结果判断及注意事项。
2. 掌握铁染色的操作方法。

### 【原理】

骨髓中的铁包括细胞内铁和细胞外铁，骨髓小粒中的含铁血黄素称细胞外铁，幼稚红细胞内的铁称为细胞内铁。骨髓中的三价铁和蛋白质结合不牢固，经稀盐酸处理后而游离，并能与酸性亚铁氰化钾溶液发生普鲁士蓝反应（见以下反应式），生成蓝色亚铁氰化铁沉淀，定位于胞质中含铁的部位。根据反应的强弱可了解骨髓中细胞内、外铁的含量。



### 【试剂与器材】

1. 器材：骨髓涂片、染色缸、水浴箱、显微镜等。
2. 试剂：

(1) 酸性亚铁氰化钾溶液（临用前配制）：200 g/L 亚铁氰化钾溶液 20 ml，缓缓滴加 5 ml 浓盐酸，边滴边搅拌均匀，如有白色沉淀则加少量亚铁氰化钾溶液使白色沉淀消失，加入亚铁氰化钾溶液的总量为 25 ml。

(2) 2 g/L 核固红-硫酸铝溶液：硫酸铝 2 g 溶于 100 ml 蒸馏水中，再加入核固红 0.2 g。置 37°C 水浴中振荡 1 小时，使之溶解，过滤后备用。

### 【操作】

1. 干燥骨髓涂片放入酸性亚铁氰化钾溶液中，染色 30 分钟。
2. 用蒸馏水冲洗，待干。
3. 用核固红染液复染 10~15 分钟。
4. 流水冲洗，待干，镜检。

### 【结果】

幼红细胞胞核呈鲜红色，胞质呈淡黄红色，铁粒呈蓝绿色。

1. 细胞内铁 用油镜计数 100 个中、晚幼红细胞，记录胞质中含有蓝色铁颗粒的幼红细胞(铁粒幼红细胞)的百分率。根据细胞内铁颗粒的数目、大小、染色深浅和颗粒分布的情况，将铁粒幼红细胞分为四型，详见表 1。

表 1 铁染色细胞内铁结果判断方法

实验结果	细 胞
I 型细胞	幼红细胞内含 1~2 个小铁颗粒
II 型细胞	幼红细胞内含 3~5 个小铁颗粒
III 型细胞	幼红细胞内含 6~10 个小铁颗粒，或 1~4 个大铁颗粒
IV 型细胞	幼红细胞内含 10 个以上小铁颗粒，或 5 个以上大铁颗粒

环形铁粒幼红细胞是指幼红细胞胞质内铁颗粒在 5 颗以上，围绕核周三分之一以上者。

2. 细胞外铁 观察骨髓小粒中蓝色铁颗粒的情况，常分为五级，见表 2。

表 2 铁染色细胞外铁结果判断方法

实验结果	染 色 情 况
(-)	无颗粒
(+)	有少数铁颗粒或偶见铁小珠
(++)	有较多的铁颗粒或小珠
(+++)	有很多的铁颗粒、小珠和少数小块状
(++++)	有极多铁颗粒、小珠，并有很多密集成堆的小块

【参考区间】 细胞外铁 (+) ~ (++)；细胞内铁阳性率为 12%~44%，平均 21.4%，以 I 型为主，少数为 II 型，III、IV 型及环形铁粒幼红细胞不见。

**【注意事项】**

1. 玻片需经去铁处理。将新玻片用清洁液浸泡 24 小时，取出后反复水洗,浸入 95%酒精中 24 小时，晾干，再浸泡在 5%盐酸中 24 小时，取出后用双蒸水反复清洗玻片，取出烘干后备用。
2. 骨髓取材合格。细胞外铁存在于骨髓小粒中，故选择骨髓小粒丰富的涂片进行铁染色。取材不佳时，影响实验结果。
3. 酸性亚铁氰化钾溶液须新鲜配制。加浓盐酸时要慢，尤其不要把浓盐酸直接加到全量的亚铁氰化钾溶液中，否则会出现沉淀不溶解的现象。
4. 固定时间过长会导致阳性率降低。
5. 基质液中取出的骨髓涂片，用小水流冲洗或冲洗玻片背侧面，以免冲掉骨髓小粒。

6. 染色时 HCL 的浓度过低，会导致阳性率降低。
7. 已做过 Wright 染色的陈旧骨髓涂片，可浸入甲醇中至颜色退去，再行铁染色。

## 实验八、小鼠骨髓 NAP 染色

### 【目的】

1. 掌握卡氏 (Kaplon's) 偶氮偶联法中性粒细胞碱性磷酸酶 (neutrophilic alkaline phosphatase, NAP) 染色的原理、结果判断及注意事项。
2. 熟悉中性粒细胞碱性磷酸酶染色的操作方法。

### 【原理】

中性粒细胞胞质中的碱性磷酸酶在 pH 值 9.2~9.6 的碱性条件下能水解磷酸萘酚钠, 生成萘酚, 后者与重氮盐偶联形成不溶性的有色沉淀定位于胞质中酶存在的部位。重氮盐有多种, 常用的有坚牢蓝 RR、坚牢蓝 BB、坚牢紫酱等。

### 【试剂与器材】

1. 器材: 染色缸、水浴箱、显微镜等。
2. 试剂:
  - (1) 10%甲醛甲醇固定液
  - (2) 丙二醇缓冲液贮备液 (0.2 mol/L): 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇 10.5 g 加蒸馏水至 500 ml, 溶解后保存冰箱内。
  - (3) 丙二醇缓冲液应用液 (0.05 mol/L, pH 9.75): 0.2 mol/L 贮存液 25 ml、0.1 mol/L 盐酸 5 ml, 加蒸馏水至 100 ml。
  - (4) 基质孵育液 (pH9.5~9.6) (临用前配制):  $\alpha$ -磷酸萘酚钠 20 mg 溶于 0.05 mol/L 丙二醇缓冲液 20 ml, 再加坚牢紫酱 GBC 盐 (或重氮坚牢蓝) 20 mg 混合后用滤纸过滤, 立即使用。
  - (5) Mayer 苏木素染色液

### 【操作】

1. 新鲜干燥的标本片用冷 10%甲醛甲醇固定液固定 30 秒。流水冲洗, 待干。
2. 将标本片浸入基质孵育液中, 在室温 (冬季放水浴箱) 下温育 10~15 分钟。
3. 流水冲洗 1~2 分钟, 待干。
4. 在苏木素染色液中复染 5~8 分钟, 流水冲洗, 待干, 镜检。

### 【结果】

1. 胞质中出现紫黑色或棕红色颗粒为阳性。判断标准见表 3。

表 3 中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果判断

实验结果	分级	细 胞
0 分	-	胞质中无阳性染色颗粒
1 分	+	胞质中含少量颗粒或呈弥漫浅色
2 分	++	胞质中含中等量的颗粒或呈弥漫着色
3 分	+++	胞质中含较多颗粒或弥漫较深色
4 分	++++	胞质中充满粗大颗粒或弥漫深色

## 2. 计算阳性率和积分值

阳性率：100 个细胞中阳性细胞总数即为阳性率。

积分值：100 个细胞中阳性细胞的积分之和即为积分值。

**【正常血细胞的染色反应】** 健康人的血细胞碱性磷酸酶除成熟中性粒细胞（杆状核及分叶核）可见阳性外，其他细胞均呈阴性反应。

**【参考区间】** NAP 的积分值为 30~130 分。以上值仅供参考，因各实验室有一定差异，应有自己的参考值。

### **【注意事项】**

1. 标本片应新鲜制备，存放过久，则酶活性降低，影响染色结果。一般要求在 1 周内染色观察。
2. 低温固定保证细胞不易破碎，酶不易扩散，从而准确定位。
3. 磷酸萘酚盐和重氮试剂品种繁多，应根据基质不同选择相适应的重氮盐。坚牢蓝等重氮盐的质量是本实验成功的关键。

## 实验九、MTS、台盼蓝染色

### 一、MTS 染色

#### 【目的】

1. 掌握 MTS 染色的原理、结果判断及注意事项。
2. 掌握 MTS 染色的操作方法。

#### 【原理】

MTS 名为[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁), 内盐] , [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium], 是一种新型甲臞化合物, 和 MTT 同属四唑氮衍生物。MTS 能被活细胞里的线粒体脱氢酶还原成一种可溶于组织培养基的棕黄色水溶性的甲臞复合物, 在 490 nm 处测定吸光度值。通过测定甲臞的光谱吸收, 进而可以测定细胞的增殖情况。细胞增殖越多越快, 还原生成的甲臞复合物越多, 培养基的颜色越深, 吸光度值越大。对于同样的细胞, 吸光度值和细胞数量呈线性关系。

#### 【试剂与器材】

1. 器材: 96 孔板酶标仪、加样枪 (10  $\mu$ l 和 100  $\mu$ l)、96 孔细胞培养板、枪头
2. 试剂: MTS 试剂、1640 培养基

#### 【操作】

##### 1. 活性测定使用方法:

(1) 收集细胞, 加细胞悬液 100  $\mu$ l (约 5000~10000 个细胞) 到 96 孔板 (边缘孔用无菌水或 PBS 填充)。每板设对照 (加 100  $\mu$ l 培养基)。

(2) 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育过夜, 倒置显微镜下观察。

(3) 每孔加入 10  $\mu$ l 待检测药物溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育。

(4) 每孔加入 10  $\mu$ l MTS 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1-4 小时。

(5) 测定 490 nm 各孔的吸光度。

(6) 同时设置空白孔 (培养基和 MTS 溶液, 无细胞), 对照孔 (不加药培养基和 MTS 溶液, 有细胞), 每组设定 3-5 个复孔。

##### 2. 数量测定使用方法:

(1) 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。

(2) 按比例（例如 1/2 比例）依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般要做 3-5 个细胞浓度梯度，每组 3-6 个复孔。

(3) 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后加 MTS 试剂培养一定时间后测定 OD 值，以细胞数量为横坐标（X 轴），OD 值为纵坐标（Y 轴）制作出一条标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量（使用此标准曲线的前提条件是实验的条件要一致）。

### 【结果】

细胞活力计算：

将各测试孔的 OD 值减去调零孔 OD 值或对照孔 OD 值。各重复孔的 OD 值取平均数。

细胞活力%=[(加药细胞 OD-空白 OD)/(对照细胞 OD-空白 OD)]×100%

### 【注意事项】

1. 铺板的细胞数量要准确，否则影响实验结果的准确性。
2. 加入 MTS 试剂后孵育的时间要充分，以保证 MTS 充分地被细胞内的线粒体脱氢酶还原。

## 二、台盼蓝染色

### 【目的】

1. 掌握台盼蓝染色的原理、结果判断及注意事项。
2. 掌握台盼蓝染色的操作方法。

### 【原理】

台盼蓝（trypan blue）是一种阴离子型染料，不能透过活细胞正常完整的细胞膜，故活细胞不着色，即产生所谓的拒染现象。死亡细胞的细胞膜通透性增加，可使染料通过细胞膜进入细胞内，使死细胞着色而呈蓝色。台盼蓝染色后，通过显微镜下直接计数或显微镜下拍照后计数，可对细胞存活率进行比较精确的定量，0.4%为最常用的浓度。

### 【试剂与器材】

1. 器材：

牛鲍氏计数板、微量吸样管（或 10  $\mu$ l 加样枪）、1.5 ml EP 管、10 ml 离心管、移液管、吸头、显微镜、离心机、加样枪（100  $\mu$ l 或 200  $\mu$ l）、枪头。

## 2. 试剂:

PBS、0.4%台盼蓝染色液。

### 【操作】

#### 1. 收集细胞:

如果收集贴壁细胞，应用胰蛋白酶—EDTA 溶液消化细胞，收集细胞。如果收集悬浮细胞，则可以直接收集细胞。收集好的细胞在 1000~2000 g 离心 5 min，弃上清，用 1 ml PBS 重新悬浮细胞沉淀。

#### 2. 台盼蓝染色:

吸取 100  $\mu$ l 细胞悬液到 1.5 ml EP 管内，加入 100  $\mu$ l 0.4%的台盼蓝染色液，轻轻混匀，静置 3 min（染色时间可适当延长，但不宜超过 10 min）。

#### 3. 细胞计数:

吸取经过染色后的细胞，用血细胞计数板计数。通常如果要比较精确地进行定量，每个细胞样品至少需要数 500 个细胞，数出蓝色细胞和细胞总数。细胞存活率计算公式如下：

$$\text{细胞存活率} = (\text{细胞总数} - \text{蓝色细胞数}) / \text{细胞总数} \times 100\%$$

### 【结果】

活细胞透明不着色，死细胞着蓝色。

### 【注意事项】

1. 如果是贴壁细胞，用胰蛋白酶—EDTA 消化细胞的时间要恰当。如时间过短，细胞未消化成单个细胞，影响细胞计数的准确性；如消化过度，细胞被胰蛋白酶损伤，而被台盼蓝染色，影响实验结果的准确性。
2. 台盼蓝染色的时间不应太长。台盼蓝属于大分子物质，虽然不能渗透细胞膜，但如果染色时间过长，会因胞吞作用进入细胞，从而使细胞着色。