

分溶解于900ml dd H₂O, 定容至1000ml, 高温高压消毒。

细胞培养方法

将冻存的ACC-M细胞于37℃水浴中快速复苏, 加入10倍的含血清培养基离心后, 弃去上清液, 加入含10% 56℃灭活的新生牛血清, 含300mg/l谷氨酰胺, 2g/l碳酸氢钠的RPMI1640培养液吹打均匀后接种于50ml培养瓶中, 置于5%的CO₂ 37℃培养箱内培养。每隔2天换液, 倒置显微镜下观察细胞的生长状态, 待细胞长到瓶底的80%时, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 镜下观察见细胞变圆, 细胞间隙增大时加入RPMI1640培养液2ml终止消化, 用吸管吹打成单细胞悬液, 根据需要调整细胞浓度进行细胞传代、实验和冻存。用倒置相差显微镜观察细胞培养过程中的形态变化, 并照相记录。实验均用复苏传代三次后细胞。

细胞爬片制作

无菌盖玻片制作: 盖玻片泡酸 (浓硫酸和高锰酸钾配成的强酸), 自来水充分冲洗, 蒸馏水冲洗, 自然风干, 高温高压消毒 (注意盖玻片在泡酸和冲洗中不能叠在一起, 否则易出现水痕)。

将已清洗并高温高压灭菌的盖玻片预先放到6孔培养板中; 取生长良好的细胞, 用0.25%胰酶消化后, 以 2×10^4 个/孔细胞浓度接种到6孔板中, 待细胞爬满盖玻片80%后, 弃去培养基, PBS充分冲洗, 4%多聚甲醛 (PBS配制) 室温下固定30分钟, PBS冲洗3次各5分钟, 备用。

2.3 免疫细胞化学

2.3.1 0.2% Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚) 配制

先用PBS (免疫组化用) 配成20%的储备液, 置37℃~40℃水浴中2~3h使其充分溶解混匀。临用前再用PBS稀释至所需浓度。

2.3.2 免疫细胞化学步骤

- 1) 细胞爬片标本加入0.2% Triton X-100 (PBS配制) 孵育5分钟, PBS清洗标本3次各5分钟;
- 2) 加1滴过氧化物酶阻断溶液 (试剂A), 以阻断内源性过氧化物酶活性, 室温下孵育15分钟。蒸馏水洗 (2×3 min), PBS冲洗 (3×5 min);
- 3) 加1滴非免疫动物血清封闭液 (试剂B), 室温下孵育15min, PBS冲洗