

第一部分 细胞培养的基本技术

- 第1章 细胞培养概论 /3
 - 一、细胞培养的概念 /3
 - 二、细胞培养的发展及现状 /3
 - 三、细胞培养的应用 /4

- 第2章 细胞培养实验室的建立 /6
 - 一、细胞培养的无菌操作设施 /6
 - 二、细胞培养箱 /8
 - 三、细胞观察用显微镜 /8
 - 四、冰箱 /9
 - 五、水纯化装置 /9
 - 六、细胞储存设备 /10
 - 七、液体除菌过滤装置 /11
 - 八、高温高压消毒装置 /12
 - 九、离心机 /13
 - 十、其他 /13

- 第3章 细胞培养用品及其准备 /15
 - 一、细胞培养瓶、培养皿和培养板 /15
 - 二、移液管和吸管 /16
 - 三、离心管 /17
 - 四、其他用品 /17
 - 五、玻璃器皿的清洗及消毒 /18

- 第4章 细胞培养用的液体 /20
 - 一、细胞培养所需的培养液 /20
 - 二、平衡盐溶液 /21
 - 三、血清 /21
 - 四、抗生素 /21
 - 五、特殊的添加因子 /22
 - 六、消化液 /22
 - 七、细胞培养用的其他液体 /23

第5章 细胞培养技术 /25

- 一、细胞培养的基本操作 /25
- 二、体外培养细胞的一般性质 /26
- 三、细胞的引进培养和传代培养 /31
- 四、原代细胞的分离培养 /34
- 五、人脐静脉内皮细胞的培养 /37
- 六、人胚胎肝细胞的培养 /38
- 七、人胚胎肺成纤维细胞的培养 /40
- 八、人外周血B淋巴细胞的转化 /42
- 九、新生大鼠骨骼肌细胞原代培养
及肌管诱导分化 /44
- 十、小鼠胚胎成纤维细胞的培养 /46
- 十一、视神经星状胶质细胞的培养 /47
- 十二、肿瘤细胞的原代培养 /49
- 十三、兔胸主动脉平滑肌细胞的原代
培养 /51

第6章 培养细胞的相差显微镜观察 /53

- 一、倒置相差显微镜的使用 /53
- 二、显微照相技术 /54
- 三、培养细胞的相差显微镜观察 /55
- 四、培养细胞的形态学观察 /60
- 五、培养细胞的免疫组化观察 /61
- 六、细胞的电子显微镜观察 /64

第7章 细胞的冻存和复苏 /69

- 一、细胞冻存方法 /69
- 二、冻存细胞复苏方法 /70

第8章 细胞的三维培养 /71

- 一、细胞的聚集体培养 /71
- 二、细胞在基质凝胶中的培养 /71

第 1 章

细胞培养概论

一、细胞培养的概念

广义的细胞培养泛指所有的体外培养，最早源自组织培养（tissue culture），指从机体取出组织，模拟体内的生理环境，使之在体外生存和生长，并维持其结构和功能的方法；另外，还有器官培养（organ culture），指取器官的原基、一部分或整个器官，使其在体外生存、生长并保持一定功能。狭义的细胞培养则是指利用酶消化、机械或化学方法使细胞从组织器官分散出来，在体外进行培养。因组织培养和器官培养的实质也就是培养其中的细胞，故常常统称为细胞培养（cell culture）。

二、细胞培养的发展及现状

细胞培养的发展是与相关学科的发展及相应技术条件的改善密切相关的。真正的细胞培养始于 20 世纪初。1907 年，RG Harrison 用自己设计的组织培养方法证明了蛙胚胎神经细胞在体外的生长活动。其实验方法产生了深远的影响，为后来开展细胞体外研究开辟了新的途径，显示了广阔的前景。1912 年，作为外科医师的 A Carrel，将严格的外科无菌操作引进到组织培养技术中，大大降低了造成污染的风险，提高了培养的成功率。此外，他还发明了细胞培养瓶。他一直致力于动物组织的培养，并与 Burrow MT 合作，成功培养了成年犬、猫、小鼠及肿瘤组织的外植物，并证明体外培养的细胞也可以传代，即把已体外培养成功的细胞分成几份，再加入新鲜的培养液。这些细胞不但可以存活，而且可以增殖。1916 年，Rous 和 Jones 将胰蛋白酶引入细胞培养。1948 年，Keilova 将抗生素引入细胞培养。1952 年，GO Gey 成功培养了人类的肿瘤组织并建立了至今仍在使用的 HeLa 细胞系，使细胞培养发展到人类组织培养的阶段。1957 年，Dulbecco 采用胰蛋白酶消化处理和应用液体培养液的方法，获得了单层细胞。单层细胞培养法的出现，对组织培养技术的发展起到了很大的推动作用。20 世纪 50 年代末，人们发现了培养细胞中的支原体污染。1961 年，Hayflick 和 Moorhead 通过严格的连续传代，定义了正常细胞的有限生命周期。接下来的几年里，他们发现正常细

胞在培养过程中的自发转化（永生化）现象，并利用琼脂培养选择永生化细胞。1964年，开始利用培养的细胞制备和生产病毒疫苗。1967年，Gartler发现了细胞间的交叉污染现象，如HeLa细胞交叉污染细胞，后续又不断发现了更多细胞被HeLa细胞交叉污染。到目前为止，仍有学者在使用这些细胞进行研究，以至于2007年美国《Science》期刊发文暴露此种细胞间交叉污染的严重性及危害，提醒学者在应用其进行研究时应当注意。1973年，有学者将外源DNA引入细胞。1975年，杂交瘤诞生，至此拉开了大规模细胞培养及细胞工程的序幕，目前该项技术仍在如火如荼地进行。20世纪80年代，以众多细胞系的建立为特点。现在的细胞培养，除了传统的应用于生命基本现象研究、疾病发生发展机制的研究外，更渗透到了再生医学和生物制药等领域。现在细胞培养已成为非常成熟的技术。随着培养条件的改善，如层流超净台、超净实验室等的使用，该技术也越来越容易掌握。

随着细胞生物学、分子生物学、生物工程等方面的不断发展，通过近100年对细胞生存环境方面相关知识的积累，对细胞培养所需成分、所需特殊因子等的了解也在不断增加。随着细胞培养条件、技术的不断发展和完善，人们可以在体外成功培养的细胞种类也越来越多。虽然细胞离体后，会因失去了神经体液的调节和细胞间的相互影响而发生很多变化，但短期在体外培养的细胞或有限培养代数内的培养细胞，可视为一种在特定条件下的细胞群体，它们既保持着与体内细胞基本相同的结构和功能，又有一些不同于体内细胞的性状，因此并未失去研究的意义。特别是原代培养和早期传代培养的细胞，仍为二倍体细胞，生物学特性与体内非常接近，所以越来越多的科学家，不再受有限种类肿瘤细胞系的局限，转而开始应用原代培养或有限培养的正常细胞进行科学研究。相信不久的将来，体内所有的细胞都可以在体外进行培养，即使不能大量增殖，也可在体外维持存活，从而为科学研究提供更大的便利。直到今日，经过近100年的发展，人们更加认识到用细胞培养进行的体外研究工作，不仅可以在许多方面与体内研究互相补充，而且具有体内研究不可代替的优点，因此人们更加确认体内研究与体外研究两大途径缺一不可。

三、细胞培养的应用

“一切生命的奥秘都需要在细胞中寻找。”细胞是最基本的生命单位，具备生命个体固有的遗传信息和功能特性。生命科学发展到今天，人们已经开始从分子水平、基因水平上认识生命的本质和人类各种疾病的发生、发展机制。人类基因组计划的实施，也已经完成了人体各染色体的测序工作，为人类基因工程研究绘出了宏伟的蓝图。今后，在很长时间内，细胞培养是功能基因组研究及疾病基因

组研究中最方便、最快捷的不可或缺的研究工具。诊断基因水平的各种治疗手段（如靶向治疗），其蛋白或抗体的产生也要以细胞为生产基质或载体。如前所述，细胞培养可用于基本生命现象的研究，如细胞的各种生命活动（DNA 复制转录、蛋白质合成加工分解、细胞分裂、细胞内各种物质的代谢）及其调控；可用于疾病的研究，如肿瘤发生、发展机制的分子生物学；可用于疾病治疗的研究，如药物代谢、发挥作用的机制及抑制药的筛选等；可用于生物工程，如蛋白质的分泌、表达、生产；可用于组织工程，如组织构建、组织相容性支架的筛选、培养各种干细胞用于组织修复等。细胞培养还可应用于建立毒物、致癌物筛选的模型中。

细胞生物学、分子生物学及生物医学的发展前途是不可限量的，医药方面对生物制品的要求也越来越高。细胞培养是体外研究细胞的最好工具，与体内细胞的研究有相辅相成的作用。细胞培养技术为生命科学、医学基础研究和生物技术产业化提供了重要的技术手段，具有重要的社会意义和经济意义。

（刘玉琴）

第 2 章

细胞培养实验室的建立

为满足细胞培养工作的需要，细胞培养实验室通常需要具备无菌操作设施、实验细胞状态观察设备、细胞孵（温）育设备（37℃）、配制各种细胞培养用液体所需的设备，以及实验用品的清洗、无菌处理和细胞贮存设备。所需实验室至少由 2 个房间组成，无菌操作、实验观察、孵育可在同一房间内，清洗、消毒则最好安置在另一房间内。在空间充裕的条件下或新建实验室时，不同功能区域可设置成单独房间。若仅有一个较大的房间，则应区分不同的功能区，无菌操作区设置在房间内较少走动的一侧。

一、细胞培养的无菌操作设施

细胞培养的无菌操作设施主要有超净工作台和超净工作室。

（一）超净工作台

这是一般实验室可采用的普及型无菌操作装置。其工作原理是利用鼓风机驱动空气经过高效过滤装置净化后再通过工作台面，在工作台面构成无菌环境。超净工作台占据空间面积小，启动电源后很快即可使用，操作方便。超净工作台也应放在清洁无尘的房间，且须定期更换过滤装置。由于空气中浮尘颗粒较多，为延长超净工作台的使用寿命，可用 5~8 层纱布覆盖在第一级滤口外侧，阻挡较大的颗粒。国内有许多厂家生产超净工作台，有单人使用和双人使用的不同型号可供选择。超净工作台根据气流和隔离屏障分为生物安全 I 级、生物安全 II_A 级、II_B 级和生物安全 III 级及以上（图 2-1）。根据所培养细胞的生物安全级别（生物安全 I、II、III 级），选择相应级别的生物安全柜。普通超净台，可作 I 级安全柜使用。两者空气过滤相同，气流方向有所差别。后者有排风系统。现在许多改良的超净台，也增加了回风设计，可满足细胞培养的无菌操作需要，可供大部分常规培养细胞（I 级）使用。生物安全 II_A 级、II_B 级超净工作台可供生物安全 II 级的细胞培养实验使用，生物安全 III 级及以上培养物的培养和实验不但需要 III 级生物安全柜，还需要特殊的生物安全 III 级实验室，进出该实验室的所有物品包括空气都需灭菌处理。

（二）超净实验室

超净实验室一般包括无菌操作间、缓冲间和更衣间（图 2-2）。整个超净实验



图 2-1 超净工作台

左图为生物安全Ⅱ级超净工作台，右图为普通超净工作台

室的空气是经滤过后通过送风系统将洁净的空气送入密闭空间。空气洁净度一般要达到 10^4 颗粒/ m^3 以下，细胞培养无菌操作间的局部空气洁净度要达到 10^2 颗粒/ m^3 以下。可根据实验规模确定无菌操作间的大小，一般至少应为 $3\sim 5m^2$ ，可容纳两人同时操作。 CO_2 孵箱、显微镜和离心机可放置在缓冲间。整个超净实验室应有紫外杀菌装置和滤过空气的恒温恒湿装置。无菌操作间的房顶、墙壁、地面均应光滑、无死角，并定期（每 1~2 周）进行清洁、消毒、检测。

无论选择哪种操作设备条件，在日常的工作中要时时保持操作台面的清洁，而且还要定期更换设备的中效、高效过滤系统，可根据设备使用频率和使用时间长短而定。通常工作情况下 1.5~2 年更换一次。特别是，如果近期反复出现类似霉菌、酵母菌的污染，经过多次采取措施而无效者，就应该考虑彻底更换中高效过滤器。



图 2-2 超净实验室无菌操作间一角

图片中为洁净度为 10^2 级的操作台

二、细胞培养箱

在体外培养动物细胞或人体细胞时，需要如体内一样的恒定温度（37℃），有各式恒温培养箱可满足需要（图 2-3）。细胞培养用恒温培养箱最好是水套式的，温度变化幅度小，更好的是 CO₂ 培养箱。后一种培养箱内不但恒温，还可控制 CO₂ 浓度（一般用 5%），可稳定培养液的 pH，温度设置为 37℃，且变化一般不超过 0.5℃。体积通常在 150~200L，可根据实验细胞培养工作量购置相应体积的培养箱。昆虫细胞的培养因不需 CO₂，可使用一般水套式恒温培养箱，温度设定在 32℃。现在还有三气培养箱，可同时控制 O₂/N₂/CO₂ 的浓度，可用于缺氧等特殊条件下的细胞培养。



图 2-3 各种培养箱

左上，CO₂ 培养箱；右上，三气培养箱；左下，转动培养箱；右下，双门 CO₂ 培养箱

三、细胞观察用显微镜

体外培养的细胞需要在显微镜下观察其生长状况，以便确定接下来的处理方案。倒置相差显微镜是专门设计用于观察活细胞的设备（图 2-4），Olympus、Nikon 及 Leica 等商家均有不同配置的相差显微镜。单纯观察细胞可选配置比较简单的，

但至少应配有照相系统，以便随时记录细胞形态等。在无菌区内，要把显微镜安装在平坦水平的台面上，能够支持显微镜的重量，无菌区内最好用不锈钢镜台，便于消毒。在使用过程中，如果发现培养物溅洒在载物台上，要及时擦去。倒置相差显微镜应根据选择不同倍数的物镜而调节相衬滑板，并且适时用相差校正目镜调整对中光环或浮雕带来达到理想的相衬效果。



图 2-4 不同厂家的倒置相差显微镜

四、冰 箱

细胞培养所用的各种液体均应低温保存。4℃冰箱用于存放培养液、平衡盐溶液、消化液等即用液体，-20℃或-80℃冰箱用来贮存血清、抗生素、胰蛋白酶、细胞培养所需添加的蛋白质性的生长因子等，因为这些液体需要冷冻以保持其生物活性（图 2-5）。注意低温冰箱应放置于环境相对清洁、通风、有良好的供电保障系统（因其为双压缩机制冷、启动电流较大）的地方。要定期清洗散热器海绵网。

五、水纯化装置

细胞培养对水的要求非常高，三蒸水和去离子水都符合要求。现在有多家公



图 2-5 各种冰箱

左为-80℃冰箱，右上为-20℃冰箱，右下为4℃冰箱

司供应超纯水设备（图 2-6），均可制备无热原的超纯水，也有公司提供专门细胞培养用水。除各种细胞培养用制剂应该使用符合细胞培养用标准外，所有的用于细胞培养的器材也应保持高度清洁、无菌，特别是玻璃制品，其洗涤过程都需要经过纯化水处理。值得注意的是超纯水器要定期清洗过滤系统、定期更换滤柱、定期检测水质（检查水质最好的办法是定期检查敏感细胞的贴壁率）。

六、细胞储存设备

冷冻储藏技术的发展为体外培养细胞的长期储藏提供了条件。成功培养的细胞在不用或保存时可储藏在液氮储存罐中（图 2-7）。一般的实验室可选用不同容积（35L、50L、70L 等）的国产液氮储存罐。由于液氮会不断挥发，所以需定期添加液氮，否则待液氮全部挥发，会导致储藏的细胞全部死亡。实验室全部细胞的“全军覆灭”时有发生，这绝不是危言耸听。细胞中心、细胞库常备有可自动添加液氮的大型液氮储存罐，容积通常数百到上千升。每个大型液氮储存罐可容纳 10 000 支以上的细胞冻存管，其罐中还配有专门的架子或提篮摆放冻存管。存放液氮储存罐的房间应注意通风，以防止液氮挥发造成操作人员的缺氧。



图 2-6 不同厂家的超纯水纯化设备

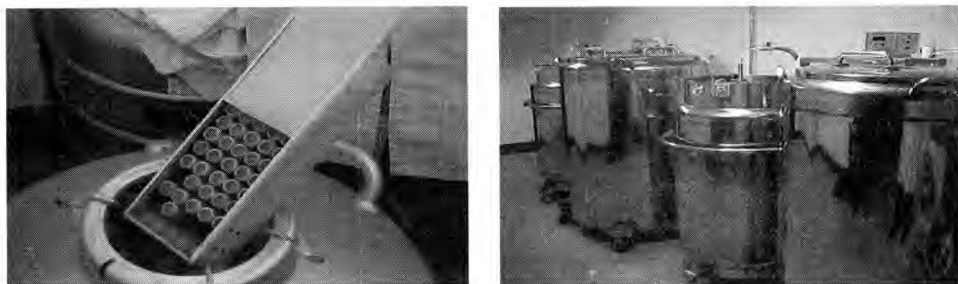


图 2-7 小型及大型液氮储存罐

七、液体除菌过滤装置

有许多细胞培养用的液体不能用高温高压的方法来消毒，因为高温高压会导致营养成分的失活，所以须用微孔滤膜过滤除菌（图 2-8）。一般，实验室可选用 1L 或 2L 的不锈钢滤器，用橡胶气囊加压过滤。Millipore、Gelman 等公司也有一次性针式滤器可供选用，但价格较高。规模稍大的实验室可选用蠕动泵加压过滤。



图 2-8 蠕动泵过滤除菌

八、高温高压消毒装置

细胞培养及其相关操作所用物品均须做无菌处理。除直接接触细胞的物品外，工作服、孵箱内添加的水、冻存时预冷使用的棉花等均应高温高压消毒。根据具体情况可自备蒸汽式消毒锅、干热消毒烤箱等（图 2-9），也可与他人共用。干热消毒烤箱可用于玻璃器皿的消毒及热原的去除。



图 2-9 高温高压消毒锅和烤箱

九、离心机

细胞培养过程中经常需要对细胞悬液进行离心处理，如洗涤细胞或调节细胞浓度等。细胞悬液离心时的转速一般为每分钟1 000转左右，时间10~15min即可。国产的低速离心机即可满足要求。当然，也可根据经费情况，选择功能复杂的离心机，如配有维持低温功能的离心机（图2-10）。离心前注意样品配平，离心完毕后待转速回零后再开启机盖取出样品，并及时清理离心机。

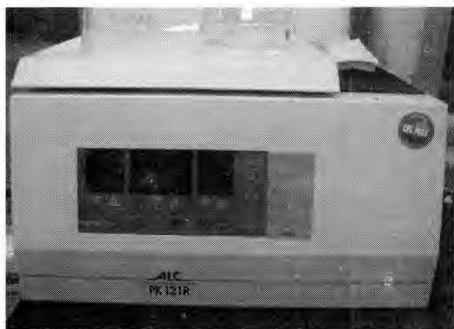


图2-10 离心机

十、其他

建立细胞培养实验室，还须配有不同量程的天平、渗透压测量仪、PCR仪、pH计、手术器械、电动可调式移液器等器械和设备（图2-11）。



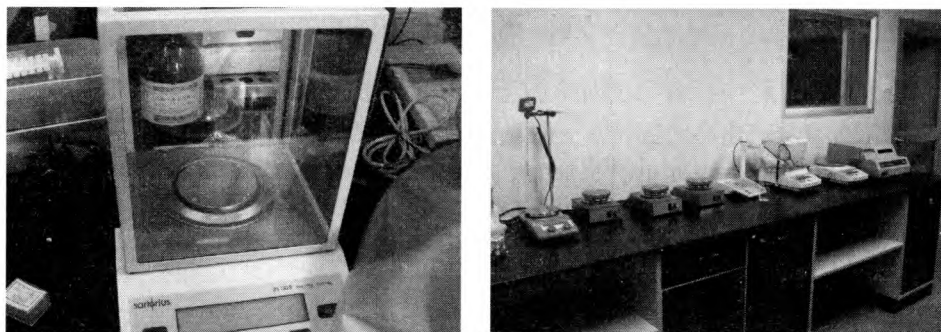


图 2-11 渗透压测量仪、PCR 仪、天平、磁力搅拌器

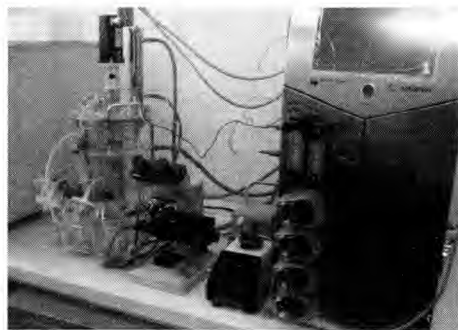
(刘玉琴 张宏)

第 3 章

细胞培养用品及其准备

一、细胞培养瓶、培养皿和培养板

目前，细胞培养已很少使用传统的玻璃制品，如玻璃卡氏培养瓶、玻璃离心管、玻璃试剂瓶，而多数使用一次性的塑料制培养瓶、塑料制离心管及塑料制移液管等，而且这些物品的规格也较丰富，如培养瓶 T25、T75、T150、T175（阿拉伯数字表示培养面积），现在还出现了培养袋、普通培养板（有不同孔径的，如 6 孔、12 孔、24 孔、48 孔、96 孔等）、培养皿（有不同直径的，如 60mm、100mm、150mm）及大面积多层培养板（图 3-1）。多孔板的使用便于开展高通量筛选，节省了细胞用量。大面积培养可用于以细胞为基质进行生物工程产品的研发、制备和生产等。在生物工程产品研发、制备、生产等应用的驱使下，现在还出现了分别针对悬浮细胞或贴壁细胞培养用的转瓶、中空纤维细胞培养装置、细胞发酵罐（5L、10L、30L、50L 等），都可用于大规模的细胞培养。



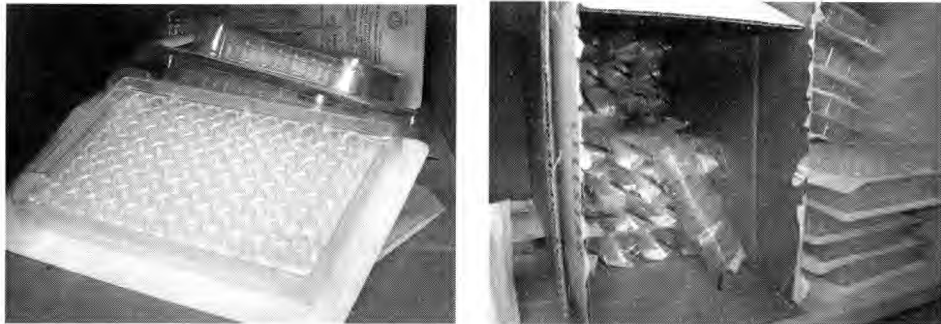


图 3-1 各种细胞培养瓶、培养皿、培养板

二、移液管和吸管

对于移液管和吸管，玻璃制或塑料制的均可选用，但需要准备不同规格以便操作时按需选用（如 1ml、5ml、10ml 等）。一般装在玻璃或不锈钢筒中消毒。国外有一次性塑料吸管，规格与玻璃吸管相同。此外，还有电动的移液器，操作方便、省力。为方便多孔培养板的使用及快速、准确地微量加液，还有多孔加样枪（图 3-2）。在实际操作中，可根据具体培养量及使用的培养器皿选择合适的移液工具。

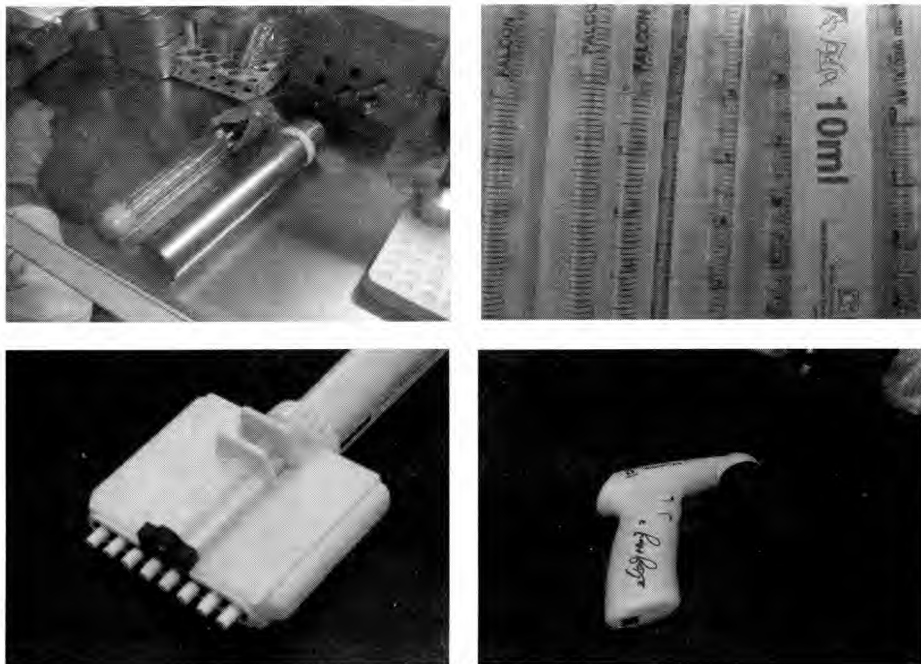


图 3-2 各种移液管和加样枪

三、离心管

在细胞传代过程中，消化后的细胞悬液需要离心，以去除胰蛋白酶，或进行计数和调整细胞浓度等。常用的离心管包括 5ml、15ml、50ml 规格的，塑料制或玻璃制的离心管均可，也有厂家提供商品化的 20 支一包、已消毒好的一次性塑料离心管（图 3-3）。玻璃离心管需严格按照玻璃器皿清洗消毒程序进行无菌处理。

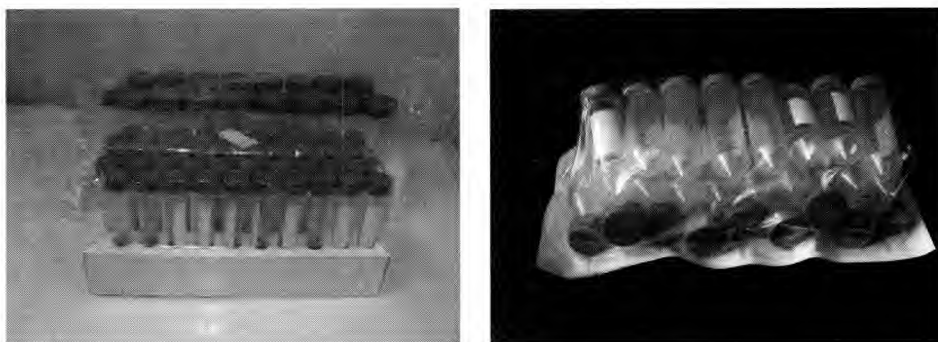


图 3-3 塑料无菌离心管

四、其他用品

细胞培养还需要细胞冻存管、青霉素小瓶、不同规格的 Eppendorf 管等，用于分装血清、抗生素等；500ml、250ml、100ml、50ml 等规格的试剂瓶，经清洗、消毒后，用于分装培养液、血清及消化液等。另外，还需准备喷壶、吸头、棉花及滤器等（图 3-4）。



A

B