

# 动物细胞 培养技术

程宝鸾 主编



Techniques for Animal Cell Culture

中山大学出版社

# 动物细胞培养技术

程宝鸾 主编

中山大学出版社

· 广州 ·

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞培养技术/程宝鸾主编. —广州: 中山大学出版社, 2006. 10

ISBN 7 - 306 - 02776 - X

I. 动… II. 程… III. 动物—细胞培养 IV. Q954.6 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 109755 号

---

责任编辑: 周建华

封面设计: 曹巩华

责任校对: 海 生

责任技编: 黄少伟

出版发行: 中山大学出版社

编辑部电话 (020) 84111996, 84113349

发行部电话 (020) 84111998, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传真: (020) 84036565

印 刷 者: 广东南海系列印刷公司

经 销 者: 广东新华发行集团

规 格: 787 mm × 960 mm 1/16 13.5 印张 279 千字

版次印次: 2006 年 10 月第 1 版 2006 年 10 月第 1 次印刷

定 价: 28.00 元

---

本书如有印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换

## 《动物细胞培养技术》编委会

主    编：程宝鸾  
主    审：罗深秋    吴文言  
电脑绘图：黄美贤    刘剑君  
录像图：柯志勇    侯云霞    刘剑君  
插图排版：黄美贤    刘剑君

## 前 言

2000年出版的《动物细胞培养技术》教材，读者小有裨益。此书不仅引导读者入门学习，而且对他们后期课题研究方法的正确操作有指导意义。根据近几年读者反馈的信息和要求，作者对本书第一版内容进行全面修改和充实。

修订本保留了原版教材的部分内容，增添了大量操作和研究图片，使操作要领、基本理论和实验结果图文结合，直观明了；实验方法突出技能培养和实验成败分析，各章单设实验注意事项，既介绍取得实验成功的关键因素，也提出初学者易出现的差错或可能导致实验失败的因素；充实了细胞研究技术和动物常用的细胞注射技术等内容。全书将实验准备、细胞培养、细胞研究融为一体，既适合相关专业的硕士研究生教学训练，又适合自学入门。效果究竟如何，敬请读者批评指正。

本书部分细胞图片由张正治教授等11位研究者提供，特此感谢。

程宝鸾

2006年8月

# 目 录

<b>第一章 细胞培养概述</b> .....	(1)
一、细胞培养发展简史 .....	(1)
二、细胞培养的基本概念 .....	(3)
三、细胞培养实验的基本要求 .....	(4)
<b>第二章 细胞培养准备技术</b> .....	(6)
<b>第一节 实验器材清洗、包装和消毒</b> .....	(6)
一、常用的实验器材 .....	(6)
二、清洗 .....	(7)
三、包装 .....	(10)
四、消毒 .....	(12)
<b>第二节 实验室常用的仪器设备使用和维护</b> .....	(18)
一、净化台 .....	(18)
二、自动双重纯水蒸馏器 .....	(19)
三、抽气泵 .....	(20)
四、压力蒸汽消毒器 .....	(21)
五、电热恒温培养箱 .....	(22)
六、电热恒温干燥箱 .....	(22)
七、液氮生物容器 .....	(23)
八、CO <sub>2</sub> 培养箱 .....	(24)
九、冰箱 .....	(27)
<b>第三节 动物细胞用液制备</b> .....	(27)
一、蒸馏水 .....	(27)
二、平衡盐溶液 .....	(28)
三、天然培养基 .....	(30)
四、合成培养基 .....	(32)
五、血清细胞培养基 .....	(38)

六、无血清细胞培养基 .....	(39)
七、消化液 .....	(44)
八、稳定剂 .....	(46)
九、蛋白酶抑制剂 .....	(46)
十、pH 调整液 .....	(46)
十一、20 mmol/L L-谷氨酰胺 .....	(46)
十二、抗菌素液 .....	(47)
十三、细胞用液的分装方法和要求 .....	(48)
思考题 .....	(50)
<b>第三章 细胞培养基本技术 .....</b>	<b>(52)</b>
<b>第一节 细胞原代培养 .....</b>	<b>(52)</b>
一、乳鼠肺组织原代培养程序 .....	(52)
二、原代细胞实验操作要领 .....	(55)
三、原代细胞实验注意事项 .....	(56)
四、原代细胞实验取材 .....	(57)
五、原代细胞培养方法介绍 .....	(61)
<b>第二节 培养细胞的观察 .....</b>	<b>(67)</b>
一、培养细胞分型 .....	(67)
二、细胞培养中的常用术语 .....	(69)
三、培养细胞一代生长过程 .....	(70)
四、细胞周期 .....	(77)
五、培养细胞的生命期 .....	(78)
<b>第三节 培养细胞常规检查和生物学检测 .....</b>	<b>(81)</b>
一、培养细胞常规检查 .....	(81)
二、培养细胞的生物学检查和鉴定 .....	(87)
<b>第四节 细胞传代培养 .....</b>	<b>(91)</b>
一、细胞传代方法 .....	(91)
二、乳鼠原代肺细胞培养物传代 .....	(92)
三、盖玻片条细胞培养法 .....	(94)
四、死、活细胞鉴别试验 .....	(95)
<b>第五节 细胞冻存、复苏、运输和短期保存 .....</b>	<b>(97)</b>
一、影响冻存细胞活性的因素 .....	(97)

---

二、细胞冻存方法 .....	(98)
三、组织细胞短期保存方法 .....	(101)
四、细胞复苏方法 .....	(101)
五、细胞运输 .....	(102)
六、引进细胞的方法 .....	(102)
思考题 .....	(103)
<b>第四章 细胞培养研究技术 .....</b>	<b>(104)</b>
<b>第一节 细胞的分离和纯化 .....</b>	<b>(104)</b>
一、成纤维细胞的分离和去除 .....	(104)
二、骨髓和外周血有核细胞的纯化 .....	(107)
三、肿瘤细胞的分离纯化 .....	(108)
四、单核细胞和巨噬细胞的纯化 .....	(110)
五、上皮细胞的纯化 .....	(111)
六、细胞移速分离纯化 .....	(112)
<b>第二节 培养细胞活力检测方法 .....</b>	<b>(112)</b>
一、细胞克隆形成试验 .....	(112)
二、细胞活性染色法 .....	(117)
三、细胞四唑盐比色法 .....	(119)
<b>第三节 细胞形态学研究方法 .....</b>	<b>(120)</b>
一、培养细胞的固定 .....	(120)
二、培养细胞常用染色法 .....	(123)
三、细胞免疫化学染色 .....	(129)
四、培养细胞透射电镜样品的制备 .....	(138)
五、培养细胞扫描电镜样品的制备 .....	(139)
<b>第四节 细胞遗传学的检测方法 .....</b>	<b>(140)</b>
一、细胞 DNA 定量的测定 .....	(140)
二、细胞 DNA 合成的测定 .....	(142)
三、细胞 DNA 双参数的测定 .....	(145)
四、人体外周血淋巴细胞染色体标本的制备 .....	(146)
五、培养细胞染色体标本的制备 .....	(147)
六、染色体 G 显带 .....	(148)
七、姐妹染色单体区分染色法 .....	(155)



第五节 显微摄影技术 .....	(157)
一、显微镜的光学部件和显微照相操作 .....	(157)
二、相差显微镜 .....	(175)
三、荧光显微镜 .....	(179)
<b>第五章 原代细胞培养和分析 .....</b>	<b>(185)</b>
第一节 SD 乳鼠心肌细胞的分离培养 .....	(185)
一、准备 .....	(185)
二、心肌细胞的分离培养 .....	(185)
三、原代心肌细胞生长观察 .....	(186)
四、讨论 .....	(189)
第二节 大鼠血管平滑肌细胞的分离培养 .....	(190)
一、准备 .....	(190)
二、取材 .....	(190)
三、血管平滑肌细胞的分离培养 .....	(191)
四、原代血管平滑肌细胞生长观察 .....	(191)
五、讨论 .....	(192)
第三节 成人前脂肪细胞的分离培养 .....	(193)
一、准备 .....	(193)
二、前脂肪细胞的分离培养 .....	(194)
三、原代前脂肪细胞生长观察 .....	(194)
四、讨论 .....	(196)
第四节 大鼠肺微血管内皮细胞的分离培养 .....	(196)
一、准备 .....	(196)
二、肺微血管内皮细胞的分离培养 .....	(196)
三、原代肺微血管内皮细胞生长观察 .....	(197)
四、讨论 .....	(199)
<b>附录一 国内外细胞库 .....</b>	<b>(200)</b>
<b>附录二 动物常用的细胞注射技术 .....</b>	<b>(202)</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>(206)</b>

# 第一章 细胞培养概述

## 一、组织培养发展简史

1907年，美国生物学家 Harrison 采用单盖片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法，以淋巴液为培养基，观察了蛙胚神经细胞突起的生长过程，首创了体外组织培养法（见图 1-1）。

Burrows 于 1910 年观察到血浆凝块上培养的心肌组织块的搏动，1912 年他又观察到单个心肌细胞搏动，这是当时对心脏搏动肌原性理论的直接证明。同年，Carrel 用外科无菌操作方法，将 7 天鸡胚心肌组织块培养在血浆和鸡胚提取液的混合物内，观察到心肌细胞搏动达 104 天，并且他将原代细胞进行了长期传代培养。1939 年 Carrel 退休后，Ebeling 继续这项工作，一直到 1964 年，就这样，心肌细胞培养工作维持了 34 年。但这样长期培养的细胞系（株）是不能搏动的心肌成纤维细胞，那么它是从心脏细胞逆分化而来，还是从最初混入的成纤维细胞或血管内皮细胞而来的呢？也有人怀疑是他们经常加入新鲜的胚胎浸出物时带入了新细胞。1925 年，Maximow 将单盖片悬滴培养法改良为双盖片培养法。二者相比，后者传代方便，又减少污染。虽然悬滴培养法操作简便，但细胞生长空间狭小，气体不足，培养基少，细胞易老化，即使短时间生长也需经常更换培养基，因而易受污染。另外，悬滴培养法所使用的凹玻璃可引起折光，不宜进行显微镜观察和摄影。1923 年，Carrel 设计了卡氏瓶培养法，扩大了组织细胞的生存空间，且换液传代方便，也减少了污染机会。以 Carrel 和 Harrison 为首的科学家们用卡氏瓶培养各种组织细胞，并发表了大量论文，为组织培养的发展奠定了基础。在卡氏瓶的启发下，继而又出现了各种类型培养瓶、培养皿、试管、多孔培养板的培养法。

在培养器材更新的同时，培养方法的改进也十分迅速。1951 年，Pomerat 将双盖玻片悬滴培养法与灌流小室培养技术结合起来，使细胞生活在不断更新的培养液中，又便于显微摄影。以后又有人创立旋转鼓、旋转支架等培养方法，使组织和细胞交替地与培养液和空气接触，便于细胞代谢研究。1955~1957 年，Sanford 和 Dulbecco 等发明了用胰蛋白酶消化分离组织细胞的方法，建立了单层细胞培养技术。之后，一些细胞遗传性状相同的细胞系和细胞株的建立，正常组织原代细胞培养的研究更加深入，大大促进了组织培养技术的发展。

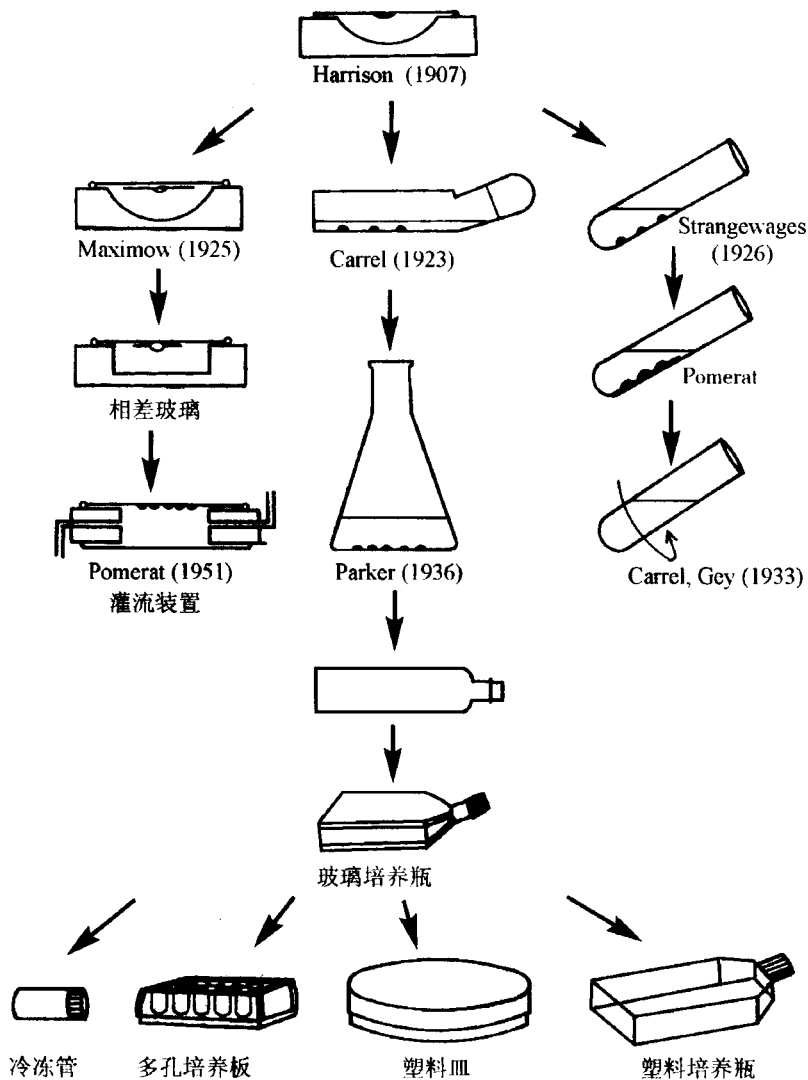


图 1-1 组织培养发展示意图

细胞培养液的研究也随着组织培养技术的改进而不断发展。早期细胞培养采用天然培养基（胎汁、血浆和血清）。天然培养基成分接近体内状态，但其组成复杂，是成分不明确的混合物，因而影响对某些实验产物的提取和实验结果的分析。1951年，Eagle

开发了能促进动物细胞体外培养的人工合成培养基。人工合成培养基的出现又促进了细胞培养技术的发展和应。目前，绝大多数人工合成培养基使用时还需添加血清。随着单克隆抗体制备、细胞生长因子和细胞分泌产物的研究，又开发了无血清细胞培养基研究技术。1975年，Sato等用激素、生长因子替代血清，使垂体细胞株培养获得了成功。近20多年来，已有几十种细胞株在无血清培养基中生长和繁殖。正常组织肝细胞和胰腺细胞等无血清培养的治疗研究也正在探索进展之中。

细胞培养技术是当今生命科学各研究领域的基础技术和基本技能，它广泛应用于细胞工程、基因工程和生物医学工程和干细胞研究等方面。优生和抗衰老的研究，肿瘤、感染、创伤和器官移植等问题的研究，都与细胞培养技术相关。因此，学习细胞培养技术方法及操作要领，是生命科学工作者必备的知识 and 技能。

## 二、细胞培养的基本概念

细胞培养是用酶消化法将组织碎块分离成单个细胞，用培养基制成细胞悬液，在体外适宜条件下，使细胞生长繁殖，并保留其一定的结构和功能特性。细胞培养与组织培养、器官培养的主要不同点是：原始培养的对象不同。细胞培养使用的是单个细胞悬液，组织培养使用的是组织块（ $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$ ）或薄片（厚 $0.2 \text{ mm}$ ），而器官培养使用的是器官原基或器官的一部分，或整个器官。在组织培养中，细胞自组织块周围移出并生长；在生长过程中，细胞总有移动（运动）或其他的变动，这样就使被培养的组织难以长期维持其原有的结构和功能。培养时间越长，发生变动的可能性越大，结果常使单一类型细胞保存下来，最终也成了细胞培养。细胞培养中，细胞的生命活动和体内细胞一样，仍然是相互依存的，呈现一定组织的特异性。所以，组织培养和细胞培养实际并无严格区别。

细胞培养技术是生命科学中常用的研究手段，该方法能排除神经体液因素的影响及肝、肾解毒功能的干扰，观察某些因素或药物对培养细胞的直接作用。通过实验可获得某一类型细胞的纯培养。例如，心肌组织中心肌细胞约占50%，非心肌细胞占50%；而经纯化分离的心肌细胞悬液中，心肌细胞可达95%以上，这样，心肌细胞原代培养实验基本上不受其他细胞的干扰。在细胞培养实验中能直接观察到培养细胞生命活动的动态过程；用定时显微摄影记录可发现一些肉眼观察不到的生命现象；还可利用电镜手段、同位素标记、放免法和免疫组化法等来研究细胞形态结构及细胞内化学物质的分布。

细胞培养方法的不足之处是：培养细胞失去体内细胞的制约和整体的调节作用，细胞形态和功能会发生一定程度的改变。培养方法、实验试剂对细胞形态和功能有一定的

影响，如胰蛋白酶可破坏细胞表面受体、酶、抗原等。长期体外培养的细胞，由于反复传代、冻存和操作等因素的影响，可能发生染色体非整倍体改变，呈永生化或癌变的特征。

### 三、细胞培养实验的基本要求

#### (一) 实验前准备

实验前必须分门别类地制定操作卡片，如清洗卡、消毒卡、细胞常用液（细胞培养液、BSS液、消化液）配制卡、牛血清检测分装卡、细胞原代和传代操作卡等。各卡片上注明实验所需器材的名称、规格、数量、操作要领和实验注意事项等。实验前应按卡片收集、清点所需用品，一并放入超净台内，这样可避免操作时因物品不全而往返拿取所造成的污染。同时，根据每个实验的要求，准备好瓶管支架、器械消毒盒等。实验器材准备数要大于实验使用数，瓶盖数要大于瓶数。这样才能有条不紊地做实验，也减少了忙乱操作所引起的污染。

#### (二) 无菌室和操作野消毒

无菌室内每周用乳酸蒸气（或过氧乙酸）加紫外线消毒1~2次。实验前，将实验器材放入超净台内，打开超净台紫外线灯，同时启动超净台风机，40 min后消毒完毕，关闭紫外线灯。这样，超净台内空气被净化，超净台面构成相对无菌的环境。

#### (三) 无菌操作要求

- (1) 手指不能触及器材使用端。如触及，器材需更换或烧灼后再使用（如瓶口）。
- (2) 减少手与器材的接触面，学会手指操作。
- (3) 一切操作，如打开或封闭瓶口，安装吸管、注射器等，都要在火焰前方进行。瓶口、吸管、注射器使用前要经过火焰消毒后使用。
- (4) 瓶口顺风斜放在支架上。试剂用后立即封闭瓶口。瓶口长时间敞开会增加落菌的机会。
- (5) 不同的细胞同时操作时，要专管专用，并要勤换吸管，防止扩大污染和交叉污染。
- (6) 瓶口液滴不能倒回瓶内。液滴用干酒精棉球擦拭，瓶口再经火焰消毒。
- (7) 操作者动作要准确敏捷，尽量避免空气流动。

#### (四) 实验中的操作要求

洗手、着装与外科临床要求相同。双手用肥皂洗净后，浸泡于消毒液中，并用75%的酒精擦拭。细胞培养用液从冰箱取出，试剂瓶口和外壁经酒精纱布擦洗后入超净台。超净台面要用酒精纱布擦拭。超净台上的物品布局合理，污物废液缸、酒精棉球缸在右侧位，酒精灯在中央位，试剂瓶在左侧位。拆除大包装，点燃酒精灯（95%酒精）。火焰无色或微黄色表示酒精杂质少，酒精燃烧完全（不能使用废酒精或工业酒精，这类酒精燃烧时产生的化学物质易附着到吸管或其他瓶、皿上，带入培养液中会伤害细胞）。浸泡75%酒精中的金属器械用台面消毒镊子取出，经无菌干纱布擦拭后，迅速从火焰上通过（器械不能在火焰中灼烧过长时间），冷却后使用，避免烫伤细胞。细胞培养液、牛血清、酶液的吸管，使用后不能再用火焰消毒，因为吸管中残留的培养液被烧焦碳化，再使用时，会把有害碳化物带入培养液中毒害细胞。操作中手指被污染时，可用酒精纱布或棉球擦拭。在实验过程中，不要面向操作台讲话或咳嗽，避免唾沫将微生物带入超净台内，污染空气。实验者离开超净台时，立即用肘关节关闭侧窗口，避免无菌室内细菌随空气流入净化操作区。

#### (五) 实验后要求

实验完毕，关闭超净台风机和电源，未使用过的器材放入饭盒内，用过的玻璃器材投入清水中浸泡，包装纸叠卷，绳成束分类归放。最后，超净台面用酒精纱布或棉球擦拭，紫外线消毒。

#### 注意事项

无菌操作离不开火和酒精，操作中避免事故发生。

- (1) 打火机点火。
- (2) 火柴点火时，火星熄灭后投入废缸内（缸内有废酒精棉球）。
- (3) 酒精溅出台面或瓶外壁时，立即擦干。

一旦发生着火事故，立即关闭超净台风机，用饭盒、湿布扑灭火焰。

## 第二章 细胞培养准备技术

### 第一节 实验器材的清洗、包装和消毒

#### 一、常用的实验器材

##### 1. 玻璃器材

培养细胞使用的玻璃器皿应是由透明度好、无毒的中性硬质玻璃制成。常用的有以下几种：①国产螺口培养瓶，用容积表示有 12.5, 25, 100 ml 等规格。②培养皿，直径有 3.5, 6, 9, 10 cm 等规格。③带螺口盖离心管，常用有 5, 10 ml。④注射器，有 1, 5, 20 ml 等规格。⑤用生理盐水瓶替代的贮液瓶，有 100, 250, 500 ml 等规格。⑥青霉素瓶 (5 ml)。⑦西力辛瓶 (10 ml)。其他还有尖吸管 (3 ml)、移液管、载玻片 (厚度 0.8, 1.2 mm)、盖玻片 (厚度 0.12 mm)、贮存尖吸管用的玻璃筒或金属筒、漏斗、烧杯、量筒、贮蒸馏水瓶、冷冻管 (1.2, 2 ml)、血球计数板等。

##### 2. 塑料品

多孔培养板有 4, 6, 12, 24, 96 孔等规格。培养皿直径有 3, 6, 10 cm 等规格。吸头有 10, 200, 1000, 5000  $\mu\text{l}$  等规格。带螺口盖离心管有 10, 15, 50 ml 等规格。培养瓶用底面积表示，有 25, 75, 150, 175  $\text{cm}^2$  等规格。塑料品经消毒灭菌密封包装，供一次性使用；重复使用需经特殊方法清洗消毒。优质塑料器材厚薄均匀，无毒性，有的表面经特殊处理，细胞易于贴附生长。目前，多数实验者使用 Corning 公司的产品，其次是 Falcon, Grenier 等公司的产品。目前国内的塑料培养瓶细胞生长差。

##### 3. 器械

解剖刀，虹膜剪 (直头、弯头)，中号圆头镊，止血钳等。

##### 4. 杂用品

金属饭盒、试管架、各种规格胶塞、记号笔、搪瓷盘、吸头 (吸取液体的胶帽)、酒精灯、酒精、碘酒棉球瓶、火柴、各种支架等。

### 5. 小磁棒（搅拌子）

细胞营养液溶解过程或原代组织细胞分离过程中都需用小磁棒。小磁棒价格贵，购买不便，清洗又易丢失。笔者所在实验室利用酒精灯和玻璃吸管制作小磁棒。方法是：在酒精灯火焰上方将吸管一端封闭，另一端加铁针后再封闭（见图2-1）。磁棒清洗泡酸后，若铁针生锈或磁棒内有水，表示制作不合格，应淘汰。

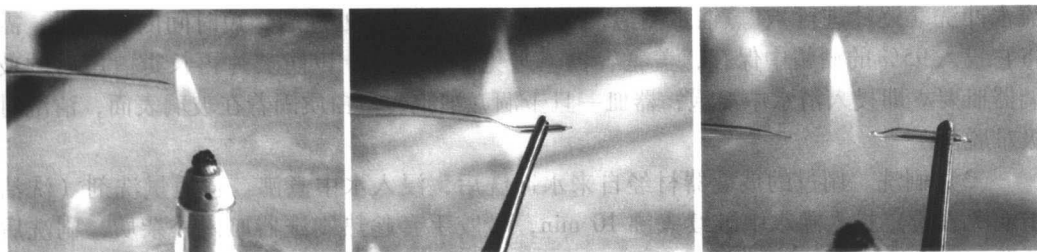


图2-1 小磁棒的制作

#### 注意事项

(1) 选用小容量贮液瓶。减少开瓶污染，又适合冰箱存放。实验中最适用的是100 ml 盐水瓶和青霉素瓶。

(2) 组织培养中使用最多的是吸管、培养瓶、培养皿及各种瓶塞。实验者手中应有三套器材：一套手中使用，一套刷洗处理，一套消毒备用。瓶塞数要大于瓶数，这样才能保证实验中的循环使用。

(3) 塑料离心管使用安全。玻璃离心管有时会发生离心碎裂，造成标本丢失或其他意外。

## 二、清洗

清洗的目的是清除杂质，不残留影响细胞生长的成分，如解体的微生物、细胞遗迹以及非营养的有害物质和化学药品。



## (一) 常用玻璃器皿的清洗

### 1. 清洗要领

(1) 浸泡。初次使用的玻璃器皿常呈现碱性，表面常附有干涸的灰尘和一些对细胞有毒性的物质，如铝和砷等。空气湿度高时，玻片表面又易长霉。使用前，新玻片浸泡在5%的稀盐酸中过夜，以中和玻片表面的碱性物质和去除霉斑；然后经简单刷洗、流水冲洗（逐片进行）、蒸馏水浸泡，干燥备用。新玻片处理后，短时间内不用时，需将它投入95%的酒精中保存，盖紧容器，避免酒精挥发，以防玻片再长霉。用后的玻璃器皿要立即投入清水中浸泡，器皿一旦干涸，细胞、蛋白质固着在玻璃表面，清洗时极难脱落。

(2) 刷洗。用过的玻璃器材经自来水冲洗后，浸入水中煮沸。将适量洗剂（洗洁精或洗衣粉）投入沸水中继续煮沸10 min，带胶手套趁热刷洗器皿内外杂质，刷洗后的器皿浸入清水中，最后逐个冲洗。

(3) 酸泡。刷洗的玻璃器材冲洗、干燥后，置清洁液中浸泡24 h，清洁液的强氧化作用清除刷洗后残留的极微量杂质。吸管用塑料绳捆扎后酸泡。瓶皿装入尼龙网袋时，注意瓶口勿向下。

清洗液的配制如下：

(1) 清洁液。表2-1所示是常用的三种强度的清洁液。新配制的清洁液为棕红色，遇有机溶剂和水分增多时变成绿色时，表明失效。先在塑料桶中用80℃热水搅拌溶解重铬酸钾，再将桶置流动自来水中，待重铬酸钾溶液冷却后，缓慢加入浓硫酸，边加边用玻棒搅动，使混合液温度不过快上升和不出现重铬酸钾结晶。

表 2-1 清洁液的配制

组 成 强 度	重铬酸钾 (g)	浓硫酸 (ml)	去离子水 (ml)
弱液	100	100	1000
次强液	120	200	1000
强液	63 ~ 100	1000	200

(2) 玻璃滤器洗液。取10 g 硝酸钠和28.6 ml 硫酸，放入盛有47 ml 蒸馏水的玻璃缸内混匀备用。