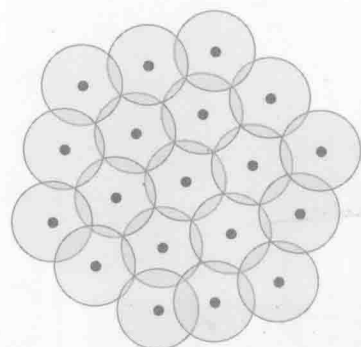
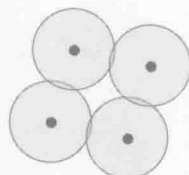
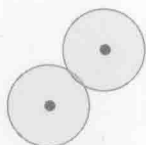
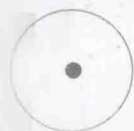


SHIYONG YIXUE XIBAO PEIYANG JISHU

实用医学 细胞培养技术

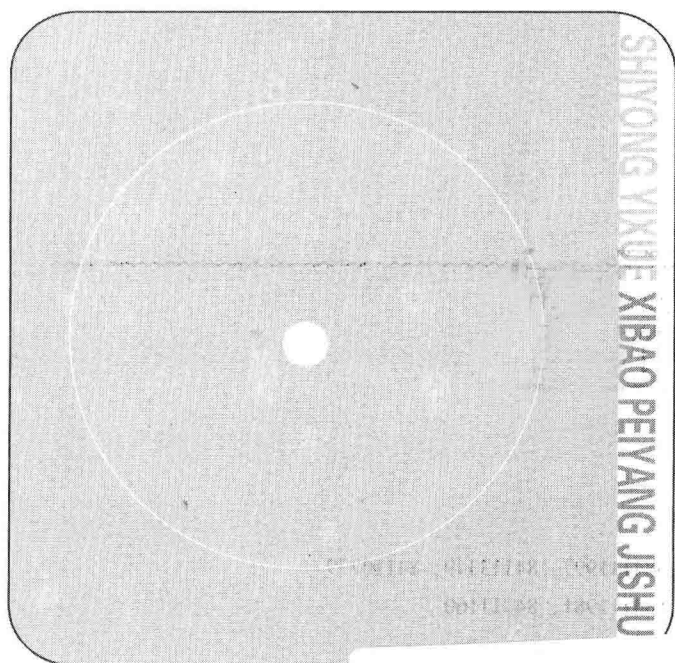
吴燕峰 主编
黎 阳



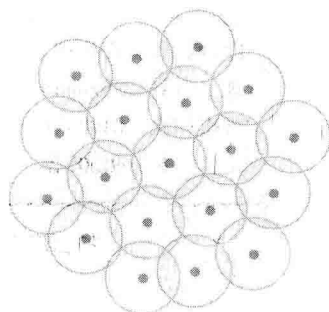
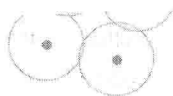
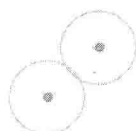
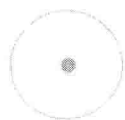
中山大学出版社

SHIYONG YIXUE XIBAO PEIYANG JISHU

实用医学 细胞培养技术



吴燕峰 主编
黎 阳



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

实用医学细胞培养技术/吴燕峰, 黎阳主编. —广州: 中山大学出版社, 2010. 1
ISBN 978 - 7 - 306 - 03580 - 6

I. 实… II. ①吴… ②黎… III. 人体细胞学—细胞培养 IV. R329. 2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 008572 号

出版人: 祁 军

策划编辑: 阮 继

责任编辑: 阮 继

封面设计: 林绵华

责任校对: 曾育林

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84111996, 84111997, 84113349, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 广州中大印刷有限公司

规 格: 787mm × 960mm 1/16 36.75 印张 800 千字

版次印次: 2010 年 1 月第 1 版 2010 年 1 月第 1 次印刷

定 价: 98.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

内 容 简 介

本书系统、全面地介绍了细胞培养的基础理论，较详细地叙述了动物细胞培养必需的用品器材、具体的操作步骤及注意事项等。主要内容包括：培养细胞的生存条件和环境、培养细胞的生物学特性、细胞培养实验室的布局、无菌技术、细胞分离技术、细胞培养观察和检测技术、细胞培养基本技术、细胞培养特殊技术、常用医用细胞培养技术、常用肿瘤细胞培养技术、细胞规模培养技术、细胞培养过程中的污染及处理、细胞培养的常见问题及对策等，共13章。

本书附有中外细胞库及其所提供的细胞目录、细胞培养常用培养用液配方等，使全书内容更为系统，便于读者查阅。

本书既适宜作为生物学、医学及其他相关专业的研究生教材，也可作为相关领域科研人员的参考书。

目 录

第一章 培养细胞的生存条件和环境	(1)
第一节 体外细胞生存的营养条件	(1)
一、水	(1)
二、无机盐类	(2)
三、糖类	(3)
四、维生素	(4)
五、氨基酸	(6)
六、温度	(7)
七、氧和酸碱度	(8)
八、细胞之间的相互联系	(10)
第二节 培养用液	(12)
一、水与缓冲液	(12)
二、生理盐水与平衡盐溶液	(15)
第三节 培养基	(16)
一、发展史	(16)
二、物理化学特征	(18)
三、完全培养基	(20)
四、血清培养基和血清的选择	(21)
五、其他添加物	(27)
第四节 无血清培养基	(31)
一、使用含血清培养基的缺点	(31)
二、无血清培养基的优缺点	(32)
三、无血清培养基的血清替代	(35)
四、无血清培养基的选择与制备	(38)
第五节 体外细胞的生长环境	(41)
一、体外培养实验室	(41)
二、体外培养的设备与器具	(45)
第二章 培养细胞的生物学特性	(51)
第一节 细胞黏附	(51)
一、吸附和接触	(51)
二、贴壁	(51)

三、铺展	(52)
第二节 细胞增殖	(52)
一、细胞周期	(52)
二、细胞增殖和培养细胞的生命分期	(55)
第三节 细胞分化	(58)
一、细胞分化潜能的变化	(58)
二、体外培养细胞分化状态的维持	(58)
第四节 细胞去分化	(59)
第五节 能量代谢	(59)
第六节 细胞系的演化	(60)
第七节 连续细胞系的形成	(61)
第八节 体外培养细胞的生长类型	(62)
一、黏附型细胞	(62)
二、悬浮型细胞	(64)
第三章 细胞培养实验室的布局	(66)
第一节 实验室规划及使用布局	(66)
一、总体原则	(66)
二、细胞培养实验室的组成与布局	(66)
第二节 无菌操作设施和工作间	(68)
一、常用的无菌操作设施	(68)
二、细胞培养工作间	(68)
第三节 实验室设备	(69)
第四节 器械及消耗性物品	(72)
一、手术器械	(72)
二、消耗性物品	(73)
第四章 无菌技术	(77)
第一节 概述	(77)
一、目标	(77)
二、灭菌操作	(77)
三、层流标准	(78)
四、方法	(79)
五、仪器和设备	(82)
第二节 准备与灭菌	(82)
一、设备、试剂和培养基	(83)

二、培养基的质控、检测和储存	(90)
第三节 清洗和消毒	(92)
一、培养用具的清洗	(92)
二、培养用品的消毒和灭菌	(93)
第五章 细胞分离技术	(102)
第一节 利用细胞体积和密度差异进行细胞分离纯化	(102)
一、一步密度梯度离心法	(102)
二、等密度梯度离心法	(105)
第二节 根据细胞表面电荷的细胞分离纯化	(110)
一、自由流动电泳分离技术	(110)
二、密度梯度电泳分离技术	(111)
第三节 利用细胞表面标志进行细胞分离纯化	(111)
一、免疫溶解法	(111)
二、盘化法	(113)
三、凝集素凝集法	(115)
四、玫瑰花环分离法	(117)
五、流式细胞分选术	(120)
六、免疫磁珠分离技术	(124)
第四节 利用其他细胞学特性分离纯化细胞的方法	(125)
一、反复植块法	(125)
二、有丝分裂抑制剂处理	(125)
第六章 细胞培养观察和检测技术	(128)
第一节 显微镜技术	(128)
一、普通显微镜的构造及使用方法	(128)
二、相差显微镜的构造及使用方法	(130)
三、荧光显微镜的构造及使用方法	(132)
四、激光共聚焦显微镜的原理、构造及应用	(134)
五、透射电子显微镜与超薄切片技术	(137)
六、扫描电子显微镜与样品制备	(139)
七、显微摄影技术	(140)
八、活细胞的动态观察与缩时电影	(141)
第二节 细胞及细胞成分染色及显示	(142)
一、苏木素伊红 (Hematoxylin and Eosin, HE) 染色法	(142)
二、吉姆萨 (Giemsa) 染色法	(143)

三、载玻片处理方法	(143)
四、活细胞体外活体染色观察与活体染料	(143)
五、细胞中糖类和脂类的显示	(144)
六、细胞中过氧化物酶的显示	(146)
七、细胞中一氧化氮合酶的显示	(146)
八、细胞中琥珀酸脱氢酶的显示	(147)
九、细胞中酸性磷酸酶的显示	(147)
十、细胞中碱性蛋白的显示	(148)
十一、细胞中线粒体的活体染色	(149)
十二、微丝的染色及形态观察	(149)
十三、胞质微管的间接免疫荧光显示技术	(150)
十四、细胞中 DNA 与 RNA 的吖啶橙荧光染色法	(151)
十五、细胞中 DNA 的富尔根 (Feulgen) 染色法	(151)
第七章 细胞培养基本技术	(154)
第一节 细胞传代和换液	(154)
一、原代培养	(154)
二、继代培养	(157)
三、细胞换液	(158)
第二节 细胞培养的基本方法和技术	(159)
一、悬滴培养法	(159)
二、盖玻片培养法	(159)
三、培养瓶培养法	(160)
四、培养板培养法	(160)
五、旋转管培养法	(161)
六、灌注小室培养法	(162)
七、二倍体细胞培养法	(165)
八、克隆培养法	(165)
九、中空纤维细胞培养技术	(166)
十、微载体细胞培养法	(168)
十一、微囊培养技术	(169)
第三节 细胞活性及计数	(170)
一、活细胞的染料排除检测法	(170)
二、细胞增殖活性测定的 ³ H-TdR 掺入法	(171)
三、细胞活力测定的 MTT 比色法	(171)
四、细胞生长曲线	(172)

五、细胞计数法	(173)
第四节 细胞的冻存和复苏	(176)
一、冷冻保存的必要性	(176)
二、培养物的冷冻保存与复苏原理	(176)
三、冷冻及复苏方法	(178)
第八章 细胞培养特殊技术	(182)
第一节 细胞克隆	(182)
一、克隆培养技术	(182)
二、影响克隆形成率的因素	(186)
三、克隆的分离	(188)
第二节 定量细胞计数	(189)
一、细胞重量	(189)
二、DNA 含量	(190)
三、蛋白质含量	(190)
四、细胞计数术	(191)
五、重复取样问题	(191)
第三节 细胞周期与细胞同步化	(191)
一、细胞周期	(192)
二、细胞周期分析	(194)
三、细胞同步化	(198)
第四节 细胞融合	(201)
一、细胞融合的基本技术	(201)
二、融合细胞的筛选	(206)
三、融合细胞的克隆化	(207)
四、细胞融合的杂交瘤	(208)
第五节 细胞凋亡的测定	(209)
一、凋亡细胞普通光镜下形态观察	(209)
二、凋亡细胞荧光显微镜下形态观察	(209)
三、凋亡细胞电镜下形态观察	(209)
四、凋亡细胞琼脂糖凝胶电泳检测——DNA 梯状条带 (DNA Ladder)	(210)
五、凋亡细胞的原位末端标记法检测	(210)
六、凋亡细胞的流式细胞法检测	(210)
七、磷脂酰丝氨酸外化的流式细胞术分析	(211)

第六节 细胞遗传学性状检测	(211)
一、性染色质检测	(211)
二、培养细胞染色体显示法	(212)
三、染色体结构显示和检测	(213)
四、染色体基因定位	(215)
五、染色体显微切割法	(217)
第七节 杂交瘤技术与单克隆抗体制备技术	(218)
一、杂交瘤技术	(218)
二、单克隆抗体	(222)
第八节 基因转染技术与体外细胞转化	(226)
一、基因转染技术	(227)
二、体外细胞转化	(232)
第九章 常用医用细胞培养	(236)
第一节 呼吸系统上皮细胞培养	(236)
一、人支气管上皮细胞培养	(236)
二、兔呼吸道纤毛上皮细胞培养	(238)
三、小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞培养	(240)
四、人鼻咽上皮细胞培养	(242)
第二节 消化系统上皮细胞培养	(244)
一、人食管黏膜上皮细胞培养	(244)
二、人胃黏膜上皮细胞培养	(246)
三、小肠黏膜上皮细胞 (IEC) 培养	(248)
四、大鼠胰腺导管上皮细胞培养	(251)
第三节 腺上皮细胞培养	(254)
一、人涎腺上皮细胞培养	(254)
二、牛乳腺上皮细胞培养	(258)
第四节 表皮细胞培养	(261)
一、人皮肤角质形成细胞的无血清培养	(261)
二、人表皮黑色素细胞培养	(262)
第五节 血管内皮细胞培养	(264)
一、人脐静脉血管内皮细胞培养	(264)
二、人肾小球微血管内皮细胞体外培养	(266)
三、猪血管内皮细胞体外培养	(268)
四、人眼脉络膜血管内皮细胞体外培养	(270)
五、大鼠脑微血管内皮细胞培养	(272)

第六节 胸腺上皮细胞培养	(279)
第七节 结缔组织细胞培养	(283)
一、结缔组织细胞生物学特点	(283)
二、结缔组织细胞分离方法	(287)
三、成纤维细胞培养	(288)
四、巨噬细胞培养	(302)
五、脂肪细胞培养	(307)
六、肥大细胞培养	(311)
七、间充质干细胞培养	(316)
第八节 肌肉组织细胞培养	(321)
一、心肌细胞培养	(321)
二、平滑肌细胞培养	(340)
三、骨骼肌细胞培养	(348)
第九节 眼组织细胞培养	(359)
一、角膜上皮细胞和内皮细胞培养	(359)
二、小梁细胞培养	(363)
三、视网膜色素上皮细胞培养	(366)
四、晶状体上皮细胞培养	(370)
五、视网膜米勒细胞培养	(372)
第十节 骨与软骨组织细胞培养	(378)
一、成骨细胞培养	(378)
二、破骨细胞培养	(384)
三、滑膜细胞培养	(386)
四、软骨细胞培养	(388)
第十一节 泌尿、生殖系统细胞培养	(391)
一、肾小球系膜细胞培养	(391)
二、肾小管上皮细胞培养	(394)
三、睾丸支持细胞培养	(396)
四、睾丸间质细胞培养	(397)
五、生精细胞培养	(399)
第十二节 内分泌细胞培养	(400)
一、胰岛细胞培养	(400)
二、人垂体腺细胞培养	(401)
三、甲状腺细胞培养	(402)
第十三节 羊水细胞培养	(403)
一、羊水细胞培养的基本方法	(403)

二、羊水细胞的富集培养法	(404)
第十四节 神经组织细胞培养	(406)
一、神经元培养	(406)
二、星形胶质细胞培养	(412)
三、少突胶质细胞培养	(413)
四、施旺细胞培养	(415)
五、小胶质细胞培养	(416)
六、其他神经胶质细胞的培养——嗅鞘细胞体外培养	(419)
七、体外培养神经组织分离细胞的形态学特征比较	(422)
第十五节 造血祖细胞培养	(426)
一、造血祖细胞培养的实验材料	(426)
二、造血祖细胞的富集与分离	(431)
三、造血祖细胞的培养技术	(435)
第十六节 淋巴细胞培养	(438)
一、各类淋巴细胞的主要特征	(439)
二、淋巴细胞的体外培养方法和应用	(446)
三、淋巴细胞的体外长期培养	(454)
第十七节 胚胎干细胞培养	(457)
一、体外培养胚胎干细胞的技术原理	(458)
二、体外培养胚胎干细胞的基本过程	(458)
三、胚胎干细胞的鉴定	(466)
第十章 常用肿瘤细胞培养	(476)
第一节 肿瘤细胞在体内外生长特性概论	(476)
一、肿瘤细胞体内生长的特征	(476)
二、肿瘤细胞体外生长的生物学特性	(478)
三、肿瘤细胞在体内和体外的生长特性差别	(479)
第二节 肿瘤组织细胞培养方法	(480)
一、肿瘤组织细胞的原代培养	(480)
二、肿瘤细胞的传代	(483)
三、肿瘤细胞的克隆培养法	(485)
第三节 部分肿瘤细胞系的建立和体外培养	(486)
一、人鼻咽癌细胞系 (CNE2) 的建立和体外培养	(486)
二、人骨肉瘤细胞系 (HOS-8603) 的建立和体外培养	(487)
三、人胃癌细胞系的建立和体外培养	(488)
四、人卵巢癌细胞系的建立和体外培养	(490)

五、人白血病/淋巴瘤细胞系的建立和体外培养	(491)
六、人脑肿瘤细胞系的建立和体外培养	(493)
七、人神经母细胞瘤细胞系的建立和体外培养	(495)
八、人肝癌细胞系的建立和体外培养	(497)
九、人乳腺癌细胞系的建立和体外培养	(498)
十、人肺腺癌细胞系的建立和体外培养	(500)
第四节 肿瘤细胞培养的应用	(502)
一、肿瘤细胞对组织浸润的体外研究	(502)
二、人恶性肿瘤细胞的动物移植瘤研究	(504)
第十一章 细胞规模培养	(508)
第一节 单层规模培养	(508)
一、转管及转瓶培养	(508)
二、旋转圆柱管培养	(509)
第二节 悬浮规模培养	(509)
一、细胞对悬浮培养的适应	(509)
二、规模培养的方法	(510)
第三节 细胞规模培养中的问题、对策及展望	(511)
第十二章 细胞培养过程中的污染及处理	(513)
第一节 污染途径	(513)
第二节 污染对细胞的影响	(514)
第三节 微生物污染的判断	(517)
一、微生物污染的一般特征及判断	(517)
二、细菌的污染及其判断	(518)
三、真菌的污染及其判断	(518)
四、支原体的污染及其判断	(519)
五、病毒的污染及其判断	(523)
第四节 交叉污染	(524)
第五节 污染的预防	(525)
一、从空气方面来预防	(525)
二、从生物材料方面来预防	(525)
三、从试剂方面来预防	(525)
四、从仪器设备和装置方面来预防	(525)
五、从操作技术方面来预防	(526)

第六节 污染的处理	(526)
一、抗生素的应用	(527)
二、加温除菌法	(528)
三、动物体内接种	(528)
四、巨噬细胞吞噬法	(529)
五、其他方法	(529)
第十三章 细胞培养的常见问题及对策	(531)
第一节 细胞生长缓慢	(531)
一、培养液	(531)
二、消化液	(532)
三、传代	(532)
四、污染	(532)
第二节 某些不稳定的试剂配制	(532)
一、谷氨酰胺	(532)
二、胰蛋白酶	(532)
三、血清	(533)
四、培养基中的其他成分	(533)
第三节 培养基各种成分的纯度	(533)
一、纯水器	(533)
二、塑料制品	(533)
三、玻璃器皿	(534)
四、血清	(534)
五、碳酸氢钠	(534)
第四节 化学污染	(534)
一、对于来自玻璃器皿的化学污染的对策	(534)
二、对于来自吸液管的化学污染的对策	(534)
三、对于来自试剂的化学污染的对策	(535)
四、对于来自粉末或气溶胶的化学污染的对策	(535)
第五节 其他	(535)
一、冻存细胞成颗粒性	(535)
二、成活率	(535)
附录	(537)
附录1 中外细胞库及其所提供的细胞目录	(537)
一、中国典型培养物保藏中心细胞库及其可提供的细胞目录	(537)

二、中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库可供的细胞目录	(542)
三、美国典型物保藏中心细胞库及其可提供的细胞目录	(553)
附录2 细胞培养常用培养液配方	(564)
一、缓冲液的配制	(564)
二、消化液的配制	(565)
三、抗生素液的配制	(566)
四、其他溶液的配制	(566)
五、细胞培养常用培养液的配制	(567)
附录3 两种常用的公式	(569)
一、细胞计数公式	(569)
二、离心力的计算	(570)

的4.5%，是原生质结构的一部分。

二、无机盐类

无机盐是细胞内和细胞外的重要成分，并且是维持细胞生存环境的重要物质。各种化学元素在细胞内的作用分为四大类：①大分子的结构成分，参与细胞生命活动：主要是C、H、N、O、S、P等；②维持膜电势、渗透压、pH平衡：主要是 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 HCO_3^- 、 HPO_4^- 、 SO_4^{2-} 等；③各种酶反应所需的离子和辅因子：主要是 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} ；④某些特殊细胞需要的特殊微量元素，如碘、溴、铯等。

(一) Na^+

Na^+ 在体内主要维持水、渗透压及pH的平衡。 Na^+ 是细胞外液中最主要的阳离子，在细胞外液中的 Na^+ 浓度约为140mmol/L，是维持细胞外液晶体渗透压的主要离子之一。 Na^+ 参与生物电活动。在可兴奋细胞中， Na^+ 由细胞外向细胞内的流动使细胞膜去极化，是细胞形成动作电位的主要离子基础之一。 Na^+ 在细胞外液中可以降低外质的黏度，促进外质的溶胶化；而在细胞内液中可以增加内质的黏度，能使球蛋白保持溶液状态。 Na^+ 也参与细胞内外的物质转运， Na^+ 在细胞内外的浓度差是葡萄糖协同转运至细胞内的基础。

(二) K^+

K^+ 是细胞内液中最主要的阳离子。 K^+ 在细胞内液中的浓度约为150mmol/L，在细胞外液中浓度约为5mmol/L， K^+ 在细胞膜内外两侧的浓度差和电位差是可兴奋细胞形成静息电位的基础。细胞内某些酶的激活需要 K^+ 的存在。

(三) Cl^-

Cl^- 的主要作用是维持水的平衡、保持渗透压和酸碱平衡。细胞外 Cl^- 的浓度约为120mmol/L，而细胞内只有约4mmol/L，它与 Na^+ 共同维持细胞外液晶体渗透压。 Cl^- 也参与生物电活动，也可兴奋细胞，参与形成抑制性突触后电位。

(四) HCO_3^-

HCO_3^- 是基质所需要的阴离子，碳酸氢盐缓冲系统是体内最重要的缓冲体系。 HCO_3^- 同时也是形成大分子的养分前体，具有营养作用。

(五) P

磷参与构成细胞内核酸、蛋白质及磷脂等重要大分子化合物。它参与细胞活动中一切基本物质如蛋白质、糖类、脂肪、维生素的代谢。细胞生化反应中的许多正

常中间产物都是磷的简单化合物。ATP、ADP 及磷酸肌酸中的高能磷酸键是细胞生命所需能量的直接来源。磷酸盐是细胞和细胞间液的组成成分，参与渗透压及酸碱平衡的调节。蛋白质磷酸化是细胞通讯信号转导中不可缺少的环节。

(六) Ca^{2+}

细胞内 Ca^{2+} 的含量不高，不到人体总含量的 0.1%，但却具有复杂而重要的生理作用。 Ca^{2+} 可维持细胞膜的稳定和渗透性，调节神经细胞及肌肉细胞的兴奋性。 Ca^{2+} 对于组织内部细胞之间相互黏着起着十分重要的作用。体外培养无血清存在时，高浓度的钙离子可帮助细胞贴壁，如 pH 7.6~7.8 时钙离子保护带电荷群，使细胞稳固地贴壁；反之，体外培养时若要将组织分散成单细胞悬液，可以通过螯合细胞间 Ca^{2+} 以使之脱离细胞间质结构，从而达到分散细胞的目的。 Ca^{2+} 也参与细胞生化反应，ATP 酶、胆碱酯酶、琥珀酸脱氢酶等重要酶类都必须有钙的存在才有活性。在细胞通讯中， Ca^{2+} 自身就是一种第二信使，参与跨膜信号转导。它与胞浆中钙调节蛋白结合，可调节许多重要的细胞生命活动。培养基中的 Ca^{2+} 浓度将影响细胞能否增殖或分化。

(七) Mg^{2+}

Mg^{2+} 是细胞能量代谢中的重要离子，它参与 ATP 酶的催化反应，因而 Mg^{2+} 是蛋白质、核苷酸、脂类及糖类合成以及肌肉收缩中不可缺少的离子成分。 Mg^{2+} 也是其他多种酶的辅因子。细胞外基质中的 Mg^{2+} 有助于细胞黏附，所以体外培养时， Mg^{2+} 对细胞的贴壁也有重要作用。体外分散细胞时，除了要降低细胞 Ca^{2+} 浓度之外，还需要降低 Mg^{2+} 的浓度。所以，用于消化组织解离细胞的消化液都是以无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的溶液配制的。

(八) 微量元素

细胞的正常生理功能也需要微量元素来维持。细胞培养时所需的微量元素很多，铁、锌、锰、铜、硒等微量元素已肯定为细胞所需。铁是血红蛋白、细胞色素系统、呼吸链的主要复合物；锌除了与体内 80 种酶活性有关外，还参与形成在转录调控中的起重要作用的“锌指结构”；碘参与甲状腺素的组成；钴参与合成维生素 B_{12} ；铜、锰、硒等都是体内多种酶的组成成分或活性剂。各种细胞对微量元素的需要量不同，低浓度或适量对细胞的生存与增殖有一定的作用，浓度过高对细胞有毒性。

三、糖类

糖是细胞的必需营养物，包括单糖、二糖、低聚糖（2~6 个糖）和多糖（几百至几千个单糖组成），其中多糖属于生物大分子。细胞能够利用的糖主要是六碳