

分子克隆

实验指南系列

动物细胞培养

——基本技术指南

Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique

[英] R. I. 弗雷谢尼 著 章静波 徐存拴 等 译

(第四版)



科学出版社

www.sciencep.com

分子克隆

实验指南系列

动物细胞培养

——基本技术指南

(第四版)

[英] R. I. 弗雷谢尼 著

章静波 徐存拴 等 译

科学出版社

图字 01-2002-5330

内 容 简 介

组织培养的优越性在于能极好地控制理化环境和生理学条件,这在器官培养和细胞培养中都可体现出来。本书是一本基础技术手册,阐述了有关动物细胞培养方面的基本原理和技术,是迄今为止最全面最权威的一部实验指导书。内容包括培养基、特殊技术、生物技术、DNA转移、肿瘤培养等内容,还有无血清培养基、规模培养、生物发酵器、分子技术、永生性和困难的克服等目前研究所需的信息。本书还客观地指出组织培养的优越性和局限性,以及不同类型组织培养的各自特性。

本书可供生物学、医学等相关动物细胞培养实验人员参考。

Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique (4th ed)

Copyright © 2000 by Wiley-Liss, Inc. All Rights Reserved.

Authorized translation from the English language edition published by John Wiley & Sons, Inc.

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞培养——基本技术指南:第四版/[英] R. I. 弗雷谢尼著;章静波,徐存拴等译. —北京:科学出版社,2004

(分子克隆实验指南系列)

ISBN 7-03-013522-9

I. 动… II. ①弗… ②章… ③徐… III. 动物-细胞培养-生物技术-指南 IV. Q954.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 062534 号

责任编辑: 庞在堂 彭克里 孙晓洁/责任校对: 朱光光

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

涿州印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年9月第一版 开本: 787×1092 1/16

2004年9月第一次印刷 印张: 45 1/2 插页: 6

印数: 1—2 500 字数: 1 060 000

定价: 88.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

谨以此书献给已故的 John Paul, 是他娴熟的指导和这本多年来始终是本领域的优秀参考书——《细胞和组织培养》最早将我引入组织培养这一奇妙的世界。

参译人员 (以章节排序)

章静波	中国医学科学院基础医学研究所
徐存拴	河南师范大学生命科学院
陈实平	中国医学科学院基础医学研究所
关纪奎	中国医学科学院基础医学研究所
蒋毅	中国医学科学院基础医学研究所
曲彦明	中国医学科学院基础医学研究所
王冬	中国医学科学院基础医学研究所
刘玉琴	中国医学科学院基础医学研究所
苏广彦	中国医学科学院基础医学研究所
刘险峰	中国医学科学院基础医学研究所
任乐荣	中国医学科学院基础医学研究所
孔令华	中国医学科学院基础医学研究所
王惠	中国医学科学院基础医学研究所
叶惟三	中国医学科学院基础医学研究所
狄凯军	香港大学医学院
李志琴	中国医学科学院基础医学研究所
王海杰	复旦大学上海医学院
谭玉珍	复旦大学上海医学院
安威	首都医科大学基础医学院
吕璟	首都医科大学基础医学院
陈莉	首都医科大学基础医学院
闫慧	中国医学科学院基础医学研究所

审校

章静波 徐存拴

前 言

在准备第四版的《动物细胞培养》时，我保留了前几版的重点内容，以较特殊的培养和方法作为实例重点介绍某些基本技术，并且均以详尽的、一步一步的实验程序来描述，因此所提供信息足可按步骤进行而毋须追索原始文献。此外，本书还包含有一些启示性的内容来解释某一方法的背景以及有关可替换操作步骤和应用资料。虽然本书提供了某些基本的生物学知识，但我们认定读者已具有起码的解剖学、组织学、生物化学以及细胞和分子生物学的知识。本书的对象是那些以往没有有关组织培养经验的人们，其中包括正在接受培训的技术员、高年级的大学生、研究生、博士后以及对实验室科学颇感兴趣的临床医生。

自第三版起，某些章节已被重新编排，如有关培养器皿、无血清培养基、分子技术以及规模培养等都已作了修改，并成为新的独立章节，此外还加入新的章节来论述如何克服细胞培养中所遇到的难题。只要与细胞培养直接相关的分子技术都应有尽有。本书未打算叙述基本的分子生物学方法，因为这已另有他著 [Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1996] 在先。同样地，规模培养一章只作为与生物技术学 (biotechnology) 接轨之用，仅仅提供有关增加细胞产量系统的某些背景知识，并非提供全部的生物药理学的生产过程。

本书部分图片采用彩版，精选出来只是作为正文的补充而非取代那些照片。除非在图注中予以说明，大多数均是物镜放大 10 倍的细胞显微图像。我并未注明放大倍数，因为我觉得让读者能够将这些照片与他们自己所熟悉的显微镜影像相比较显得更重要，这就需要了解所使用的物镜，而非总体的放大倍数。如果没有一个显微镜载片测微尺，要将放大倍数与标本相联系起来那是很困难的。

我还增加了详尽的可相互参照的参考文献以便于读者找到书本中所需要的节段，对所有的实验方案也作了排序，使之更加一目了然。某些叙述性的内容被插入到实验方案之中，此外还增加了一些新的实验方案。某些是应邀作者所写，还有一些则摘录自《特殊细胞培养》系列丛书 (Wiley-Liss 公司)。面对愈来愈多的参考文献，我用较新的文献来替代某些仅用作实例的较早文献，同时也保留了某些建立特殊技术的原创性早期文献。在参考文献之后我们还列出了某些读本和常用的杂志。科学社团、细胞库和数据库也一并列于商业索引中的供应商和其他来源等栏目。

本书还列出了所应用的缩写词，遍及全书的惯用词有 PBSA，指的是无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Dulbecco's PBS；UPW 是指不限用什么方法制备的超纯水；可能只有极少数人会自己去配培养液，但是却很有可能去比较组成的成分，此时摩尔当量则更为实用。所以在溶液表格中我们未列入真正的重量，而尽可能地用体积摩尔浓度。我感激 Life Technologies 和 Sigma Aldrich 公司提供不同类型培养基使用情况的信息，也感激欧洲细胞培养收集中心 (ECACC) 提供最常用细胞系的信息。我们已将最常用的培养基和细胞系列于适当的表格之中。

操作实验方案均用统一格式在方案左侧加竖线标明，对某一特殊实验方案的专用试剂则详细列于实验方案中的材料条目之中。常用试剂的配方，诸如 Hanks' BSS 或胰蛋白酶则置于书后试剂附录，读者还能在商业索引中发现详细的设备和材料的货源供应。

一如既往，我万分感谢提供操作实验方案的作者们，也感激对我的某些不完全了解的领域中提出建设性意见的同行，他们是 Robert Auerback、Bob Brown、Kenneth Calman、Richard Ham、Rob Hay、Stan Kays、Nicol Keith、Wally McKeehan、Rona McKie、Stephen Merry、Jane Plumb、Peter Vaughan、Paul Workman 以及已故的 John Paul。我还有幸与 David I. Graham、David G. T. Thomas 以及已故的 John Maxwell Anderson 进行临床协作。在本书的前期准备过程中，我还得益于与 Don Dougall、Peter del Vecchio、Sergey Federoff、Mike Gabridge、Dan Lundin、John Ryan、Jim Smith 以及 Charity Weymouth 等的讨论。我对 Paul Chapple 也感激不尽，是他最初劝说我应当写一本有关组织培养基本技术的教科书。最近他还提议本书须多渠道地传播，因此现在由 Wiley-Liss 公司出版发行。书中许多原创性的插图由 Jane Gillies 和 Marina LaDuke 绘制。有些资料则由我多年的同事赠予，他（她）们是 Sheila Brown、Ian Cunningham、Lynn Evans、Margaret Frame、Elaine Hart、Carol McCormick、Alison Mackie、John McLean、Alistair McNab、Diana Morgan、Alison Murray、Irene Osprey 和 Natasha Yevdokimova。我衷心感谢 Fiona Conway、Margaret Jenkins 及 Joanne Thomsa 的文秘工作以及 Liz Gordon 的资料复核等事务。

我很幸运地得到 John Wiley 编辑部成员的建议和大力支持。我同样衷心感谢那些对前几版不嫌麻烦地给我或给 John Wiley 公司提出过建议或建设性批评的人们。听到有人说本书对他们有益我会很高兴，很满意，但更为重要的是能知道有人发现本书的缺陷，对此我将乐意予以纠正。我仅希望本书的使用者与我一样保持不变的激情，相信细胞培养领域将出现光辉的前景。

我十分感谢我的女儿 Gillian 和我的儿子 Norman，他们曾在多年前帮助我编写第一版并在以后不间断地给我建议和支持。我尤其要感谢我的夫人 Mary，她不遗余力地参与编撰、校对以及处理许多其他的事务。没有她的帮助和支持，第一版绝不可能问世，我也绝不可能如期完成本版的修订，更不能达到必需技术的精确程度，而这一点正是成就一部精品组织培养指南的要旨。

Ian Freshney
(章静波 译)

缩写词 (Abbreviations)

ATCC	American Type Culture Collection	美国模式培养物收集中心, 美国菌种保藏中心
bp	base pairs (in DNA)	碱基对
BPE	bovine pituitary extract	牛垂体提取物
BrUdR	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BUdR	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
CAM	chorioallantoic membrane	尿囊绒膜
CAM	cell adhesion molecule	细胞黏附分子
CCD	charge-coupled device	电耦联器
CCTV	closed-circuit television	封闭式电视
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CE	cloning efficiency	克隆效率
CMC	carboxymethylcellulose	羧甲基纤维素
CMF	calcium-and magnesium-free saline	无钙镁盐水
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories	Connaught 医学研究实验室
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium	Dulbecco 改良的 Eagle 培养基
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DT	population doubling time	群体倍增时间
EBSS	Earle's balanced salt solution	Earle 平衡盐溶液
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
ECACC	European Collection of Animal Cell	欧洲动物细胞收集中心 (现称欧洲细胞培养物收集中心)
ECGF	endothelial cell growth factor	内皮细胞生长因子
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EM	electron microscope	电子显微镜
FBS	fetal bovine serum	小牛血清
FCS	fetal calf serum	胎牛血清
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
G ₁	gap one (of the cell cycle)	间期 1 (细胞周期)
G ₂	gap two (of the cell cycle)	间期 2 (细胞周期)

GLP	good laboratory practice [Jacobs, 1979]	优良实验室操作规范 [Jacobs, 1979]
H&E	hemalum and eosin (stains)	苏木素明矾和伊红 (染色)
HAT	hypoxanthine, aminopterin, and thymidine	次黄嘌呤, 氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷
HBS	HEPES buffered saline	HEPES 缓冲盐水
HBSS	Hanks's balanced salt solution	汉克平衡盐溶液
HC	hydrocortisone	氢化可的松, 皮质醇
hCG	human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HGPRT	hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transferase	次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HITES	hydrocortisone, insulin, transferring, estradiol, and selenium	氢化可的松、胰岛素、运铁蛋白、雌二醇和硒
HPV	human papilloma virus	人乳头状瘤病毒
HuS	human serum	人血清
HS	horse serum	马血清
HSV	herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
HT	hypoxanthine/thymidine	次黄嘌呤/胸腺嘧啶脱氧核苷
ITS	Insulin, transferrin, selenium	胰岛素、运铁蛋白、硒
KBM	keratinocyte basal medium	角质形成细胞基础培养基
kbp	kilobase pairs (in DNA)	千碱基对
KGM	keratinocyte growth medium	角质形成细胞生长培养基
LI	labeling index	标记指数
M199	Medium 199	199 培养基
MACs	mammalian artificial chromosomes	哺乳动物人工染色体
MACS	magnet-activated cell sorting	磁激活细胞分类
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium	Eagle 极限必需培养基
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide	二甲基噻唑二苯基四唑溴盐
NBCS	newborn-calf serum	新生牛血清
NCI	National Cancer Institute	国家癌症研究所
O.D.	optical density	光密度
PA	plasminogen activator	纤溶酶原激活物
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
PBSA	phosphate-buffered saline, solution A (Ca ²⁺ , and Mg ²⁺ free)	磷酸缓冲液, 溶液 A (无 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)
PBSB	phosphate-buffered saline, solution B (Ca ²⁺ , and Mg ²⁺)	磷酸缓冲液, 溶液 B (有 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)

PCA	perchloric acid	过氯酸
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板衍生的生长因子
PE	plating efficiency	贴瓶率, 出菌率
PE	PBSA/EDTA	磷酸缓冲液, 溶液 A (乙二胺四乙酸)
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PHA	phytohemagglutinin	植物凝集素
PMA	phorbol myristate acetate	豆蔻酸佛波醇乙酸酯
PVP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PWM	pikeweed mitogen	棘藜促细胞分裂剂
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute	罗斯威尔派克纪念研究院
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR	反转录酶 PCR
S	DNA synthetic phase of cell cycle	细胞周期的 DNA 合成阶段
SD	saturation density	饱和密度
SIT	selenium, insulin, transferrin	硒、胰岛素、运铁蛋白
S-MEM	MEM with low Mg^{2+} and no Ca^{2+}	低 Mg^{2+} 无 Ca^{2+} 的 MEM
SSC	Sodium citrate/sodium chloride	柠檬酸钠/氯化钠
SV40	simian virus 40	猴病毒 40
SV40LT	SV40 gene for large T-antigen	大 T 抗原的 SV40 基因
TCA	trichloroacetic acid	三氯乙酸
T_D	population doubling time	群体倍增时间
TEB	Tris/EDTA buffer	Tris/EDTA 缓冲液
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TK	thymidine kinase	胸腺嘧啶脱氧核苷激酶
UPW	ultrapure water	超纯水
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
YACs	yeast artificial chromosomes	酵母人工染色体

目 录

前言		
第1章 绪论	1	
背景	1	
组织培养的优点	4	
环境的控制	4	
样品的特征和均一性	5	
经济、规模和机械化	5	
体内模型	5	
局限性	5	
专业技能	5	
量的问题	6	
去分化和选择	6	
细胞的起源	6	
不稳定性	6	
体外的主要差异	7	
组织培养的类型	7	
第2章 培养细胞的生物学	10	
培养细胞的环境	10	
细胞黏附	10	
细胞黏附分子	11	
细胞骨架	12	
细胞增殖	12	
细胞周期	12	
细胞增殖的控制	13	
细胞分化	14	
细胞分化的维持	14	
细胞去分化	14	
能量代谢	17	
培养的开始	18	
细胞系的演化	18	
细胞的衰老	19	
连续细胞系的形成	20	
培养细胞的起源	21	
第3章 设计与布局	23	
规划	23	
建设与使用	26	
布局	27	
无菌操作区	27	
培养箱	28	
温室	28	
操作台	32	
准备	32	
洗涮	32	
储存	33	
第4章 设备	36	
组织培养实验室的要求	36	
必需设备	37	
洁净台	37	
培养箱	38	
CO ₂ 培养箱	39	
除菌器	39	
冰箱和冷冻箱	41	
倒置显微镜	42	
清洗	42	
除菌和干燥	43	
水的纯化	43	
离心机	44	
冷藏器	44	
天平	45	
血细胞计数板	45	
辅助设备	45	
细胞计数器	45	
抽气泵	46	
pH计	47	
电导仪	47	
渗透压计	47	
普通显微镜	47	
解剖镜	47	
温度记录仪	47	
磁力搅拌器	48	
滚动架	48	
液体操作	48	

其他常用设备	53	充入 CO ₂ 气体	72
低温冷冻箱	53	训练	72
玻璃器皿清洗机	53	第 6 章 安全性	74
视频摄像机和显示器	54	危险性评估	74
集落计数器	55	标准操作程序	76
可控速率冷冻箱	55	安全规则	76
离心淘洗机	55	常规安全	77
流式细胞仪	55	操作者	77
消耗性物品	55	设备	77
吸管	56	玻璃器皿和锐利的物品	78
培养器皿	56	化学毒性	79
无菌容器	56	气体	79
注射器和针头	57	液氮	80
除菌过滤	57	火	80
第 5 章 无菌技术	58	放射性	81
无菌技术的目标	58	摄入	81
无菌的维持	58	标记的试剂	81
创造无菌环境的各种因素	59	高能源	81
安静的工作区域	59	生物危害性	81
工作面	59	防范水平	82
个人卫生	61	人的活检材料	84
试剂和培养基	61	遗传操作	85
培养物	61	废弃物处理	85
灭菌操作	62	第 7 章 培养器皿	86
擦拭	62	附着物	86
加盖	62	细胞的附着和生长	86
灼烧	62	附着材料	86
试剂瓶和培养瓶的操作	63	培养器皿的选择	87
移液	63	细胞产量	87
倒出液体	64	悬浮培养	89
层流	64	通风	90
标准方法	66	制样和分析	90
方案 5.1 在洁净台内进行无菌操作	66	不均匀生长	91
方案 5.2 在敞开的工作台上进行操作	68	价格	91
培养皿和多孔培养板	70	特殊系统	92
方案 5.3 培养皿和培养板的操作	70	透性支持物	92
仪器和设备	71	表面处理	93
培养箱	71	基质覆盖	93
盒装培养物	72	方案 7.1 细胞外基质(ECM)的制备	94
		饲养层	95
		三维基质	95

各种人工附着面	96	具有选择性	123
非黏附性附着面	96	调节细胞增殖、分化	123
液-胶或液-液界面	97	无血清培养液的缺点	123
第8章 培养基	98	血清的替代	123
培养基的发展史	98	传代培养	124
物理化学特征	98	激素	124
pH	98	生长因子	124
方案 8.1 pH 标准色阶的制备	99	血清中的营养物质	138
CO ₂ 和碳酸盐	99	蛋白质和多聚胺	138
缓冲作用	101	基质	138
氧气	101	无血清培养液的选择	138
渗透压	102	无血清培养液的商业供应	139
温度	102	血清替代物	139
黏滞度	103	无血清培养液的研发	142
表面张力和成泡性	103	无血清培养基的制备	142
平衡盐溶液	104	小结	142
完全培养基	104	第10章 准备与灭菌	144
氨基酸	105	设备	144
维生素	106	玻璃器皿	144
盐类	106	方案 10.1 玻璃器皿的准备和灭菌	147
葡萄糖	106	移液管	150
有机补充物	106	方案 10.2 移液管的准备和灭菌	150
激素和生长因子	112	螺口盖	151
抗生素	112	方案 10.3 螺口盖的准备和灭菌	153
血清	112	清洁剂的选择	154
蛋白质	113	种类繁杂的设备	154
生长因子	113	可重复使用的灭菌过滤器	155
激素	115	方案 10.4 过滤装置的灭菌	155
营养物及代谢物	115	试剂和培养基	156
脂类	115	水	157
矿物质	115	平衡盐溶液	158
抑制物	116	方案 10.5 BSS 的制备	159
培养基和血清的选择	116	培养基	159
批次预约	118	方案 10.6 用 1× 储存液制备培养基	160
血清的测试	118	方案 10.7 用 10× 浓缩液配制培养基	161
热灭活	119	干粉培养基	164
其他添加物	119	方案 10.8 以干粉配制培养基	164
胚胎浸出液	119	特制培养基	165
适应性培养基	120		
第9章 无血清培养液	121		
使用含血清的培养液的缺点	121		
无血清培养液的优点	122		

方案 10.9 特制培养基的准备	166	方案 11.8 用胶原酶消化	201
灭菌	168	机械消化	203
除菌过滤	168	方案 11.9 利用筛网的机械分离法	203
方案 10.10 用注射器式过滤器进行灭菌过滤	171	分离活细胞	205
方案 10.11 使用过滤瓶的灭菌过滤	171	方案 11.10 富集存活细胞	205
方案 10.12 使用小型直线式过滤器的灭菌过滤	172	原代培养小结	207
方案 10.13 使用大型直线式过滤器进行灭菌过滤	173	原始记录	207
血清	173	第 12 章 细胞系	208
方案 10.14 血清的收集与灭菌	174	命名	208
方案 10.15 血清的透析	176	传代培养和扩增	208
其他试剂的准备与灭菌	177	细胞系的永生化	212
培养基的质控、检测和储存	177	细胞系的命名	212
质量控制	177	细胞系的选择	213
无菌检测	177	常规培养	214
培养检测	178	细胞形态学	214
保存	179	培养基的更换	215
第 11 章 原代培养	180	体积、深度和表面积	215
原代培养的类型	180	方案 12.1 更换培养基	215
组织分离	180	维持培养基	216
小鼠胚胎细胞培养	182	传代	216
方案 11.1 分离小鼠胚胎	182	传代标准	217
鸡胚细胞培养	183	方案 12.2 传代	218
方案 11.2 分离鸡胚	183	传代比率和生长周期	220
人体活检材料	186	传代时的细胞浓度	222
方案 11.3 人体活检组织	188	悬浮培养细胞的增殖	222
原代培养	188	悬浮培养物的传代	224
原代外植	188	方案 12.3 悬浮细胞传代	224
方案 11.4 原代外植	189	抗生素的使用	225
酶的解离作用	191	培养记录	225
方案 11.5 胰酶的温消化	192	第 13 章 克隆培养及筛选	228
低温预处理的胰酶消化	195	克隆培养	228
方案 11.6 胰酶的冷消化	195	方案 13.1 稀释法克隆培养	229
鸡胚器官原基	196	贴瓶率的激活	231
方案 11.7 鸡胚器官原基	196	促进克隆生长的方法	232
其他酶解过程	200	条件培养基	233
胶原酶	201	方案 13.2 条件培养基的制备	233
		饲养层细胞	233
		方案 13.3 饲养层的准备	234
		悬浮克隆培养	235
		方案 13.4 琼脂中克隆培养	235

方案 13.5 美希素中克隆培养	238	形态学	271
克隆的分离	240	显微镜使用	273
方案 13.6 用克隆环分离细胞克隆	240	方案 15.1 倒置显微镜的使用	273
方案 13.7 辐射法分离细胞集落	242	染色	274
单层贴壁细胞克隆的其他分离技术	243	方案 15.2 GIEMSA 染色	274
悬浮细胞克隆	243	方案 15.3 结晶紫染色	275
方案 13.8 悬浮细胞克隆的分离	243	细胞学检查所用培养器皿	276
复制性培养	244	悬浮细胞细胞学检查标本的制备	277
选择性抑制剂	244	方案 15.4 涂片制备	277
遗传变异细胞的筛选	246	方案 15.5 细胞离心机	278
方案 13.9 甲氨蝶呤抗性和 DHFR		方案 15.6 过滤细胞学	279
扩增	246	照相技术	280
细胞与基质的相互作用	247	方案 15.7 利用胶片进行显微照相	280
选择性黏附	247	电子影像记录	282
选择性解离	248	方案 15.8 显微镜电子成像	282
基质的性质	248	染色体分析	283
选择性饲养层	251	方案 15.9 染色体制备	283
半固体培养基	251	染色体显带技术	285
第 14 章 细胞分离	253	染色体分析	286
细胞密度及等密度沉降法	253	变异	286
方案 14.1 密度梯度细胞分离法	253	染色体染色	288
基于抗体的分离技术	257	DNA 含量	288
免疫盘化法	257	DNA 杂交	288
免疫磁珠分离法	257	DNA 指纹技术	288
方案 14.2 磁性激活的细胞分选法		原理	289
(MACS)	260	方案 15.10 细胞系的多位点 DNA	
细胞体积与沉降速度	261	指纹检测	289
离心淘洗分离技术	261	RNA 和蛋白质	295
荧光激活的细胞分选法	262	酶活性	295
其他分离技术	265	同工酶	295
初试细胞分离者的选择	266	原理	296
第 15 章 细胞鉴定	268	方案 15.11 同工酶分析	296
鉴定的需要	268	分析	299
种属鉴定	269	多样性	299
谱系或组织标记	269	抗原标记	299
独特的标记	270	方案 15.12 间接免疫荧光	301
转化	271	其他方法	302
		分化	302
		证明	302
		第 16 章 分化	304
		表现型的体内表达	304

去分化	304	第 18 章 污染	334
定向和分化的各个阶段	305	污染源	334
增殖和分化	305	操作人员的技术	336
定向和细胞谱系	306	环境	337
分化标记物	307	使用和维护洁净台的层流	337
诱导分化	308	潮湿培养箱	337
可溶性诱导剂	308	方案 18.1 清洁培养箱	338
细胞的相互作用	311	冷冻储藏	338
旁分泌生长因子	311	无菌材料	338
负向作用的旁分泌因子	312	引入的细胞系和活检	339
细胞-基质相互作用	312	检疫	339
极性和细胞形状	313	微生物污染的种类	339
分化和恶性	314	污染的检测	339
应用方面	314	可见的微生物污染	340
第 17 章 转化	316	支原体	340
细胞系特性的作用	316	原则	342
什么是转化?	317	方案 18.2 荧光检测支原体	343
遗传不稳定性	318	343
染色体畸变	319	病毒污染	345
DNA 含量	319	污染的去除	345
永生性	319	细菌、真菌和酵母	345
衰老的控制	320	方案 18.3 消灭微生物的污染	345
病毒基因的永生性	320	345
人类成纤维细胞的永生性	321	支原体的消除	346
方案 17.1 成纤维细胞的永生性	321	病毒污染的消除	346
.....	321	持久的污染	346
转染后的培养物培养	324	交叉污染	347
端粒酶诱导的永生性	325	结论	348
转基因小鼠	325	第 19 章 冷冻保存	349
生长控制的异常	325	冷冻保存的必要性	349
停泊非依赖性	325	冷冻的理由	349
接触抑制	326	保存	349
方案 17.2 细胞增殖的密度限制	328	细胞系的选择	349
.....	328	培养条件的标准化	350
血清依赖性	329	冷冻保存的阶段	350
肿瘤发生	330	方案 19.1 冷冻细胞	353
恶性肿瘤	330	冷冻率	357
致瘤作用	331	冷冻冰箱	357
侵袭性	331	冷冻柜记录	359
血管形成	332	方案 19.2 融化冷冻细胞	359
纤溶酶原激活剂	333	连续置换	361
		细胞库	361

运送细胞	361	方案 20.9 贴壁效率	383
冷冻安瓿	362	自动集落计数	384
活的培养	362	标记指数	385
第 20 章 定量	363	方案 20.10 ³ H-胸腺嘧啶脱氧核苷的 标记指数	385
细胞计数	363	生长分数	387
血细胞计数板	363	方案 20.11 生长分数的测定	387
方案 20.1 用血细胞计数板进行细胞 计数	363	有丝分裂指数	388
电子计数	366	分裂指数	388
方案 20.2 电子细胞计数	367	细胞周期时间	388
细胞大小测定	369	细胞迁移	388
单层培养的染色	369	第 21 章 细胞毒性	389
细胞重量	369	导言	389
DNA 含量	370	体外局限性	390
方案 20.3 用 Hoechst 33258 测定 DNA	370	分析的性质	390
蛋白质	370	生存力	391
样品的溶解性	371	方案 21.1 染料排斥法测定细胞生存 力	391
方案 20.4 用 Bradford 方法测定蛋白 含量	371	方案 21.2 染料摄取法测定细胞生存 力	392
合成率	372	存活	392
DNA 合成	372	方案 21.3 克隆形成试验	393
方案 20.5 DNA 合成	372	细胞增殖测定	397
蛋白质合成	373	代谢测定	397
方案 20.6 蛋白质合成	373	微滴定试验	398
酶检测和免疫检测标本的制备	374	方案 21.4 基于 MTT 的细胞素性试 验	398
细胞计数术	375	其他说明	401
原位标记	375	微滴定与克隆的比较	403
流式细胞术	375	药物的相互作用	403
重复取样问题	375	抗癌药物筛选	404
数据的获得	376	前瞻性试验	404
数据分析	376	转化	404
细胞增殖	376	背景	404
实验设计	377	方案 21.5 姐妹染色单体交换	405
生长周期	377	其他说明	408
方案 20.7 生长曲线, 单层	378	致癌性	408
悬浮培养	380	炎症反应	409
方案 20.8 生长曲线, 悬浮培养	380	第 22 章 特殊细胞的培养	410
生长周期分析	380	上皮细胞	410
生长周期的变化	382	表皮	411
贴壁效率	383		