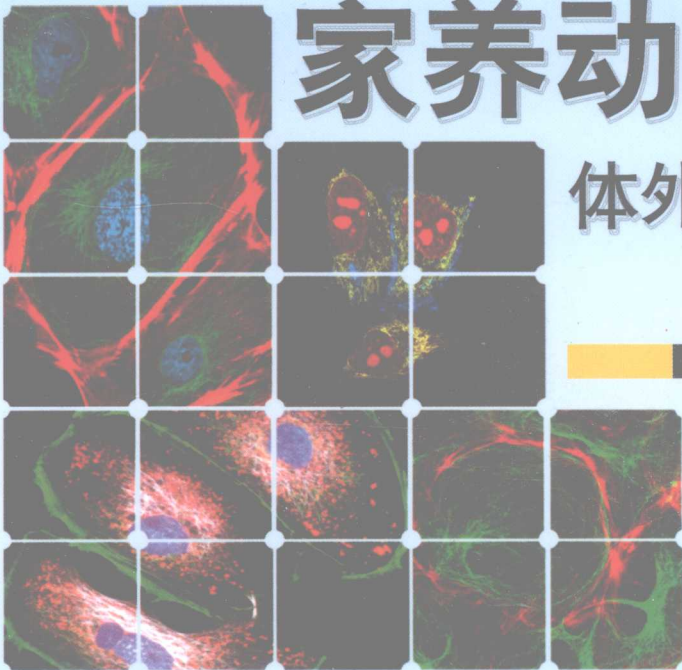




家养动物细胞

体外培养原理与技术

关伟军 马月辉 等 编著



科学出版社
www.sciencep.com

家养动物细胞体外 培养原理与技术

关伟军 马月辉 等 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

八年的潜心研究所获取的大量实验数据和家养动物细胞生物学研究所面临的严峻态势,坚定了作者的写作信心和决心,同时也激发了作者的写作灵感、意念和热情,怀着焦虑和迫切的心情,组织国内有关专家学者,从我国家养动物细胞体外培养理论、方法和技术现状及未来发展的迫切需要出发完成此书的撰写工作。全书160余万字,包括绪论、动物细胞体外培养的基本理论、动物细胞体外培养的设施和基本条件、动物细胞体外培养用液、培养器皿的清洗、消毒与灭菌、实验室安全问题、无菌技术、家养动物细胞体外培养的基本方法、家养动物组织细胞体外培养技术、干细胞的培养、肿瘤细胞的体外培养、细胞培养过程中污染的检测、消除和预防、家养动物体外培养细胞的生物学性状检测、家养动物细胞遗传学性状检测、细胞拆合与细胞重组、细胞融合与单克隆抗体、细胞克隆、基因细胞内导入技术、体外细胞的转化、细胞培养的应用研究、细胞周期与同步化和重要、濒危畜禽品种体细胞库构建及其生物学特性研究实例等二十二章内容。

本书内容丰富、深入浅出、图文并茂,充分体现了科学性、系统性、前瞻性和实用性有机结合的特点,适合于全国高等院校、科研院所和企业等从事动物种质资源保存、细胞工程、基因工程、遗传工程、胚胎工程、生物制药、干细胞、微生物学、免疫学和医学等研究的教师、科研人员、研究生和相关科研管理人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

家养动物细胞体外培养原理与技术/关伟军,马月辉等编著. —北京:科学出版社, 2008

ISBN 978-7-03-018313-2

I. 家… II. ①关…②马… III. 动物-细胞培养-研究 IV. Q954.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 030143 号

责任编辑:夏 梁/责任校对:朱光光 李奕莹

责任印制:钱玉芬/封面设计:福瑞来书装

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>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年5月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008年5月第一次印刷 印张:74 3/4 插页:42

印数:1—2 000 字数:1 695 000

定价:198.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

主要编著人员

关伟军 马月辉 刘学东 李向臣 李林凤 陆涛峰 刘 鹏 刘长青
刘希斌 吴宏梅 陈莉娜 王 颖 刘凤菊 丛义梅 李 晗 包阿东
跃 华 娜日苏 刘 帅 何晓红 赵倩君 浦亚斌 于太永 丁 鸿

资 料 整 理

傅宝玲

序

动植物体外细胞培养技术经历了 100 多年发展历程,取得了令人瞩目的成就。在全球性抢夺生物种质资源和探索生命科学奥秘的特殊历史时期,作者从挽救我国濒临灭绝家养动物种质资源和生命科学研究的宗旨出发,通过 70 余种家养动物群体的体外细胞培养、生物学检测和应用研究,积累了丰富的实践经验,获得了大量的第一手实验数据,为《家养动物细胞体外培养原理与技术》一书的出版奠定了良好的理论和技术基础。

自 20 世纪 80 年代以来,细胞培养技术和细胞生物学研究已经进入了一个高速发展的崭新阶段,大量研究成果已经达到了难以让人用笔墨来加以描述的程度。正如 Wilson 早在 1925 年宣称:“解决生物学问题的关键最终将在细胞中找到”一样,细胞培养技术和细胞生物学在生命科学研究中扮演着非常重要的角色。21 世纪,离体细胞培养技术已经达到了比较完善的境界,几乎地球上所有的生物细胞都可通过离体进行培养,培养细胞已成为生物学家借以研究生物相应器官、组织和细胞的正常与异常等生命活动的重要对象。特别值得一提的是,令世人瞩目的美国《科学》杂志于 1999 年末公布的年度世界十大科学进展中,“干细胞研究的新发现”荣登十大科学成果之首。2000 年再度被《科学》杂志入选世界十大科学进展。这是由于干细胞是具有自我更新、增殖和分化能力的细胞,不仅能产生表现型和基因型与自身完全相同的子细胞,而且还能分化为祖细胞,甚至具有再生成各种组织和器官的潜能。如组织、器官损伤和衰竭、心肌梗死、糖尿病、帕金森病等多种疾病都与细胞的死亡相关。如果科学家们能有效地分离干细胞并将其向特定的目标分化,就可以用健康组织替代病变组织,从而达到治疗疾病的目的。2007 年末“体细胞转化为类胚胎干细胞”这一重大科学成果分别被《自然》和《科学》杂志评为第一和第二大科学进展。这一新的突破证实了已分化成熟的体细胞同样可以重新编程而转化为类干细胞。但是,干细胞的体外培养技术亦是建立在动物细胞培养基本技术基础之上的,二者具有很多相同和相似的培养方法、培养条件和技术路线。如果没有现代离体细胞培养技术作为技术支撑,干细胞的体外培养和研究及生命科学领域的很多研究内容将无法进行。目前,大量事实证明,细胞培养技术已在动物、植物和微生物的种质资源保存、组织学、胚胎学、细胞生物学、病毒学、微生物学、免疫学、药理学及异种移植、基因工程、遗传工程、体细胞克隆、转基因动植物、干细胞和医学等很多研究领域得到了广泛应用,具有很高的学术价值、应用价值和广阔的发展前景。

该书内容丰富、深入浅出、图文并茂,充分体现了科学性、系统性、前瞻性、理论性和实用性有机结合的特点。对于提升我国家养动物种质资源体外收集、整理、保存与利用的技术水平和自主创新能力,解决生命科学领域实验材料缺乏等问题,具有重要意义。

中国科学院院士



2008 年 5 月于长春

• i •

前 言

21 世纪,随着科学的发展及其各学科之间理论与方法的相互交叉和渗透,加快了细胞生物学发展和成熟的步伐。特别是近些年来涌现出了很多本学科的新思维、新方法、新技术、新理论和新成果,极大地丰富了细胞生物学的理论宝库。同时,细胞生物学也面临着新世纪的严峻挑战,即未来细胞生物学的研究成果如何成为 21 世纪种质资源保存、基因工程、遗传工程、体细胞克隆、转基因动物、生物制药、干细胞、微生物学、免疫学、组织学、胚胎学和医学研究中至关重要的技术支撑和保障。虽然我国的专家和学者在家养动物细胞体外培养和细胞生物学研究方面做了一些工作,但是,仍然存在着偏重于应用研究,而基础研究相对薄弱的弊端。面临着 21 世纪的发展机遇和挑战,针对我国家养动物体外细胞培养理论、方法和技术发展滞后,具有自主知识产权的关键技术瓶颈突破艰难等尖锐问题,本书作者在参考和综合分析大量国内外相关书籍及文献资料的基础上,通过 70 余种家养动物群体的体外细胞培养、形态学、微生物学、细胞活率、细胞活力、细胞生长规律、细胞凋亡、信号转导、细胞融合、核型、同工酶、重组胚制备、干细胞、基因结构和功能以及和多种外源基因在培养细胞中的表达等决定细胞质量的技术检测和深入研究,攻克了家养动物细胞体外培养、鉴定和利用等关键技术难题,积累了丰富的实践经验,获得了大量的第一手实验数据,为本书的撰写奠定了坚实理论、方法和技术基础。特别是所取得的系列科研成果均在国内的 19 所高等院校、科研院所及相关企业的科学研究与生产实践中得到验证和完善,保证了此书内容的科学性、系统性和完整性。本书作者将多年以来取得的系列研究成果有机地与国内外同一领域的最新进展、动态、理论、方法和技术相结合完成本书的撰写工作。

全书 160 余万字,包括:(1)绪论:国内外细胞培养技术发展概述、国内外细胞库现状概述;(2)动物细胞体外培养的基本理论:体外培养动物细胞生物学、影响动物细胞体外生长的因素;(3)动物细胞体外培养的设施和基本条件:实验室设计、实验室布局、实验室设备器材;(4)动物细胞体外培养用液:水和平衡盐溶液、培养基、动物细胞体外培养的其他常用液;(5)培养器皿的清洗、消毒与灭菌:清洗、消毒灭菌、清洁剂、消毒剂的选择;(6)实验室安全问题:危险事故和防范、安全清单、危害性化学试剂;(7)无菌技术:无菌环境的维持、无菌操作的具体要求;(8)家养动物细胞体外培养的基本方法:家养动物细胞培养技术、取材与组织分离、原代培养、传代培养;(9)家养动物组织细胞体外培养技术:上皮组织的细胞培养、结缔组织的体外培养、淋巴细胞的培养、骨与软骨组织的体外培养、肌肉组织的体外培养、神经组织的体外培养;(10)干细胞的培养:胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、肌肉干细胞、表皮干细胞、胰岛干细胞;(11)肿瘤细胞的体外培养:肿瘤细胞生长的细胞生物学特性、体外培养肿瘤组织细胞的方法和技术、体外培养肿瘤细胞的生物学检测、肿瘤细胞系的建立与保存;(12)细胞培养过程中的污染的检测、消除和预防:污染的种类和途径、污染对细胞的影响及检测、污染的预防

和消除；(13) 家养动物体外培养细胞的生物学性状检测：细胞体外培养的常规检查、细胞生物学性状检测、普通光学显微镜、特殊光学显微镜、电子显微镜术观察的一般过程、细胞的形态学观察、细胞化学技术、免疫细胞化学技术、免疫荧光细胞化学技术、细胞的增殖动力学检测、流式细胞仪检测、细胞毒性检测；(14) 家养动物细胞遗传学性状检测：细胞的遗传学、性染色质检测、培养细胞染色体显示法、染色体结构显示和检测、细胞 DNA 遗传特征分析、染色体基因定位；(15) 细胞拆合与细胞重组：细胞拆合的方法、重组细胞的方式及组分的制备、细胞的重组及其关键技术；(16) 细胞融合与单克隆抗体：细胞融合的原理和方法、动物细胞融合技术的应用、细胞融合技术的进展与展望、单克隆抗体；(17) 细胞克隆：细胞克隆技术、影响细胞克隆形成率的因素、细胞克隆的分离；(18) 基因细胞内导入技术：基因转染、转基因技术、基因导入的方法、转基因动物、几种转基因动物的制作过程、转基因动物技术的发展、转基因动物的理论和实践意义、转基因动物面临的问题；(19) 体外细胞的转化；(20) 细胞培养的应用研究；(21) 细胞周期与同步化；(22) 重要、濒危畜禽品种体细胞库构建及其生物学特性研究实例等二十二章内容。

在国家重大基础性工作专项 (2000DEB10025, 2001DEA10006, 2002DEB10051)、国家自然科学基金 (30100132, 30371026, 30671539)、国家自然科技资源平台建设 (2003DEA3N029, 2004DKA30450, DKA211101)、国家高技术研究发展计划 (2001AA213131, 2006AA10Z198, 2007AA10Z170) 和国家科技支撑 (2006BAD13B08) 等项目的资助下，作者历经八年时间完成了本书前期研究工作基础的奠定、撰写和出版任务。

细胞生物学的发展速度如此之快，在本书的撰写和出版过程中难以将国内外新近涌现出的有关细胞生物学的新理论、新方法和新技术的内容引入书中，特别是由于作者的水平有限，书中难免有误，恳请各位专家和读者批评指正。

关伟军 马月辉
2008 年 3 月于北京

目 录

序

前言

第一章 绪论 1

第一节 国内外细胞培养技术发展概述 1

第二节 国内外细胞库现状概述 4

第二章 动物细胞体外培养的基本理论 8

第一节 体外培养动物细胞生物学 8

一、体外培养细胞的特征 8

(一) 形态学特征 9

1. 贴附型 9

2. 悬浮型 10

(二) 遗传学特征 11

1. 核型变化 11

2. 永生化和恶变 11

3. 细胞性别 12

(三) 生长特征 12

1. 贴附并伸展 13

2. 接触抑制 13

3. 密度抑制 13

二、体外培养动物细胞的生长与增殖 14

(一) 单个细胞的生长过程 14

1. G₁期 14

2. S期 14

3. G₂期 14

4. M期 14

(二) 细胞系的生长过程 15

1. 原代培养期 16

2. 传代培养期 18

3. 衰退期 19

(三) 每代细胞的生长过程 19

1. 潜伏期 20

2. 指数生长期 20

3. 停滞期 21

4. 衰亡期 21

三、体内外细胞分化特点 23

(一) 体内外细胞的差异 23

(二) 培养细胞分化状态的变化 23

(三) 培养细胞的分化 24

1. 不适应 24

2. 脱分化或去分化 25

第二节 影响动物细胞体外生长的因素 26

一、组织和细胞供体年龄 26

二、细胞生存条件和环境 26

(一) 无菌环境对细胞生长的影响 26

(二) 培养基成分对细胞生长的影响 26

1. 水 27

2. 氨基酸 27

3. 碳水化合物 27

4. 无机离子 28

5. 维生素 29

6. 有机酸 31

7. 有机补充物 31

8. 促生长因子及激素 31

9. 黏滞度 32

10. 抗生素 32

(三) 培养基的 pH 对细胞生长的影响 33

(四) 温度条件对细胞生长的影响 33

1. 生理温度范围	33	6. 细胞的冻存与复苏	46
2. 高温的影响	34	7. 细胞有无交叉污染	46
3. 低温的影响	35	8. 细胞系有无微生物污染	46
4. 渗透压	35	四、细胞系的命名	46
5. 气相环境	35	第三章 动物细胞体外培养的设施	
6. 贴附底物	36	和基本条件	47
7. 辐射	38	第一节 实验室设计	47
8. 超声波	39	一、设计原则	47
9. 影响细胞生长的其他因素	39	二、设计方案	47
第三节 细胞系或细胞株的构建		第二节 实验室布局	48
.....	40	一、无菌操作室	48
一、基本概念	40	二、清洗准备区	49
二、所建细胞系(株)的档案信息	41	(一) 洗涤区	49
(一) 培养细胞的来源	41	(二) 灭菌区	49
(二) 细胞生物学特性	41	(三) 储藏区	50
(三) 培养条件和方法	42	(四) 试剂配制区	50
三、细胞系(株)的鉴定	42	三、低温储存区	50
(一) 细胞系鉴定的内容	42	第三节 实验室设备器材	50
1. 细胞系的纯度	42	一、必需设备	51
2. 细胞学特征	42	(一) 超净工作台	51
3. 细胞系的稳定性	42	(二) 培养箱	52
4. 微生物污染检查	42	(三) 倒置显微镜	53
5. 细胞系(株)交叉污染检查	42	(四) 高压蒸汽灭菌装置	53
(二) 细胞系鉴定的方法	43	(五) 电热干燥箱	54
1. 形态学鉴定	43	(六) 水纯化装置	54
2. 细胞核型分析	43	1. 金属蒸馏器具	54
3. 细胞 DNA 指纹技术检测	43	2. 石英玻璃蒸馏器	54
4. 同工酶检测	44	3. 去离子水纯化装置	55
5. 抗原标记	44	4. 超纯水装置	56
6. 细胞生长实验	45	(七) 离心机	56
(三) 细胞系鉴定的结论	45	(八) 冰箱	56
1. 组织来源	45	(九) 天平	56
2. 培养条件及方法	45	(十) 冷冻储存装置	57
3. 染色体核型分析鉴定	45	(十一) 过滤除菌装置	58
4. 细胞生长情况	45	1. 不锈钢板式滤器	58
5. 细胞生物学检测	46	2. 玻璃漏斗式滤器	59
		3. 微孔滤膜滤器	59
		(十二) 洗刷装置	60

(十三) 恒温水浴锅	60	1. 血清的种类	70
(十四) 细胞计数板	61	2. 血清的主要成分及主要作用	71
二、辅助设备	61	3. 细胞培养中使用血清的主要优点	73
(一) 移液装置	61	4. 细胞培养中使用血清的缺点	73
1. 电动移液器	61	5. 血清的质量标准	75
2. 微量移液器	61	6. 牛血清产品的质量鉴定	76
3. 多通道可调式微量移液器	62	7. 血清的使用与储存	77
4. 连续加液装置	62	8. 血清使用的注意事项	77
(二) 电子细胞计数仪	62	(三) 水解乳蛋白	78
(三) pH 计	63	(四) 胶原	78
(四) 显微操作仪	63	1. 鼠尾胶原的制备方法	79
(五) 细胞融合仪	63	2. 胶原的使用方法	79
(六) 磁力搅拌器	64	(五) 胚胎浸出液	79
三、常用耗材	64	二、合成培养基	80
(一) 手术器械	64	(一) 合成培养基的种类	81
(二) 培养器皿	64	1. Eagle MEM	85
1. 溶液瓶	65	2. DMEM	85
2. 培养瓶	65	3. IMDM	85
3. 培养皿	65	4. RPMI 1640	86
4. 多孔培养板	66	5. 199、109 培养基	86
5. 移液管和吸管	66	6. HamF10、HamF12	86
6. 离心管	66	7. McCoy 5A	86
7. 其他器皿	66	(二) 合成培养基的主要成分	86
(三) 注射器和针头	66	1. 氨基酸	87
(四) 滤膜	66	2. 维生素	87
第四章 动物细胞体外培养用液	67	3. 碳水化合物	87
第一节 水和平衡盐溶液	67	4. 无机离子	87
一、水	67	5. 其他成分	88
二、平衡盐溶液	67	(三) 合成培养液的配制	88
(一) BSS 液的类别	68	(四) 培养液的分类	89
1. 配制培养液用 BSS	68	1. 生长培养液	89
2. 分散消化用 BSS	68	2. 维持液	89
(二) BSS 的制备	68	三、培养基和血清的选择	89
第二节 培养基	69	(一) 培养基的选择	89
一、天然培养基	69	1. 经验法	90
(一) 血浆	70	2. 实验法	90
(二) 血清	70		

(二) 对血清的选择	90	(六) 青霉素/链霉素溶液 (100 倍 浓度)	103
1. 血清批号差异和检测	90	(七) 200 mmol/L 谷氨酰氨液 (100 倍浓度)	103
2. 灭活问题	91	(八) 冻存液	103
四、无血清培养基	91	第五章 培养器皿的清洗、消毒 与灭菌	106
(一) 无血清培养液的特点	92	第一节 清洗	106
1. 无血清培养液的优点	92	一、玻璃器皿的清洗	106
2. 无血清培养液的缺点	92	(一) 浸泡	106
(二) 无血清培养基的设计思路	93	(二) 刷洗	107
1. 分析血清的成分	93	(三) 浸酸	107
2. 采用合成的方法	93	(四) 冲洗	107
3. 寻找限制因素	93	二、塑料器皿的清洗	108
(三) 无血清培养基的组成成分	93	三、橡胶制品的清洗	109
1. 基础培养基	93	四、金属器皿的清洗	110
2. 附加成分	94	五、除菌滤器的清洗	110
(四) 无血清培养基的制备	96	(一) 玻璃漏斗滤器	110
五、无蛋白培养基和限定化学成 分培养基	97	(二) 蔡氏滤器	110
第三节 动物细胞体外培养的 其他常用液	98	(三) 注射器薄膜滤器	110
一、其他常用液类型	98	六、器皿包装	111
(一) 消化液	98	第二节 消毒灭菌	111
1. 胰蛋白酶液	98	一、物理消毒灭菌方法	112
2. 胶原酶溶液	98	(一) 热力灭菌	113
3. EDTA 溶液	99	1. 高温湿热灭菌	113
(二) pH 调整液	100	2. 高温干热灭菌	115
1. NaHCO ₃ 溶液	100	(二) 辐射灭菌法	115
2. HEPES 溶液	100	1. 紫外线杀菌	115
(三) 抗生素液	100	2. 电离辐射灭菌	116
(四) 冷冻保护剂	101	3. 微波灭菌	116
(五) 谷氨酰胺补充液	102	(三) 滤过除菌	116
二、几种常用液的具体配制	102	(四) 超声波杀菌	116
(一) 0.25% 胰蛋白酶溶液	102	(五) 干燥与低温抑菌	117
(二) 0.02% EDTA 溶液	102	二、化学消毒灭菌方法	118
(三) 0.05% 胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA · 4Na 溶液	103	(一) 化学消毒灭菌的机理	118
(四) 5.6% NaHCO ₃ 溶液	103	1. 使菌体蛋白变性、凝固 ...	118
(五) 1 mol/L HEPES 缓冲液		2. 破坏细菌的细胞膜	118

3. 干扰细菌的酶系统	118	(二) 有害物播散	129
(二) 化学消毒灭菌方法	118	三、实验事故	130
1. 浸泡法	118	(一) 仪器损坏	130
2. 擦拭法	118	(二) 放射性物质	130
3. 熏蒸法	119	1. 摄入	130
4. 喷雾法	119	2. 标记的试剂	130
(三) 化学消毒剂的分类	119	3. 高能源	130
(四) 细胞培养工作中常用的几		(三) 激光辐射	131
种消毒灭菌剂	121	(四) 液氮	131
1. 苯扎溴铵 (新洁尔灭) ...	121	(五) 紫外光或紫外线	131
2. 过氧乙酸	121	(六) 高压灭菌锅和微波炉	131
3. 戊二醛	122	(七) 针剪器械	131
4. 乙醇	122	(八) 血液和血液制品	132
5. 环氧乙烷	123	(九) 细菌菌株的运输有关事宜	
6. 二溴海因	123		132
三、抗生素消毒灭菌	124	第二节 安全清单	132
四、影响消毒灭菌效果的因素		一、实验室建筑	133
.....	124	二、储存设施	134
(一) 消毒剂量	124	三、环境卫生和个人卫生设施	
(二) 微生物的种类和数量	124		134
(三) 温度	125	四、暖气和通风	134
(四) 相对湿度	125	五、照明	135
(五) 酸碱度	125	六、保养	135
(六) 有机物质	125	七、安全	135
(七) 拮抗物质	125	八、消防	135
第三节 清洁剂、消毒剂的选择		九、易燃液体的储存	136
.....	126	十、电的危险	136
一、清洁剂的选择	126	十一、压缩气体和液化气	136
二、消毒剂的选择	126	十二、个体防护	137
(一) 消毒剂的选择原则	126	十三、实验室成员的健康与安全	
(二) 消毒剂的选择	126		137
第六章 实验室安全问题	128	十四、实验室仪器设备	138
第一节 危险事故和防范	128	十五、感染性物质	138
一、人身危险	129	十六、化学试剂和放射性物质	
(一) 外伤	129		138
(二) 中毒	129	第三节 危害性化学试剂	139
(三) 触电	129	一、化学试剂的毒性作用	139
二、广泛性危险	129	二、危害途径	140
(一) 火灾	129	1. 吸入	140

2. 接触	140	一、贴壁培养	156
3. 食入	140	(一) 基本原理	156
4. 外伤	140	(二) 试剂和设备	156
三、化学试剂的储存	140	(三) 操作步骤	156
四、不能共存的化学试剂	140	(四) 说明	157
第七章 无菌技术	147	(五) 贴壁培养的讨论	157
第一节 无菌环境的维持	147	二、悬浮培养	157
一、工作环境	147	(一) 操作步骤	158
二、工作台面	148	(二) 悬浮培养的讨论	158
三、试剂与培养基	148	第二节 取材与组织分离	158
四、培养细胞所用器具	149	一、采样前的准备	158
五、个人卫生	149	(一) 准备工作	158
第二节 无菌操作的具体要求	149	1. 实验室硬件的准备	158
一、仪器和设备的无菌操作	149	2. 培养用液的准备	159
(一) 培养箱	149	3. 清洗准备	159
(二) 装取培养物	150	4. 灭菌消毒准备	159
(三) 超净工作台	150	5. 采样器具的准备	159
二、超净工作台内的无菌操作	151	6. 冻存细胞准备	160
(一) 培养前的准备工作	151	7. 实验室消毒准备	160
(二) 用消毒液擦拭操作台	151	(二) 准备步骤举例	160
(三) 灼烧	151	二、几类常用实验动物不同部位的	
(四) 试剂瓶和培养瓶的操作	151	取材	161
(五) 移液	151	(一) 动物胚胎的取材	161
(六) 倾倒液体	152	1. 分离鸡胚	161
(七) 加盖	152	2. 分离鼠胚	162
(八) 培养皿和培养板的操作	152	(二) 成体体表组织的取材	163
三、实例——在超净工作台内进行		(三) 内脏器官组织的取材	164
无菌操作添加培养基	153	(四) 血细胞的采集	164
(一) 实验材料	153	1. 割(剪)尾采血	164
(二) 操作步骤	153	2. 鼠尾刺血法	164
第八章 家养动物细胞体外培养的		3. 眼眶静脉丛采血	165
基本方法	155	4. 断头取血	165
第一节 家养动物细胞培养技术	155	5. 心脏采血	165
		6. 颈静脉采血	165
		7. 腹主动脉采血	165
		8. 股动(静)脉采血	165
		三、细胞培养的常用操作技术	167
		(一) 细胞系的接种和传代	167

1. 悬浮培养细胞的接种和传代	167	4. 培养液及平衡盐溶液	182
2. 贴壁培养细胞的接种和传代	168	(二) 传代过程	182
(二) 细胞的洗脱方法	168	1. 第一次传代	182
第三节 原代培养	169	2. 常规传代	183
一、原代培养的类型	169	二、传代培养的注意事项	184
(一) 组织块原代培养法	169	(一) 传代的时机与再培养的细	
(二) 悬浮细胞原代培养法	171	胞密度	184
(三) 细胞的无血清培养	172	(二) 传代数或代数与培养物的	
(四) 哺乳动物细胞的大量培养	172	生长	184
二、分离(散)细胞的方法	173	第五节 细胞的冻存、复苏与	
(一) 机械解离细胞法	174	运输	185
1. 离心分离法	174	一、细胞的低温冻存	185
2. 切割分离法	174	(一) 细胞冻存的步骤	186
3. 机械分散法	174	(二) 细胞系的维持	187
(二) 酶学解离细胞法	174	二、冻存细胞的复苏	187
1. 胰蛋白酶解离细胞法	175	(一) 用品	188
2. 胶原酶解离细胞法	176	(二) 步骤	188
(三) 螯合剂解离细胞法	177	(三) 注意事项	188
1. 操作步骤	177	三、细胞培养物冻存和复苏中的	
2. 讨论及注意事项	178	安全措施	188
3. 培养结果	179	四、细胞的运输	189
三、原代细胞培养的注意事项	179	第九章 家养动物组织细胞体外	
(一) 培养液	179	培养技术	190
1. 培养基的选择	179	第一节 上皮组织的细胞培养	
2. 添加物	179		190
3. 培养液的酸碱度	179	一、内皮细胞的培养	190
4. 换液	180	(一) 血管内皮细胞的培养	190
(二) 培养空间	180	1. 血管内皮细胞的分离	191
(三) 其他方面	180	2. 血管内皮细胞的培养	193
第四节 传代培养	181	3. 内皮细胞的传代、冻存与复苏	193
一、传代过程	181	4. 血管内皮细胞的鉴定	193
(一) 材料	181	5. 注意事项	194
1. 蛋白酶消化液	181	(二) 淋巴管内皮细胞的培养	195
2. 蛋白酶抑制剂	182	1. 灌注消化法	195
3. 培养器皿	182	2. 植块培养法	196
		二、单层柱状上皮细胞的培养	196

(一) 胃黏膜上皮细胞的培养	196	(二) 食管黏膜上皮细胞的培养	207
1. 材料	196	1. 材料	208
2. 操作步骤	197	2. 操作程序	208
3. 结果分析	197	3. 结果分析与鉴定	208
4. 胃黏膜上皮细胞的鉴定	197	4. 注意事项	208
(二) 肠黏膜上皮细胞的培养	197	(三) 腺上皮细胞培养	208
1. 材料	198	1. 乳腺上皮细胞的培养	209
2. 操作步骤	198	2. 从乳汁中获得乳腺上皮细胞	211
3. 结果分析	198	的培养	211
4. 肠黏膜上皮细胞的鉴定	198	第二节 结缔组织的体外培养	212
5. 注意事项	199	一、成纤维细胞的培养	212
(三) 子宫颈上皮细胞培养	199	(一) 动物真皮成纤维细胞的培养	212
1. 材料	199	1. 材料	212
2. 操作步骤	200	2. 操作步骤	212
三、假复层纤毛柱状上皮细胞的培养	201	3. 培养结果及鉴定	213
(一) 灌注消化法	202	(二) 鸡胚成纤维细胞的培养	213
1. 材料	202	1. 材料	213
2. 操作程序	202	2. 操作步骤	214
3. 结果分析	202	二、巨噬细胞培养	214
(二) 组织块培养法	202	1. 材料	214
1. 材料	202	2. 操作步骤	215
2. 操作程序	203	3. 结果与鉴定	215
3. 结果分析	203	4. 注意事项	215
(三) 分化培养	203	三、肥大细胞的培养	216
1. 材料	203	(一) 皮肤肥大细胞的培养	216
2. 操作程序	203	1. 材料	216
3. 结果分析	203	2. 操作程序	216
四、复层扁平上皮细胞的培养	204	3. 结果与鉴定	217
(一) 表皮细胞的培养	204	(二) 肺肥大细胞的培养	217
1. 角质形成细胞的分离培养	204	1. 材料	217
2. 真皮复合培养法	205	2. 操作步骤	217
3. 真皮替代物复合培养法	205	3. 结果分析	218
4. 角膜上皮细胞培养	206	(三) 肠肥大细胞的培养	218
		1. 材料	218
		2. 操作程序	218

3. 结果分析	219	1. 尼龙毛柱分离法	231
四、前脂肪细胞的培养	219	2. T 细胞花环沉降法	232
1. 实验材料	219	四、淋巴细胞的培养	233
2. 操作步骤	220	(一) 淋巴细胞转化试验	233
3. 实验结果与鉴定	220	1. 实验材料	234
第三节 淋巴细胞的培养	220	2. 操作步骤	234
一、血细胞和淋巴细胞的发生		3. 结果分析	235
和分类	220	4. 讨论	235
(一) 血细胞的发生	220	(二) 淋巴细胞的体外长期培养	
(二) 血细胞的分类	221		235
1. 红细胞	222	1. 用 IL-2 建立 T 淋巴细胞克隆	
2. 白细胞	222		235
3. 血小板	223	2. EB 病毒转化 B 淋巴细胞	
(三) 淋巴细胞的分类	223		236
1. T 淋巴细胞	224	第四节 骨与软骨组织的体外	
2. B 淋巴细胞	224	培养	237
3. 大颗粒淋巴细胞	225	一、成骨细胞的培养	237
二、淋巴细胞的收集	225	(一) 骨内成骨细胞的培养	237
(一) 淋巴液中淋巴细胞的收集		1. 实验材料	237
.....	225	2. 操作步骤	238
1. 实验材料	225	3. 结果分析	239
2. 操作步骤	226	4. 注意事项	239
3. 结果分析	226	(二) 骨膜内成骨细胞培养	240
4. 注意事项	226	1. 实验材料	240
(二) 淋巴结中淋巴细胞的收集		2. 操作步骤	240
.....	226	3. 结果与讨论	240
1. 实验材料	227	二、破骨细胞的培养	241
2. 操作步骤	227	(一) 成熟破骨细胞分离培养法	
3. 结果分析	227		241
4. 注意事项	227	1. 实验材料	241
(三) 血中淋巴细胞的收集	227	2. 操作步骤	241
1. 实验材料	228	3. 培养结果	242
2. 操作步骤	228	4. 培养破骨细胞的鉴定	242
3. 注意事项	228	5. 讨论	243
三、淋巴细胞的分离	229	(二) 骨髓长时间培养诱导分化	
(一) 淋巴细胞的纯化	229	形成破骨细胞法	243
1. 玻璃黏附法	229	1. 实验材料	243
2. 羧基铁粉法	229	2. 操作步骤	243
(二) T 细胞和 B 细胞的分离	230	3. 结果与讨论	244

三、软骨细胞的培养	244	1. 来源	254
(一) 关节软骨细胞的短期培养	245	2. 手术器械	254
1. 实验材料	245	3. 清洗液	254
2. 操作步骤	245	4. 消化液	254
3. 结果分析	246	5. 培养液	254
4. 讨论	246	(二) 操作步骤	255
(二) 关节软骨细胞的长期培养	246	(三) 结果分析	255
1. 实验材料	247	(四) 注意事项	255
2. 操作步骤	247	三、平滑肌细胞的培养	255
3. 结果分析	247	(一) 实验材料	256
4. 注意事项	248	(二) 操作步骤	256
四、滑膜细胞的培养	248	1. 分散细胞培养法	256
(一) 滑膜植块培养法	248	2. 植块培养法	257
1. 实验材料	248	(三) 结果分析	257
2. 操作步骤	248	(四) 注意事项	257
3. 结果及鉴定	249	第六节 神经组织	257
(二) 分离滑膜细胞培养法	249	一、神经元的培养	258
1. 实验材料	249	(一) 实验材料	258
2. 操作步骤	249	1. 来源	258
3. 细胞纯化	250	2. 手术器械	258
4. 结果讨论	250	3. 盖玻片	258
第五节 肌肉组织的体外培养	250	4. 清洗液	258
一、骨骼肌细胞的体外培养	251	5. 消化液	258
(一) 鸟类骨骼肌细胞的培养	251	6. 培养液	259
1. 实验材料	251	(二) 操作步骤	259
2. 操作步骤	252	(三) 结果鉴定	259
3. 结果分析	252	(四) 讨论	259
4. 注意事项	252	1. 取材	259
(二) 啮齿类动物骨骼肌细胞的培养	253	2. 培养条件	260
1. 实验材料	253	3. 操作过程	260
2. 操作步骤	253	4. 关于神经元的纯度	260
3. 结果与讨论	253	二、神经胶质细胞的培养	260
二、心肌细胞体外培养	254	(一) 星形胶质细胞的培养	261
(一) 实验材料	254	1. 实验材料	261
		2. 操作步骤	262
		3. 结果鉴定	262
		4. 注意事项	263
		(二) 少突胶质细胞的培养	263
		1. 实验材料	263