



組織培養的技術

黑田行昭／原著

上野洋一郎・溫秋明・柯俊良・陳怡菁・郭順宇・郭榮烈・陳泓志・胡威文・張傳偉／編譯

楊美桂／校閱

藝軒圖書出版社

組織培養的技術

黑田行昭 / 原著

上野洋一郎・溫秋明・柯俊良・陳怡菁・郭順宇
郭榮烈・陳泓志・胡威文・張傳偉 / 編譯

楊美桂 / 校閱

藝軒圖書出版社

國家圖書館出版品預行編目資料

組織培養的技術／上野洋一郎等編譯。

—第一版。—臺北市：藝軒，2002

面；公分。

參考書目：面

ISBN 957-616-581-4 (平裝)

1. 組織（生物學） 2. 生物技術

361.2

89003963

本書任何部份之文字或圖片，如未獲得本社書面同意，
不得以任何方式抄襲、節錄及翻印。

新聞局出版事業登記證局版台業字第一六八七號

組織培養的技術

(平裝) 特價新臺幣 480 元

校閱者：楊美桂

原著者：黑田行昭

編譯者：上野洋一郎·溫秋明·柯俊良·陳怡菁·郭順宇

郭榮烈·陳泓志·胡威文·張傳偉

發行所：藝軒圖書出版社

發行人：彭賽蓮

總公司：台北縣新店市寶高路7巷1號5樓

電話：(02)2918-2288

傳真：(02)2917-2266

網址：www.yihisient.com.tw

E-mail: yihisient@ms17.hinet.net

總經銷：藝軒圖書文具有限公司

台北市羅斯福路三段316巷3號

(台大校門對面·捷運新店線公館站)

電話：(02)2367-6824

傳真：(02)2365-0346

郵政劃撥：0106292-8

台中門市

台中市北區五常街178號

(健行路445號宏總加州大樓)

電話：(04)2206-8119

傳真：(04)2206-8120

國際書局

台中市學士路187號

(中國醫藥學院附近)

電話：(04)2201-5386

大夫書局

高雄市三民區十全一路107號

(高雄醫學大學正對面)

電話：(07)311-8228

本公司常年法律顧問／魏千峰、邱錦添律師

二〇〇二年九月第一版二刷

ISBN 957-616-581-4

本書如有缺頁、破損或裝訂錯誤，請寄回本公司更換。

讀者訂購諮詢專線：(02) 2367-0122

譯者序

近十幾年來，生物技術的發展令人刮目相看，尤其是遺傳工程學的進步極為快速且有非常燦爛的成果。細胞培養方面的研究結果也不遜色。有些公司甚至利用組織培養技術，開始商業化發展出移植手術用人造皮膚的培養。

我一直從事於水產動物的組織培養，及進行病毒有關方面的研究工作。前幾年我曾出版過一本『組織培養技術』的書，獲得好評，這本書可當做實驗課本，所以我一直希望能再出版一本內容較深的書可當做上課用的教材，後來承蒙藝軒圖書出版公司董先生的協助，並獲得日本原出版公司的同意，纔能順利出版這本書。本書內容非常廣泛，包括動物與植物的組織培養。

著者認為生物技術是遺傳工程學和組織培養的兩大支柱，關於後者，不僅可作為生物學的基礎研究，亦可應用於產業上的開發，例如利用植物細胞的大量培養技術，生產色素而添加於口紅中。也有大量培養動物細胞（20 kL）而製造單株抗體，以便降低成本等例子。我希望這本書對初學者有些幫助，能從其中學會組織培養的技術，繼續從事這方面的研究工作。

本人非常感激藝軒圖書出版公司董先生和他的同事，以及提供非常寶貴意見的助言者，尤其是幫助校對的曾薰小姐。這本書的最後校正是在日本神戶進行的。著者向提供場所及文書處理機的安田敏明・章子夫妻衷心感謝。最後，這本書獻給我的愛妻——羅茉莉小姐作為紀念。

本書的翻譯、編輯上雖已力求慎重，但恐仍有疏漏之處，懇請讀者予以賜正為幸。

1999年12月30日於日本神戶

上野洋一郎

原 序

近幾年來組織培養技術的進展極顯著。當初的嘗試極單純，就是自生物體內取出各種組織或細胞，在人為環境下使這些活存，並由在活體內複雜地纏在一起的其他細胞及多數因素隔離，在顯微鏡下直接觀察組織和細胞時時刻刻所呈現的變化。後來開發人工合成培養基，且建立出多種細胞株等的結果，充分滿足需要嚴格的定量性和再現性的近代科學。加上，運用純系化出來的細胞而不只遺傳學，發生生物學，細胞生物學等基礎部門，亦在醫學及農學等生命科學部門上如今體外法培養已成為不可缺少技術。最近利用細胞融合法形成融合瘤，生產單株抗體，大量製造干擾素及各種激素等，用細胞工程學方法的種種實用面上之應用非常引人注目。昭和50年（1975年）6月，日本的New Science出版社創刊的月間學術雜誌「組織培養」中，請從事組織培養個個部門的尖端研究人員們根據本身的經驗，寫「組織培養」之「培養技術講座」。其中提到技術上的具體問題以及解決這些問題的“秘訣”等。這本書是以上述「培養技術講座」為基礎，請著者們修訂內容，而其他必要的項目，再請數位著者追加寫稿而完成的。

本書的內容並不是網羅組織培養的所有技術。但關於細胞冷凍保存法，就包括植物培養上的詳細研究成果，而關於培養基的添加物，則記述以人體雙倍體細胞的實驗結果。因此，本書含有極新的研究成果及相當接近學術論文的記述。其中到處提到超過一般組織培養的入門書及技術書的內容，所以非常獨特，可滿足要求更深知識的讀者之需求。

著者們希望利用組織培養的個個部門之研究人員有效活用本書。

以下列舉組織培養的專業書。

勝田 甫著：組織培養法，納谷書店，東京（1955）

黑田行昭著：動物組織培養（モダソバイオロジーシリーズ23），共立出版，東京（1974）

木村 廉監修：組織培養 基本と實際，永井書店，東京（1975）

大星章一・管野晴夫編：人癌細胞の培養，朝倉書店，東京（1975）

中井準之助ほか著：組織培養，朝倉書店，東京（1975）

黒田行昭責任編集：培養細胞遺傳學實驗法（遺傳學實驗法講座2），共立出版，東京（1981）

日本組織培養學會編：組織培養の技術，朝倉書店，東京（1982）

（有中文版，藝軒圖書出版社）

勝田 甫・高岡聰子著：組織培養法，學會出版セクター，東京（1982）

國立遺傳學研究所

黒田 行 昭

目 次

I. 基本技術	1
1. 培養實驗用器具	3
A. 洗淨用器具類	3
B. 滅菌用裝置類	4
C. 培養用器具類	7
D. 觀察和記錄器具	11
E. 冷藏、冷凍保存設備	13
F. 其他設備	13
文 獻	13
2. 實驗器具之洗滌法	15
A. 玻璃製器具類	15
B. 塑膠製品	21
C. 金屬器具	21
D. 橡膠製品	21
E. 結 論	21
文 獻	22
3. 滅菌法	23
A. 滅菌之理論	23
B. 滅菌法各論	27
C. 黴漿菌 (mycoplasma) 污染和其去除	33
文 獻	37

4. 培養基	39
A. 培養基開發的歷史及其效用評估	39
B. 培養基的開發現況和有關血清的問題	40
C. 培養基之選擇——天然培養基或人工合成培養基	41
D. 脊椎動物細胞培養用培養基	43
E. 無脊椎動物細胞培養用培養基——以昆蟲為主	59
F. 植物組織培養用培養基	87
文 獻	95
5. 血 清	105
A. 血清種類	105
B. 少量血清的採集法	106
C. 批號檢查	107
D. 保存及加熱處理的問題	109
E. 結 論	109
文 獻	110
6. 培養基之添加物——以人體雙倍體細胞為例	111
A. 不同人工合成培養基間的群落形成率和增殖率的差異	111
B. 地賽米松 (dexamethasone) 之效果	112
C. D T T 之效果	113
D. 結 論	114
文 獻	114
7. S H 基保護劑	115
A. 細胞與純系培養	115
B. S H 基保護劑之效果	117
C. 結 論	119
文 獻	119

8. 冷凍保存法	121
A. 細胞的冷凍	121
B. 前冷凍法	122
C. 冷凍和加溫速度對細胞存活率之影響	124
D. 培養細胞在液態氮中的活存	125
E. 以液態氮冷凍保存癒傷組織	129
文 獻	131

II. 培養技術 133

1. 細胞之純系化	135
A. 毛細管法 (capillary tube method)	135
B. 微滴法 (microdrop method)	137
C. 燙死法 (heat-killing method)	137
D. 群落形成法 (colony-forming method)	139
E. 細胞群落之分離法	143
F. 瓊脂懸浮培養法 (agar suspension culture method)	145
G. 血纖維蛋白凝膠培養法 (fibrin gels culture method)	147
H. 複製法 (replica method)	148
I. 塑膠片法 (plastic sheet method)	152
J. 培養皿複製法 (dish replica method)	152
K. 限制稀釋法 (limiting dilution method)	155
文 獻	157

2. 同步培養法	159
A. 選別法	159
B. 誘發法	163
C. 其他方法	166
D. 同步率之評估	167
文 獻	168

3. 軟瓊脂內培養法	173
A. 軟瓊脂內培養法	173
B. 軟瓊脂內培養法之應用	177
文 獻	181
4. 器官培養法	183
A. 器官培養之技術	184
B. 影響器官培養的各種因子	191
文 獻	193
5. 大量培養法——以 FM3A 細胞為例	197
A. 細胞、培養基和繼代培養法	198
B. 大量培養所需的器具	198
C. 大量培養法	199
D. 結 論	203
文 獻	204
6. 飼養細胞層法	205
A. 細胞與培養法	205
B. 飼養細胞層之效果	207
C. 飼養細胞層之作用機制	211
文 獻	212
 III. 檢測和觀察技術	215
1. 染色體標本製作法	217
A. 體細胞之染色體標本製作法	217
B. 短期培養細胞之染色體標本製作法	218
C. 染色體之帶 (band) 染色法	220
D. 姊妹染色分體 (sister chromatid) 之染色法	224
E. 核仁形成區的染色法	225

文 獻	226
2. 染色體之分離、分割法	229
A. 染色體分離、分割法	229
B. 無菌狀態之染色體分離法及應用	234
文 獻	239
3. 流動式細胞測量術	241
A. F C 設備概說	241
B. 細胞分散法	243
C. 分散細胞之固定法	244
D. 細胞化學檢驗反應	244
E. 流動式細胞測量術之應用	250
F. 結 論	254
文 獻	254
4. 穿透式電子顯微鏡標本製作法	257
A. 組織片標本觀察法	258
B. 懸浮細胞的標本製作	259
C. 局部細胞觀察法 (<i>in situ</i> 法)	266
D. 特殊觀察法	279
E. 穿透式電子顯微鏡的超薄切片法	282
文 獻	286
5. 掃描式電子顯微鏡標本製作法	291
A. 標 本	291
B. 固 定	295
C. 脫水和乾燥	297
D. 蒸 鍍 (evaporation)	302
E. 特殊方法	304
F. 培養細胞表面之超微形態	305

G. 結 論	309
文 獻	309
6. 輻射自動顯影術 (radioautography)	313
A. 輻射自動顯影術之種類	313
B. 用輻射性物質標幟培養細胞的方法	315
C. 不溶性物質之光顯輻射自動顯影術	318
D. 不溶性物質之電顯輻射自動顯影術	323
E. 可溶性物質之光顯輻射自動顯影術	328
F. 可溶性物質之電顯輻射自動顯影術	330
G. 輻射自動顯影圖之觀察	334
H. DNA 纖維輻射自動顯影術	335
文 獻	345
7. 黴漿菌污染和其檢驗	349
A. 黴漿菌的種類和其污染源	349
B. 檢驗法之種類	349
C. 污染血清的黴漿菌之存活能力	355
D. 感染至細胞的黴漿菌之動態	356
E. 結 論	357
文 獻	358
IV. 特殊技術	361
1. 電泳法	363
A. 細胞配製法	363
B. 使用少數細胞時	365
C. 細胞組成	365
D. 保存培養細胞	367
E. 測定值之判斷法	368
文 獻	368

2. 細胞融合法	369
A. 以單層培養細胞進行的細胞融合	370
B. 各種因素之檢討	371
C. 用懸浮細胞進行的細胞融合	375
D. 結 論	376
文 獻	378
3. 融合瘤形成法	381
A. 細胞融合法	381
B. 融合細胞之篩選法	382
C. 使用 PEG 的細胞融合法	385
D. 結 論	386
文 獻	387
4. 植物原生質體配製法	391
A. 植物原生質體之特徵	391
B. 用於分離原生質體的酵素	392
C. 植物原生質體之製作	393
D. 由培養細胞單獨分離出原生質體	399
E. 植物原生質體之培養	400
F. 結 論	401
文 獻	402

I

基本技術

1

培養實驗用器具

組織培養上所使用的實驗器具，由於有以菌操作、讓細胞活存增殖等特殊需求，因此除了使用包括醫學、生物學、農學、藥學等生物科學的實驗室所要求的器具外，還須特殊的實驗器具。

這些器具包括用來將培養瓶、玻璃器具及其他培養用器具滅菌的設備、維持細胞或組織在一定溫度和一定氣相下的恆溫箱、進行活細胞觀察或攝影的倒立顯微鏡，以及長時間保存活細胞的超低溫冷凍庫等設備。其他，如培養瓶、培養皿和凹面玻片等，與細胞或組織有直接接觸的玻璃製器具，都須予以特殊加工。以下，以剛入門的組織培養學者為對象，列述所需準備的實驗器具。

A. 洗淨用器具類

一般的細胞培養及組織培養上，使用各種玻璃製培養瓶。由於這些培養瓶之玻璃表面性質會影響細胞附著和增殖，因此玻璃製培養瓶的清洗是甚重要的課題。有關清洗方法及注意事項，在後續的章節中會詳述，在這兒只介紹洗淨上

所需要的器具類。

a. 加溫清潔劑處理槽

即用清潔劑來處理燒杯、錐形瓶、血清瓶及試管等玻璃製品的較大型水槽。為了增進洗滌效果，清潔液的溫度最好維持在 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，因此採用附帶溫度調節器的加溫水槽。此種洗滌槽置於一般的水槽旁，可視場所的空間及需求而選用適當的規格。為方便排放廢棄的洗滌液，洗滌槽的底部應有具活栓的排水管，排水管接上實驗室的廢水管。同時準備適合洗滌槽規格的金屬籃，使器皿的洗滌操作更方便。

市面上已有全自動洗淨機出售。即將加入清潔劑、自來水沖洗、去離子水沖洗和烘乾等洗滌步驟予以自動化，只要設定計時器，就可依需求全自動清洗。將試管、錐形瓶、燒杯、培養皿等各種玻璃製品放入這類的洗滌機後，按下啟動開關，即自動進行注水、清潔劑洗滌、排水、沖洗、烘乾等過程。而且，洗滌與沖洗的時間、次數都可依需要設定。

b. 超音波洗淨機(ultrasonic cleaner)

為利用超音波 (20~40 KC) 之強烈空穴作用 (cavitation), 除去附著於玻璃製品的血清、培養基及其他污物的儀器。其優點是可洗淨附著於如注射筒、試管、細口瓶等, 無法以刷子刷洗部分的髒污。目前有多種廠牌出售, 還有將自動水力洗淨器與超音波洗淨器合併的 ultra washer (圖 1)。

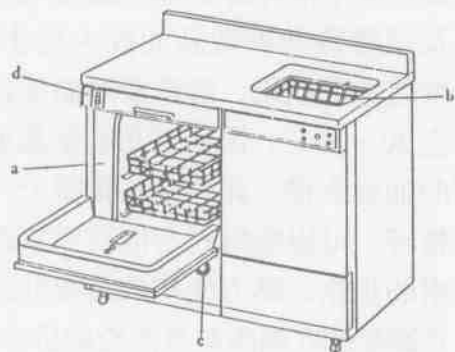


圖 1 Ultra washer。a: 自動水力洗淨器 b: 超音波洗淨器 c: 計時器 d: 沖洗用水選擇器。

c. 吸量管沖洗器(pipette washer)

即用於沖洗吸量管的設備。由於吸量管類的製品, 尤其是尖端較細的部分容易破損, 故有出售由裝吸量管的籃子、圓筒和沖洗槽等所組成的吸量管沖洗器, 以便把吸量管放至籃子內後, 浸在鉻硫酸溶液或放入自動虹吸管式沖洗槽內, 打開自來水後, 可自動沖洗。

B. 滅菌用裝置類

供實驗的玻璃器皿和生理食鹽溶液等, 都必須要滅菌。滅菌一般以乾熱滅菌器或高壓滅菌進行, 而培養液和胰蛋白酶等溶液, 則使用過濾滅菌器。

a. 乾熱滅菌器(oven)

有電熱式與瓦斯加熱式, 但無論何種, 最好使用溫度可達到 200℃ 左右, 且附有溫度調節器的。此類的滅菌器, 適用於玻璃器皿的滅菌, 一般以 160℃ 處理 90 分鐘, 或加熱至 180℃ 後, 讓其自然冷卻的方式加以滅菌。目前已有全自動的儀器, 可預先設定滅菌溫度和時間, 在達到預設的溫度後即開始計時並維持溫度的恆定, 當滅菌時間終了後, 會有蜂鳴聲, 同時切斷電源。

這類滅菌器的最小規格是 50 cm 見方, 有各種規格可選購。滅菌器的內部, 有二層或三層的架子, 可視要滅菌的玻璃器皿的大小和數量可加以調節, 以便保持內部空氣的流通。一般來說, 滅菌器的容量愈大, 滅菌的效果愈差、溫度愈不容易均衡, 且電力的消耗也愈大。為了防備溫度調節器的故障, 最好使用附有過熱斷電防護設施的產品。

使用乾熱滅菌器時, 不同大小或形狀的器具, 最好分批滅菌, 而為保持器皿的無菌狀態, 最好準備附有蓋子的金屬製滅菌罐或滅菌盒。