

研究生教学用书
教育部研究生工作办公室推荐

细胞培养

Cell Culture

第3版

主 编 刘 斌
名誉主编 司徒镇强
主 审 吴 军 正

  世界图书出版公司

研究生教学用书

教育部研究生工作办公室推荐

细胞培养

Cell Culture

第3版

主 编 刘 斌

名誉主编 司徒镇强

主 审 吴军正

编 者 (按姓氏笔画排列)


王 为 王 静 王之发 司徒镇强

朱晓英 刘 峰 刘 斌 关素敏

李 龙 李 焰 李志进 吴军正

陈建元 段建红 徐小方 徐海燕

谭新颖 薛 辉 戴太强

 世界图书出版公司

西安 北京 上海 广州

图书在版编目(CIP)数据

细胞培养/刘斌主编. —3版. —西安:世界图书出版
西安有限公司, 2018. 1

ISBN 978 - 7 - 5192 - 4082 - 0

I. ①细… II. ①刘… III. ①细胞培养—高等学校—
教材 IV. ①Q813. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 006557 号

-
- 书 名 细胞培养
Xibao Peiyang
- 主 编 刘 斌
- 责任编辑 杨 菲
- 装帧设计 新纪元文化传播
- 出版发行 世界图书出版西安有限公司
- 地 址 西安市北大街 85 号
- 邮 编 710003
- 电 话 029 - 87214941 87233647(市场营销部)
029 - 87234767(总编室)
- 网 址 <http://www.wpxa.com>
- 邮 箱 xast@wpxa.com
- 经 销 新华书店
- 印 刷 西安华新彩印有限责任公司
- 开 本 787mm × 1092mm 1/16
- 印 张 21.25
- 字 数 400 千字
- 版 次 2018 年 1 月第 3 版 2018 年 1 月第 1 次印刷
- 国际书号 ISBN 978 - 7 - 5192 - 4082 - 0
- 定 价 59.00 元
-

前 言

随着我国生命科学的迅猛发展,动物组织(细胞)培养技术不断发展和完善,目前该技术已广泛应用于生物学、医学各个领域,成为细胞与组织研究的重要技术之一,是生命科学工作者和研究生必备的实验技能。为了适应教育和教学改革的发展,更好地满足生命科学和医学人才的培养需求,我们根据多年的教学实践经验,于1996年编写了第1版《细胞培养》教材,2004年进行了第一次修订,2005年该书被教育部学位与研究生教育发展中心推荐为“研究生教学用书”。2007年我们编写了第2版《细胞培养》。

在教学和科研实践过程中,《细胞培养》受到生命科学和医学相关专业研究生和科研人员的广泛关注并产生了一定的社会影响力。时至今日,我们根据同道们在使用过程中提出的宝贵意见,对第2版《细胞培养》再次进行全面修订,在保持原书样式和风格的基础上,注重基础理论和实践的联系,突出实验操作可行性。本版中,更正了一些文字错误,删除了一些不合时宜的内容,补充了一些细胞培养新技术,如三维细胞培养、诱导多能干细胞培养、肿瘤干细胞培养等,也补充了一些细胞检测相关的仪器分析技术,如扫描电镜、透射电镜、原子力显微镜和活细胞工作站。

本书的顺利完成,离不开司徒镇强和吴军正老前辈的鼎力支持以及许多年轻有为教员的大力帮助,特此致谢!

《细胞培养》历经多次修订,内容逐渐完善,但是,疏漏之处在所难免,欢迎广大读者批评指正,以便今后再版时更正。

刘 斌

2017年12月于第四军医大学

内容简介

本书作为研究生教学用书,简要介绍了细胞培养的基础理论,较详细地叙述了哺乳类动物细胞培养必需的用品器材、具体的操作步骤及操作提示等。

主要包括:细胞培养基本知识;细胞培养室的设置、设备和准备工作;细胞培养用液及培养基;二维及三维细胞培养技术(细胞原代培养、传代培养、细胞冻存与复苏、细胞系鉴定方法、三维细胞培养等);上皮细胞、干细胞等各类正常组织细胞的培养;肿瘤细胞培养、肿瘤药物敏感性试验、肿瘤放射敏感性试验、裸鼠移植瘤模型等各类肿瘤试验模型;细胞活力的检测、细胞凋亡检测、细胞遗传学及细胞形态学等细胞培养中的研究方法;细胞和细胞器的分离、细胞克隆形成及杂交瘤细胞制备等有关的实验技术;培养细胞的原位杂交、细胞的基因转移等有关的分子生物学实验技术;细胞检测相关的仪器分析技术(流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜、扫描电子电镜、透射电子电镜、原子力显微镜及活细胞工作站)。

本书可供生物学、医学等相关专业人员在科学实验中参考。

目 录

第 1 章 细胞培养基本知识	1
1.1 前 言	1
1.2 细胞培养简史、现状及发展趋势	1
1.3 细胞培养的优点和缺点	3
1.3.1 细胞培养的优点	3
1.3.2 细胞培养的缺点	3
1.4 细胞培养的应用范围和领域	4
1.4.1 细胞培养的应用范围	4
1.4.2 细胞培养的应用	4
1.5 培养细胞的特性	5
1.5.1 培养细胞的生长方式及类型	5
1.5.2 培养细胞的增殖特点	6
1.5.3 培养细胞的生长过程	8
1.6 培养细胞生长的条件	15
1.6.1 细胞的营养需要	15
1.6.2 细胞的生存环境	18
1.6.3 无污染及无毒	19
第 2 章 细胞培养室的设置、设备和准备工作	20
2.1 细胞培养实验室的设置及设备	20
2.1.1 细胞培养实验室的设置	20
2.1.2 细胞培养实验室的设备	21
2.2 培养用品的清洗和消毒灭菌	27
2.2.1 培养用品的清洗	27

2.2.2 培养用品的消毒灭菌	29
第3章 细胞培养用液及培养基(液)	33
3.1 培养用液	33
3.1.1 水	33
3.1.2 平衡盐溶液	33
3.1.3 消化液	35
3.2 培养基(液)	39
3.2.1 天然培养基	39
3.2.2 合成培养基(液)	41
第4章 细胞培养技术	51
4.1 基本操作技术和要求	51
4.1.1 细胞培养室内的无菌操作	51
4.1.2 培养细胞的取材	52
4.1.3 组织材料的分离	54
4.2 原代培养	57
4.2.1 组织块培养法	58
4.2.2 消化培养法	59
4.2.3 器官培养	59
4.3 传代培养和细胞系的维持	62
4.3.1 原代培养的首次传代	62
4.3.2 细胞传代方法	62
4.3.3 细胞系的维持	63
4.3.4 培养细胞的纯化	64
4.4 培养细胞生长状况的观察	66
4.4.1 培养细胞的常规观察	66
4.4.2 活细胞的观察	67
4.4.3 细胞生长状况的观察	69
4.5 细胞冻存与复苏	73
4.5.1 细胞的冻存	73
4.5.2 细胞的复苏	75
4.5.3 培养细胞的运输	75

4.6 细胞培养污染的检测和排除	76
4.6.1 微生物污染的途径	76
4.6.2 微生物污染对细胞的影响	76
4.6.3 微生物污染的检测	77
4.6.4 微生物污染的防治	79
4.6.5 细胞交叉污染	79
4.7 细胞系特征及细胞系间交叉污染的测定	80
4.7.1 同工酶	80
4.7.2 血型及主要组织相容性抗原的测定	80
4.7.3 G 显带技术	81
4.7.4 DNA 指纹分析	81
4.8 细胞系组织来源的鉴定	81
4.8.1 具有特征性标志的超微结构分析	81
4.8.2 免疫学试验测定细胞骨架蛋白	82
4.8.3 组织特异性抗原的鉴定	82
4.8.4 细胞特殊功能的生化检查方法	82
4.8.5 细胞来源及特征数据的计算机化	83
4.9 微囊化细胞培养	83
4.9.1 概 述	83
4.9.2 细胞微胶囊的制备材料	85
4.9.3 细胞微胶囊的制备方法	85
4.10 三维细胞培养技术	89
4.10.1 三维培养技术的概述	89
4.10.2 三维细胞培养技术的发展历史	89
4.10.3 三维细胞培养技术的分类	90
4.10.4 三维细胞培养中涉及的生物支架材料	92
4.10.5 生物反应器在三维培养中的作用	92
4.10.6 微载体系统在三维培养中的应用	93
4.11 细胞打印技术	94
4.11.1 细胞打印技术的分类	94
4.11.2 细胞打印技术的应用	95
第5章 正常组织细胞的培养	97
5.1 上皮细胞	97

5.1.1 表皮细胞	97
5.1.2 乳腺上皮细胞	100
5.1.3 子宫颈上皮细胞	101
5.1.4 口腔黏膜上皮细胞	103
5.1.5 胆管和胆囊上皮细胞	105
5.1.6 前列腺上皮细胞	106
5.1.7 肝细胞	107
5.1.8 胰腺细胞	110
5.1.9 肾上皮细胞	111
5.1.10 气管和肺泡上皮细胞	112
5.1.11 唾液腺上皮细胞	114
5.2 内皮细胞	115
5.3 神经外胚层细胞	116
5.3.1 神经元细胞	116
5.3.2 神经胶质细胞	117
5.3.3 黑色素细胞	118
5.4 中胚层细胞	119
5.4.1 结缔组织细胞	119
5.4.2 脂肪组织细胞	119
5.4.3 肌肉组织细胞	120
5.4.4 软骨细胞	121
5.4.5 骨细胞	122
5.4.6 成骨细胞	122
5.4.7 破骨细胞	125
5.4.8 巨噬细胞	127
5.4.9 牙周膜细胞	128
5.4.10 牙髓细胞	128
5.5 血细胞	129
5.5.1 前体血细胞骨髓培养法	129
5.5.2 脐血细胞培养	130
5.5.3 淋巴细胞培养	131
5.6 干细胞	132
5.6.1 胚胎干细胞	133

5.6.2 诱导性多能干细胞	142
5.6.3 造血干细胞	144
5.6.4 神经干细胞	146
5.6.5 骨髓间充质干细胞	147
5.6.6 脂肪源性干细胞	149
5.6.7 牙髓干细胞	150
第6章 肿瘤细胞培养及实验方法	152
6.1 肿瘤细胞的取材及培养	152
6.1.1 肿瘤细胞的取材方法	152
6.1.2 肿瘤细胞的培养方法	153
6.2 培养肿瘤细胞的生物学鉴定	154
6.2.1 培养肿瘤细胞常用的生物学检查项目	154
6.2.2 人的恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系(株)标准	154
6.3 抗癌药物敏感性试验	156
6.3.1 试验药物储备液的配制	156
6.3.2 受试细胞的准备	157
6.3.3 药物疗效的评价	157
6.3.4 药物敏感性试验	157
6.4 裸鼠移植瘤模型	161
6.4.1 概 述	161
6.4.2 制备裸鼠移植瘤动物模型的基本方法	162
6.5 肿瘤放射生物学实验	163
6.5.1 肿瘤放射生物学培养细胞实验	163
6.5.2 肿瘤放射生物学的实体瘤整体水平实验	167
6.6 肿瘤细胞体外黏附实验	168
6.6.1 肿瘤细胞在细胞外基质上黏附的测定	168
6.6.2 肿瘤细胞与内皮细胞黏附的测定	169
6.7 肿瘤细胞迁移实验	170
6.7.1 细胞划痕法	170
6.7.2 Millicell 小室测定法	171
6.8 肿瘤侵袭实验	171
6.8.1 体内癌细胞侵袭实验	171

6.8.2 体外癌细胞侵袭实验	173
6.9 肿瘤转移实验	176
6.10 肿瘤细胞分化诱导模型	177
6.10.1 体外分化诱导实验	177
6.10.2 体内分化诱导实验	179
6.11 肿瘤干细胞	179
6.11.1 肿瘤干细胞的特性	180
6.11.2 肿瘤干细胞的分离培养	180
6.12 纳秒脉冲电场治疗肿瘤实验	182
第7章 细胞培养中的研究方法	184
7.1 细胞活力的检测方法	184
7.1.1 染料排除法	184
7.1.2 克隆(集落)形成试验	185
7.1.3 MTT 比色试验	187
7.1.4 XTT 比色试验	189
7.1.5 三磷酸腺苷发光试验	190
7.1.6 细胞蛋白质含量测定法	191
7.1.7 细胞蛋白质合成测定法	192
7.2 细胞遗传学的检测方法	192
7.2.1 细胞 DNA 染色法	192
7.2.2 细胞 DNA 含量测定法	193
7.2.3 细胞 DNA 合成测定法	194
7.2.4 常用染色体显示法	195
7.2.5 染色体显带法	196
7.3 细胞形态学的研究方法	197
7.3.1 培养细胞的 HE 染色方法	197
7.3.2 培养细胞的免疫细胞化学染色技术	198
7.3.3 培养细胞嗜银蛋白(AgNORs)分析	201
7.3.4 培养细胞的化学染色	202
7.4 细胞凋亡的检测方法	203
7.4.1 形态学方法	203
7.4.2 电泳法	205

7.4.3 原位缺口末端标记法	205
7.4.4 流式细胞术测定法	206
7.4.5 免疫学方法	207
7.5 端粒酶活性的检测方法	208
7.5.1 端粒重复序列扩增-银染法	208
7.5.2 TRAP-ELISA 法	210
7.6 明胶酶活性的测定方法	211
7.7 细胞同步化	213
7.7.1 M 期同步化方法(振荡收集法)	213
7.7.2 S 期同步化方法(胸腺嘧啶核苷双阻断法)	214
第 8 章 有关的部分实验技术	217
8.1 细胞分离技术	217
8.1.1 速度沉降分离法	217
8.1.2 等密度沉降分离法	218
8.1.3 流式细胞仪分离法	221
8.1.4 免疫磁珠分离法	221
8.2 细胞器分离技术	223
8.2.1 破碎细胞的方法	223
8.2.2 部分细胞器的分离法	224
8.3 细胞克隆技术	230
8.3.1 有限稀释法	231
8.3.2 平皿克隆分离法	231
8.3.3 软琼脂克隆分离法	232
8.3.4 单细胞显微操作法	232
8.4 杂交瘤技术	233
8.4.1 杂交瘤技术的基本原理	233
8.4.2 杂交瘤技术的主要用品	235
8.4.3 骨髓瘤(浆细胞瘤)突变缺陷细胞株的选择与传代培养	236
8.4.4 免疫脾细胞的制备	236
8.4.5 饲养细胞的制备	237
8.4.6 细胞融合	237
8.4.7 单克隆抗体的检测	238

8.4.8 克隆化培养	238
8.4.9 单克隆抗体的大量制备	239
8.4.10 杂交瘤细胞染色体的鉴定	239
8.4.11 单克隆抗体的鉴定	239
第9章 相关的部分分子生物学技术	240
9.1 培养细胞基因组 DNA 的提取及分析	240
9.1.1 培养细胞基因组 DNA 的提取	240
9.1.2 DNA 鉴定	241
9.1.3 Southern blot	242
9.2 培养细胞总 RNA 的提取及分析	245
9.2.1 培养细胞总 RNA 的提取	245
9.2.2 RNA 鉴定	246
9.2.3 Northern blot	247
9.2.4 RT-PCR	248
9.3 培养细胞的原位杂交	249
9.4 探针标记	250
9.4.1 DNA 缺口翻译标记	250
9.4.2 末端标记	251
9.4.3 随机引物 DNA 标记	252
9.4.4 RNA 探针标记	252
9.4.5 地高辛标记 RNA	253
9.5 Western blot	253
9.6 基因转染	256
9.6.1 磷酸钙共沉淀法	256
9.6.2 脂质体转染法	257
9.6.3 反转录病毒 DNA 转染法	258
第10章 培养细胞检测有关的分析仪器	260
10.1 流式细胞仪	260
10.1.1 概 述	260
10.1.2 结构原理	260
10.1.3 细胞样品准备	261

10.1.4 仪器操作步骤	263
10.1.5 操作和使用中的注意事项	263
10.1.6 FCM 应用范围	263
10.2 激光扫描共聚焦显微镜	264
10.2.1 概 述	264
10.2.2 结构原理	264
10.2.3 样品准备	264
10.2.4 仪器操作步骤	264
10.2.5 CLSM 应用范围	265
10.3 扫描电子显微镜	266
10.3.1 概 述	266
10.3.2 结构原理	266
10.3.3 培养细胞的样品制备	266
10.3.4 仪器操作步骤	267
10.3.5 仪器操作注意事项	268
10.3.6 SEM 应用范围	268
10.4 透射电子显微镜	268
10.4.1 概 述	268
10.4.2 结构原理	268
10.4.3 培养细胞的样品准备	268
10.4.4 仪器操作步骤	270
10.4.5 TEM 应用范围	271
10.5 原子力显微镜	271
10.5.1 概 述	271
10.5.2 结构原理	271
10.5.3 样品准备	271
10.5.4 仪器操作步骤	271
10.5.5 AFM 应用范围	272
10.6 活细胞工作站	273
10.6.1 概 述	273
10.6.2 结构原理	273
10.6.3 仪器操作步骤	274
10.6.4 LCIS 应用范围	274



附录 I	细胞系或株的查询网址	275
附录 II	细胞培养常用名词解释	276
附录 III	细胞培养中常用术语的译名	286
附录 IV	细胞培养常用的溶液	296
附录 V	离心速度和离心力的换算	300
参考文献	301

第1章

细胞培养基本知识

1.1 前言

细胞或组织培养现已广泛应用于生物学、医学各个领域，成为细胞与组织研究的重要技术之一。组织细胞培养泛指从动物活体内取出组织，在模拟体内生理环境等特定的体外条件下，进行孵育培养，使之生存并增殖。若以培养物而言，可分为组织培养、细胞培养和器官培养。组织培养指把活体的一小块组织置于底物上孵育，细胞从组织块边缘游出并增殖。细胞培养是把取得的组织用机械或消化的方法分散成单个细胞悬液，然后进行培养，使其存活和增殖。这些培养物的主要成分均属细胞，而这些细胞在体外增殖时，仍然是相互依存、互相影响的。因此，细胞培养与组织培养实际上区别不大，本书将细胞培养与组织培养以相同的含义使用。此外，体外培养中尚有一种培养物，系将活体中器官或一部分器官取出，置于体外生存、生长并同时保持其一定的结构和功能

特征，称为器官培养，以与一般的细胞培养相区别。

1.2 细胞培养简史、现状及发展趋势

动物组织培养 (tissue culture) 最初可追溯到 19 世纪末，1885 年，Wilhelm Roux 将鸡胚髓板置于温盐水中存活数日，被认为是第一个进行动物组织培养的人。1907 年，美国生物学家 Harrison 为研究神经纤维的起源问题，将从蝌蚪的脊索中分离出的神经组织，放在青蛙的淋巴液中培养，组织成功存活了数周并长出了神经纤维，开创了动物组织培养的先河，被公认为动物组织培养开始的标志。而他使用的悬滴培养法 (suspension culture) 一直沿用至今。1912 年，Carrel 在实验中引入了无菌操作技术，并完善了经典的悬滴培养法，在不使用抗生素的情况下将鸡胚心脏细胞在人工培养条件下培养存活了 34 年，

期间进行了3 400次的传代。他的工作成果充分印证了组织在体外条件下增殖和生长的可能,动物组织培养可以成为研究组织和细胞的有效手段。1923年,Carrel创立了卡氏瓶培养法,使用这种方法可以随时更换培养液,使组织能够不断生长,又可以使用不同的培养液培养不同的细胞,极大地推动了当时组织培养研究。Harrison和Carrel的卓越贡献极大地推动了生物工程的发展,细胞培养技术成为生物及细胞领域极为重要的基础技术。

组织细胞培养最初是使用未离散的组织小块作为对象,组织的生长也仅仅局限于从组织中迁移出的细胞,这种培养细胞的方法一直沿用了50多年。在此期间,经过无数科学家的探索和努力,动物组织培养逐渐转变为动物细胞培养(cell culture)。所谓动物细胞培养,指的是离散的动物活细胞在体外人工条件下的生长、增殖过程,在此过程中细胞不再形成组织。1916年,Rous和Jonee首次使用胰蛋白酶将离体细胞分散开来。继卡氏瓶培养法之后,Earle改良了该方法,使得细胞能够直接生长于玻璃瓶壁上,并成功维持了正常细胞和肿瘤细胞株的生长,培养瓶培养细胞的方法在随后的研究中得到了广泛应用。1948年,Sanford等成功从小鼠L细胞中克隆出最早的细胞株L929。1949年,Hanks设计了Hanks盐溶液。1952年,Dulbecco等采用胰蛋白酶消化法获取了单个细胞进行悬液培养,并使用单层细胞培养建立了多个细胞系,开创了细胞培养方法。此后,胰蛋白酶在细胞传代中得到了广泛的应用。同时,化学合成培养基逐渐代替天然培养基,Parker、Eagle等分别设计了不同成分的培养基应用于不同细胞的培养,直到60年代,Ham发明了无血清

培养基。基于当时的细胞培养技术,1952年,Gey等成功建立了首个人类细胞系——Hela细胞系(子宫颈癌)。1961年,Hayflick首次建立了25种人类二倍体细胞系,开辟了细胞培养技术新的应用方向。

自20世纪中叶起,组织细胞培养技术的应用进入了一个繁盛的阶段,在医学、药学、生物学等领域得到了广泛应用,极大地推动了人类科学技术的发展。1964年,Wiktor等使用WI-38人肺成纤维细胞生产狂犬病疫苗。1965年,Harris和Watkins成功培养出人-小鼠杂种细胞。1976年,Illmensee和Milstein发现了胚胎干细胞的全能性。20世纪80年代,通过细胞培养,基因表达的调控以及癌基因的转变得到了深入的探索。20世纪90年代,利用体外细胞培养形成了大规模工业化生物制药的生产。进入21世纪,人类基因组计划提上日程,基因组学、蛋白质组学以及组织工程等新兴前沿分支的探索正如火如荼地进行,通过支架材料发展细胞3D化培养成为近年来火热的研究方向。

细胞培养作为生物工程、细胞工程的基本技术已经渗透到人类生活的许多领域,取得了许多具有开发性的研究成果,收到了明显的经济和社会效益。随着生物技术在新世纪中的地位不断提高,它的前景和产生的影响将会逐渐显现出来。目前组织细胞培养正朝着规模化、自动化、低成本、高目的产品产量的方向发展,如开发特定产物表达的特异性细胞系、研制新型无血清培养基、设计大规模生物反应器等。伴随着近年来试管动物、转基因动物、器官移植再生、新型生物药剂等的不断出现,细胞培养技术在基因、肿瘤、免疫、药物、生殖等多个方面将获得更加广