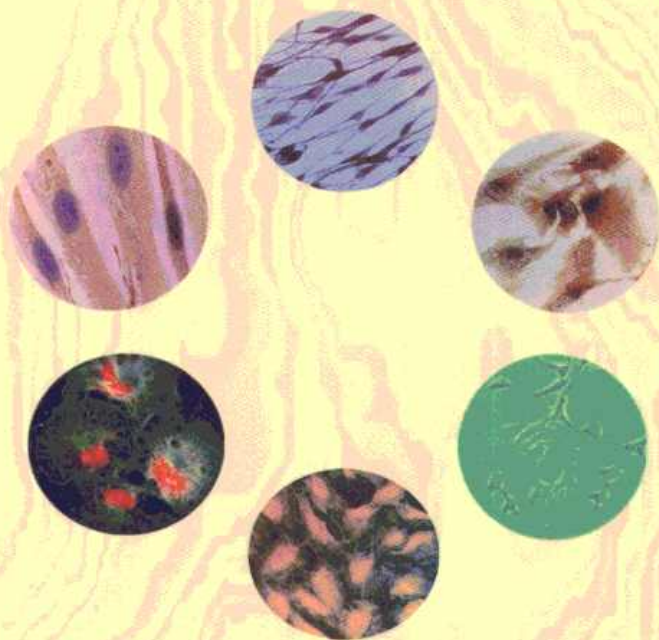


TECHNIQUES FOR ANIMAL CELL CULTURE

动物细胞培养技术

程宝鸾 主编



6

华南理工大学出版社

02436
C54

动物细胞培养技术

TECHNIQUES FOR ANIMAL CELL CULTURE

主编 程宝鸾

主审 孙俊

编者 (按姓氏笔画)

孙俊 李敏 吴文言

贾志敏 程宝鸾

摄影 柯志勇

绘图 蔡丽蓉

华南理工大学出版社

·广州·

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞培养技术/程宝鸾主编.—广州：华南理工大学出版社，2000.3

ISBN 7-5623-1508-6

I. 动…

II. 程…

III. 细胞培养：组织培养

IV. Q 343.6

华南理工大学出版社出版发行

(广州五山 邮编 510640)

责任编辑：张 颖

前 言

细胞培养是一门实验科学，它涉及的基础理论较广。但是从应用角度来说，仍是一种方法和技术，已广泛应用于基因工程、遗传工程、细胞工程等生命科学的各个研究领域。作者通过 15 年的教学实践，结合细胞培养的研究工作，在内部使用教材的基础上作进一步的充实与提高，编写了本书。

全书分四篇，共 16 个实验，其中前二篇是入门实验，讲习比例为 1:3，共 40 学时，主要训练学生掌握细胞培养的基本技能和操作要领。内容包括：实验器材准备，实验试剂配制，实验仪器使用和保养，细胞原代培养、传代培养、盖玻片培养，培养细胞观察和生物学检测方法，细胞染色制片技术，细胞冷冻、复苏和运输技术；后两篇是细胞培养的研究实验，内容包括：原代细胞分离纯化技术，细胞克隆技术，细胞形态学研究方法，细胞遗传学研究方法，恶性肿瘤细胞侵袭实验，黑白、相差、荧光显微镜摄影技术。实验方法立足于初学者的专业基础和一般实验室的条件，兼顾当前细胞培养的研究进展，将实验技能、理论基础和科学研究三者融为一体。本书实用性强，适合高等医学、药学院校及生物学相关专业硕士研究生使用，对基础和临床医学工作者亦具有参考价值。

细胞培养技术发展迅速，鉴于笔者业务水平和实践经验有限，书中难免存在缺点和错误，殷切希望读者批评指正。

在本书的撰写和试用过程中，得到第一军医大学各级领导的关心与支持，特此表示感谢。

程宝鸾

于第一军医大学
1999年9月

细胞培养概述

一、组织培养发展简史

1907年，美国生物学家 Harrison 采用单盖片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法，以淋巴液为培养基，观察了蛙胚神经细胞突起的生长过程，首创了体外组织培养法，见图 0-1。

Burrows 于 1910 年观察到在血浆凝块上培养的心肌组织块的搏动，1912 年又观察到单个心肌细胞的搏动，这是当时对心脏搏动肌原性理论的直接证明。同年，Carrel 用外科无菌操作方法，将 7 天鸡胚心肌组织块培养在血浆和鸡胚提取液的混合物内，观察到心肌细胞搏动达 104 天，并将原代细胞进行了长期传代培养。Carrel 于 1939 年退休后，Ebeling 继续这项工作，一直到 1964 年。就这样，心肌细胞培养工作维持了 34 年。但这样长期培养的细胞系(株)是不能搏动的心肌成纤维细胞，它是从心脏细胞逆分化而来，还是从最初混入的成纤维细胞或血管内皮细胞而来？也有人怀疑是他们经常加入新鲜胚胎浸出物时带入的新细胞。1925 年，Maximow 将单盖片悬滴培养法改良为双盖片培养法。二者相比，后者传代方便，又减少污染。虽然悬滴培养法操作简便，但细胞生长空间狭小，气体不足，培养基少，细胞易老化，即使短时间生长也需经常更换培养基，因而易污染。另外，悬滴培养法所使用的凹玻璃可引起折光，不宜进行显微镜观察和摄影。1923 年，Carrel 设计了卡氏瓶培养法，扩大了组织细胞的生存空间，且换液传代方便，减少了污染机会。以 Carrel 和 Harri-

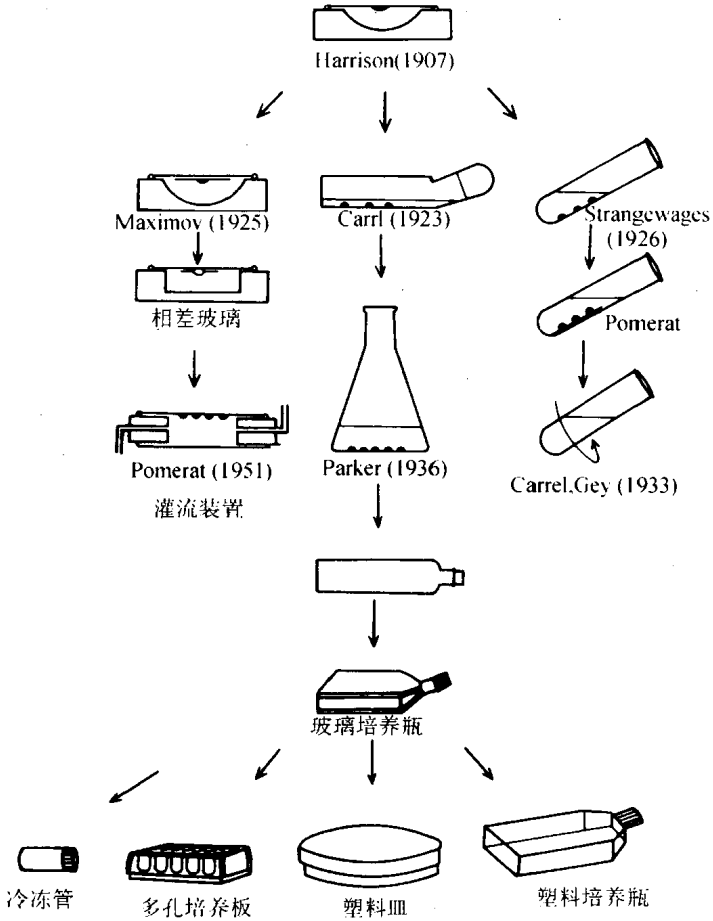


图 0-1 组织培养发展示意图

son 为首的科学家们用卡氏瓶培养各种组织细胞，发表了大量论文，为组织培养的发展奠定了基础。在卡氏瓶培养法的启发下，继而又出现了各类型培养瓶、培养皿、试管、多孔培养板的培养法。

在培养器材更新的同时，培养方法的改进也十分迅速。1951年，Pomerat 将双盖玻片悬滴培养法与灌流小室培养技术相结合，使细胞生活在不断更新的培养液中，便于显微摄影。以后又有人创立旋转鼓、旋转支架等培养方法，使组织和细胞交替地与培养液和空气接触，便于细胞代谢研究。1955～1957年，Sanford 和 Dulbecco 等发明了用胰蛋白酶消化分离组织细胞的方法，建立了单层细胞培养技术。之后，一些细胞遗传性状相同的细胞系和细胞株相继建立，正常组织原代细胞培养研究更加深入，大大促进了组织培养技术的发展。

细胞培养液的研究也随着组织培养技术的改进而不断发展，早期细胞培养采用天然培养基(胎汁、血浆和血清)。天然培养基成分虽接近体内状态，但其组成复杂，是成分不明确的混合物，因而会影响对某些实验产物的提取和实验结果的分析。1951年，Eagle 开发了能促进动物细胞体外培养的人工合成培养基。人工合成培养基的出现又促进了细胞培养技术的发展和應用。目前，绝大多数人工合成培养基使用时还需添加血清。随着单克隆抗体制备、细胞生长因子和细胞分泌产物的研究，又开发了无血清细胞培养基研究技术。1975年，Sato 等用激素、生长因子替代血清，使垂体细胞株培养获得成功。近 20 多年来，已有几十种细胞株在无血清培养基中生长和繁殖。目前，正常组织肝细胞和胰腺细胞等无血清培养的治疗研究也正在探索之中。

细胞培养技术已成为当今生命科学各研究领域的基础技术和基本技能，它又是细胞工程、基因工程和生物医学工程的重要研究手段。肿瘤、感染、创伤和器官移植等问题的研究，也都与细胞培养技术相关。因此，学习细胞培养技术方法及操作要领，是生命科学工作者必备的知识 and 技能。

二、细胞培养的基本概念

细胞培养是用酶消化法将组织碎块分离成单个细胞，用培养基制成细胞悬液，在体外适宜条件下，使细胞生长繁殖，并保留其一定的结构和功能特性。细胞培养与组织培养、器官培养主要不同点在于原始培养的对象不同。细胞培养使用的是单个细胞悬液，组织培养使用的是组织块(0.5 ~ 1 立方毫米)或薄片(厚 0.2 毫米)，而器官培养使用的是器官原基或器官的一部分或整个器官。在组织培养中，细胞自组织块周围移出并生长，细胞在生长过程中总有移动(运动)或其它变动，这样就使被培养的组织难以长期维持其原有的结构和功能。培养时间越长，发生变化的可能性越大，结果常使单一类型的细胞保存下来，最终成了细胞培养。在细胞培养中，细胞生命活动和体内细胞一样，仍然是相互依存的，呈现一定的组织特异性，所以组织培养和细胞培养实际上无严格区别。

细胞培养技术是生命科学中常用的研究手段，该方法能排除神经体液因素的影响及肝、肾解毒功能的干扰，观察某些因素或药物对培养细胞的直接作用。通过实验可获得某一类型细胞的纯培养。如心肌组织中心肌细胞约占 50%，非心肌细胞占 50%；而经纯化分离的心肌细胞悬液中，心肌细胞可达 95% 以上，这样，心肌细胞原代培养实验基本不受其它细胞的干扰。在细胞培养实验中能直接观察到培养细胞生命活动的动态过程；用定时显微摄影记录可发现一些肉眼观察不到的生命现象；还可利用电镜手段、同位素标记、放免法和免疫组化法等来研究细胞形态结构及细胞内化学物质的分布。此外，还能节约研究费用。如在某些研究中，用 100 只动物做实验所获得结论与用 100 张盖玻片或几十个培养瓶而获得结论具有相同的统计学意义，而细胞培养较之大批量的动物饲养花费要小。

但细胞培养方法也存在不足之处：培养细胞失去体内细胞的制约和整体的调节作用，细胞形态和功能会发生一定程度的改变。培养方法、实验试剂对细胞形态和功能有一定的影响，如胰蛋白酶可破坏细胞表面受体、酶、抗原等。长期体外培养的细胞，由于反复传代、冻存和操作等因素的影响，可能发生染色体非整倍体改变，呈永生化或癌变的特征。

三、细胞培养实验的基本要求

1. 实验前准备

实验前必须分门别类地制定操作卡片，如清洗卡、消毒卡，细胞常用液(细胞培养液、BSS液、消化液)配制卡，牛血清检测分装卡，细胞原代、传代操作卡等。各卡片上注明实验所需器材的名称、规格、数量、操作要领和实验注意事项等。实验前应按卡片收集、清点所需用品，一并放入超净台内，这样可避免操作时因物品不全不得不再拿取所造成的污染。同时，根据每个实验的要求，准备好瓶管支架、器械消毒盒等。实验器材准备数要大于实际使用数，瓶盖数要大于瓶数。这样才能有条不紊地做实验，也减少了忙乱操作引起的污染。

2. 无菌室和操作野消毒

无菌室内每周用乳酸蒸汽(或过氧乙酸)加紫外线消毒1~2次。实验前，将实验器材放入超净台内，打开超净台紫外线灭菌灯，同时起动超净台风机，40分钟后消毒完毕，关闭紫外线灯。这样，净化台内空气和台面构成无菌环境。

3. 无菌操作要求

(1)手指不能触及器材使用端，如触及需更换或烧灼后再使用(如瓶口)。

(2)减少手与器材的接触面积，学会手指操作。

(3)一切操作，如打开或封闭瓶口、安装吸管、注射器等，

都要在火焰周围进行，瓶口、吸管、注射器等要经过火焰消毒。

(4)瓶口要顺风斜放在支架上。试剂使用后应立即封闭瓶口，若长时间敞口，会增加落菌的机会。

(5)细胞培养各用液要专管专用，并要勤换吸管，防止扩大污染和交叉污染。

(6)瓶口液滴不能再进入瓶内，要用干酒精棉球擦拭，瓶口要经火焰消毒。

(7)操作者动作要准确敏捷，尽量避免空气流动。

4. 实验中的操作要求

洗手、着装与外科临床要求相同。双手用肥皂洗净后，浸泡于消毒液中，并用75%酒精擦拭。细胞培养用液从冰箱取出，试剂瓶外壁经酒精纱布擦洗后入台。废液缸置工作台右后位，酒精纱布缸置台左侧位，酒精灯置中央位。拆除大包装，点燃酒精灯(95%酒精)，火焰无色或微黄色表示酒精杂质少，燃烧完全(若用废酒精，燃烧时产生的化学物质易附着到吸管或其它瓶皿上，带入培养液中会伤害细胞)。浸泡在75%酒精中的金属器械用台面消毒镊子取出，在无菌干纱布上擦拭后，迅速从火焰上通过(器械不能在火焰中灼烧过长时间)，冷却后使用，避免烫伤细胞。用于吸取细胞培养液、牛血清、酶液的吸管使用后不能在火焰上消毒，因为残留在吸管中的培养液烧焦碳化，再使用时会把有害碳化物带入培养液中中毒害细胞。操作中手指污染时，可用酒精纱布或棉球擦拭。在实验过程中，不要面向操作野讲话或咳嗽，避免唾沫把微生物带入净化台内，污染空气。实验者离开工作台时，立即用肘关节关闭侧窗口，避免无菌室内细菌随空气流入净化操作区。

5. 实验后要求

实验完毕，关闭超净台风机和电源，未使用器材放入饭盒

内，用过的玻璃器材投入清水中浸泡，包装纸叠卷，绳成束分类归放，最后用酒精纱布或棉球擦拭工作台面。

教学组织与教学方法

- 一、讲课
- 二、个人阅读

程宝鸾 吴文言

第一篇 实验准备

实验一 实验器材的清洗、包装和消毒

实验目的

- (1)掌握细胞培养常用实验器材(玻璃器皿、橡胶制品、正负压除菌滤器、塑料制品)的清洗要领、清洗步骤和注意事项。
- (2)掌握细胞培养常用器材的包装要领和要求。
- (3)了解灭菌方法,掌握高压湿热灭菌方法及操作注意事项。
- (4)掌握正、负压除菌滤器的安装、使用和拆除方法及操作注意事项。

实验用品

1. 各组包装物品

吸管筒 1 个、吸管 25 支、5 毫升注射器 2 个、3.5 厘米培养皿 2 个、10 厘米培养皿 1 个、盖玻片条(飞片)5 片、磁棒 1 个、青霉素瓶 25 个、10 毫升瓶 2 个、100 毫升盐水瓶 1 个、25 毫升培养瓶 6 个、盐水瓶塞 3 个、疫苗塞 25 个、离心管 6 个、纱布 5

块、饭盒 2 个、眼科镊子 2 个、竹签 15 支、硫酸纸 5 张。

2. 公用物品

家用剪刀、棉绳、棉花、牛皮纸、记号笔。

实验内容

一、常用的实验器材

玻璃器皿 细胞培养所用的玻璃器皿应由透明度好、无毒的中性硬质玻璃制成。常用的有以下几种：国产螺旋口培养瓶[有 12.5 毫升，25 毫升，100 毫升等规格，国外培养瓶常以底面积(平方厘米)表示]；培养皿(直径有 3.5 厘米，6 厘米，9 厘米，10 厘米等规格)；离心管(5 毫升，10 毫升)；注射器(1 毫升，5 毫升等)；用生理盐水瓶代替的贮存瓶(100 毫升，250 毫升，500 毫升)；青霉素瓶(5 毫升)；西力辛瓶(10 毫升)；其它还有尖吸管和移液管，载玻片(厚度 0.8 ~ 1.2 毫米)，盖玻片(厚度 0.12 毫米)，贮存尖吸筒用的玻璃筒或金属筒，漏斗，烧杯，量筒，贮蒸馏水瓶，冷冻管(1.5 毫升，2 毫升)等。

塑料品 多孔培养板规格有 4、6、12、24、96 孔等，培养皿直径有 3 厘米、6 厘米、10 厘米等。塑料品经消毒灭菌密封包装，供一次性使用，重复使用的需经特殊方法清洗消毒。塑料器材厚薄均匀，有的表面经特殊处理，细胞易于生长。

器械 解剖刀、眼科剪和镊(直头和弯头)、中号圆头镊、止血钳等。

杂用品 金属饭盒、试管架、各种规格胶塞、记号笔、搪瓷盘、吸头(吸取液体的胶帽)、酒精灯、酒精、碘酒棉球瓶、火柴等。

组织培养中使用最多的是吸管、培养瓶、培养皿及各种瓶

塞。实验者手中应有三套器材，瓶塞数要大于瓶数，才能保证实验中的循环使用。

二、清洗

清洗的目的是清除杂质，不残留影响细胞生长的成分，如解体的微生物、细胞残迹以及其它化学成分。

1. 常用玻璃器皿清洗

(1) 清洗要领。

浸泡 初次使用的玻璃器皿呈碱性，表面常附有灰尘和一些对细胞有毒的物质，如铝和砷等。空气湿度高时，玻璃器皿表面又易长霉。使用前，新器皿浸泡在 5% 稀盐酸中过夜，以中和玻璃表面的碱性物质并去除霉斑；然后经简单刷洗，流水冲洗（逐片进行），蒸馏水浸泡，干燥备用。新玻片处理后，短时间不用时，需将它投入 95% 的酒精中保存，以防玻片长霉。培养后的玻璃器皿应立即投入清水中浸泡，器皿中残留的细胞、蛋白质一旦干涸，即固着于玻璃表面，极难脱落。

刷洗 用过的玻璃器材经自来水冲洗后，浸入水中煮沸，然后将适量洗涤剂（洗洁精或洗衣粉）投入沸水中继续煮沸 10 分钟，趁热刷洗器皿内外，刷洗后浸入清水中进行冲洗。

酸泡 刷洗好的玻璃器材干燥后置清洁液中浸泡 24 小时，清洁液的强氧化作用可清除刷洗不掉的极微量杂质。

(2) 清洗步骤。玻璃器材煮沸 10 分钟 → 刷洗 → 流水振荡冲洗 15 ~ 20 遍 → 50℃ 烤干 → 清洁液浸泡 24 小时 → 流水振荡后冲洗 15 ~ 20 遍 → 滴水 → 蒸馏水浸泡 2 次（每次 24 小时） → 50℃ 烤干，待包装。

(3) 清洗注意事项和要求。

- ① 使用后的实验器材应立即投入清水中。
- ② 浸泡、煮沸、酸泡的器皿内要充满液体，不得有气泡。
- ③ 刷洗、酸泡后的器材要用流水振荡冲洗，不得残留洗涤

剂、清洁液。方法是：每瓶灌 2/3 容积的自来水，振荡后倒掉，重复 15 ~ 20 次(尖滴管置量杯中冲洗)。

④煮沸前的水面要高于器材 5 厘米，水沸后投入洗涤剂(直径 35 厘米的铝锅，用洗衣粉 10 克左右)。若洗涤剂和实验器材同时从冷水煮至沸腾或使用过量洗剂，均易腐蚀玻璃表面，使玻璃碱化，pH 值上升。

⑤软毛刷的刷端已掉毛的应该弃去，否则会损害玻璃。玻璃划痕处易残留洗涤剂，会改变培养液 pH 值和毒害细胞。

⑥清洁物品应及时包装消毒，应注意妥善保存，防止落入灰尘、蟑螂、蚂蚁等引起二次污染。

⑦使用后的胶塞与玻璃器材同时煮洗时，胶塞要放在煮锅的底部。

⑧浸泡器材的蒸馏水容器要专用，并做好标记，如“蒸馏水 I 盆”、“蒸馏水 II 盆”。

⑨器材清洗干燥后，在以后各步操作时，手指不可接触器材的使用端。清洗者可戴一次性薄膜手套进行操作，省时又保证清洗质量。

⑩用超声波仪清洗器材时，清洗要求同上。

2. 橡胶制品的清洗

新购置的橡胶制品(胶塞、胶管、橡皮乳头)的洗涤方法如下：0.5 摩尔/升 NaOH 煮沸 15 分钟→流水冲洗→0.5 摩尔/升 HCl 煮沸 15 分钟→流水冲洗→自来水煮沸 2 次→蒸馏水煮沸 20 分钟→50℃烤干备用。这样处理可完全除净胶塞上的硫磺等有毒物质。用过的胶塞，其清洗方法、要求基本同玻璃器材。因胶塞使用面常沾有洗涤剂，流水冲不净，故胶塞洗刷的重点部位是胶塞使用面，用刷逐个刷洗。在使用过程中，胶塞不能与培养液接触，以防未洗净的胶塞污染培养液和细胞。

3. G₆ 除菌滤器的清洗

新 G₆ 除菌滤器置玻璃洗液中浸泡 24 小时，流水缓慢冲洗，

至 pH 值为 5.5 左右, 然后用 4 倍的蒸馏水缓慢冲洗, 再用重蒸馏水缓慢冲洗, 烤干, 包装消毒备用。用过的 G₆ 除菌漏斗立即浸泡水中(注意: 滤器千万不能干涸)过夜, 流水缓慢冲洗 24 小时或更长时间, 至滤面基本疏通时, 50℃ 烤干, 滤器再置清洁液中浸泡 24 小时, 或装满清洁液自然过滤。流水冲洗及其后的处理同新 G₆ 除菌滤器。

4. 正压除菌滤器的清洗

新的或使用后的正压滤器经稀洗涤剂刷洗→流水冲洗 15 分钟→滴水→去离子水浸泡 24 小时→三蒸水浸泡 24 小时→干燥备用。

5. 塑料制品的清洗

塑料制品质地软且耐腐蚀能力强, 但不耐热, 易出现划痕。其清洗程序为: 器皿用后立即用流水冲洗→浸于自来水中过夜→用纱布、棉签和 50℃ 稀洗液刷洗→流水冲洗(人工冲洗 15~20 遍)→晾干→浸于清洁液中 15 分钟→流水冲洗→蒸馏水浸泡两次(每次 24 小时)→晾干备用。

6. 清洗液的配制

清洁液 表 1-1 所示为常用的三种强度的清洁液。新配制的清洁液为棕红色, 遇有机溶剂或水分增多时变成绿色, 表明失效。

表 1-1 清洁液的配制

组成 强度	重铬酸钾(克)	浓硫酸(毫升)	蒸馏水(毫升)
弱液	100	100	1000
次强液	120	200	1000
强液	63	1000	200

先在搪瓷盆中加入蒸馏水, 加热溶解重铬酸钾, 再将盆置流