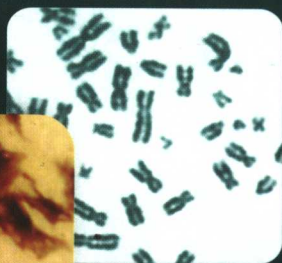
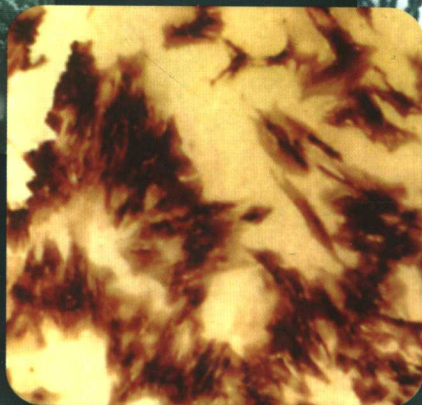
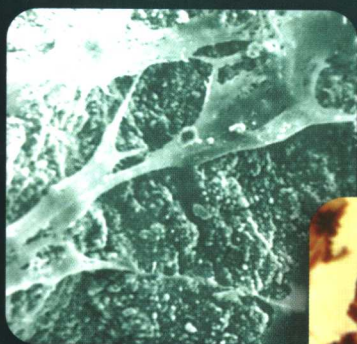


XIBAO
GONGCHENG



细胞工程

杨吉成 主编



化学工业出版社

XIBAO
GONGCHENG



细胞工程

杨吉成 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书共分三篇。第一篇为细胞培养的基本技术,系统地介绍了人和动物(包括昆虫、鱼、鳖、鸡和鼠等)各种组织来源的原代细胞培养和传代细胞培养技术,着重介绍了人和动物正常细胞、干细胞、肿瘤细胞的培养方法,包括细胞系(株)的建立及其克隆技术,细胞的保存和运输,细胞的形态和生长特性的观测等;第二篇为细胞工程的常用专门技术,专题介绍了细胞染色体制作和分带及其荧光原位杂交,细胞的转化和凋亡,细胞毒和药物敏感试验,细胞融合和单克隆抗体制备及生产工艺,细胞因子诱导和检测,细胞的病毒分离、检测和疫苗生产工艺,细胞DNA、RNA的分离和鉴定,细胞的基因导入等专门技术;第三篇为细胞工程生产应用技术,详细地介绍了人和动物细胞的大量培养和生产方法,最后还略叙了细胞培养和细胞工程在医学、生物技术、生物制药的科学实验和生产实践中的应用。

本书技术性强、特色明显,适用于生物及医学专业尤其是细胞生物学专业的师生学习,也适于生物及医学研究人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/杨吉成主编. —北京:化学工业出版社, 2007.10
ISBN 978-7-122-01295-1

I. 细… II. 杨… III. 细胞工程 IV. Q813

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第155269号

责任编辑:丁尚林
责任校对:周梦华

文字编辑:韩 墨
装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷:北京云浩印刷有限责任公司

装 订:三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张25½ 彩插4 字数627千字 2008年1月北京第1版第1次印刷

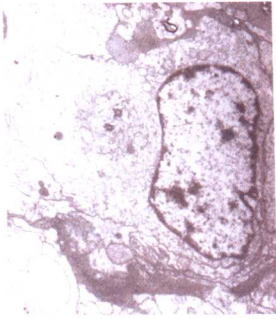
购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

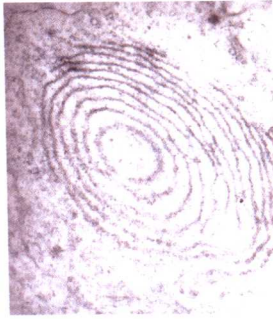
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:55.00元

版权所有 违者必究



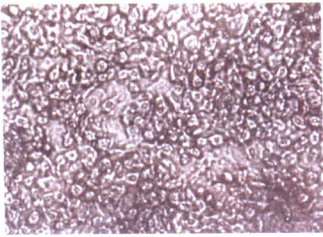
照片 1



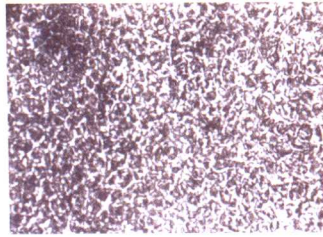
照片 2



照片 3



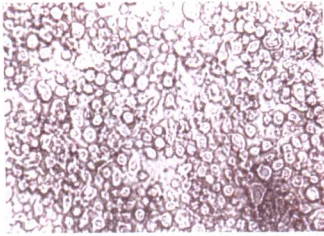
照片 4



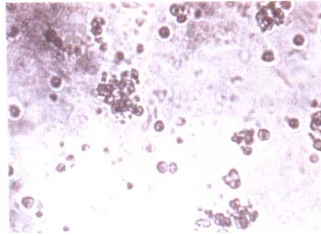
照片 5



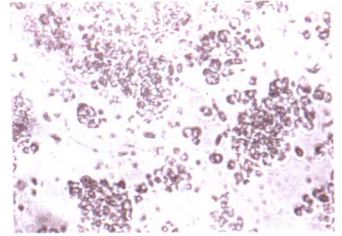
照片 6



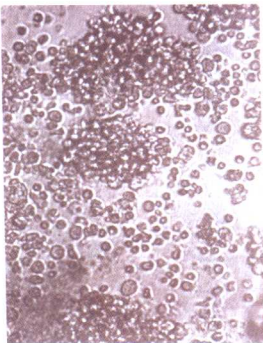
照片 7



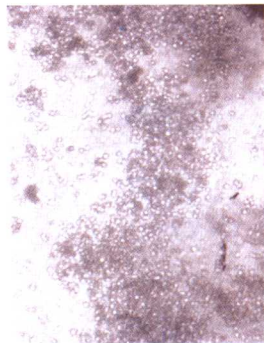
照片 8



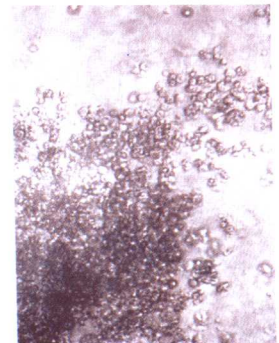
照片 9



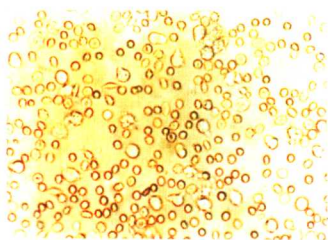
照片 10



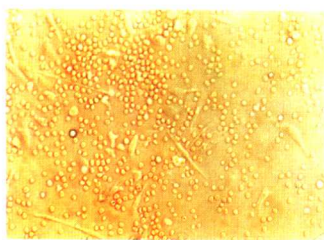
照片 11



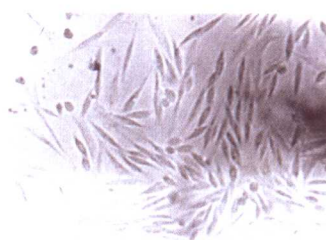
照片 12



照片 13



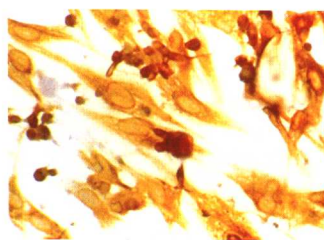
照片 14



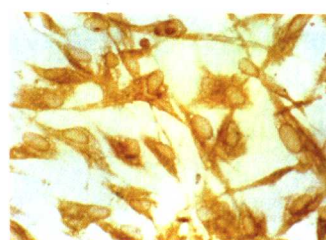
照片 15



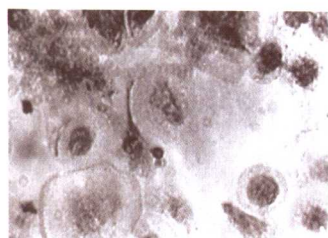
照片 16



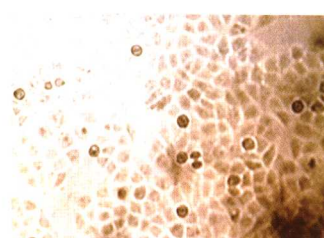
照片 17



照片 18



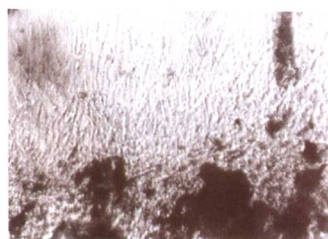
照片 19



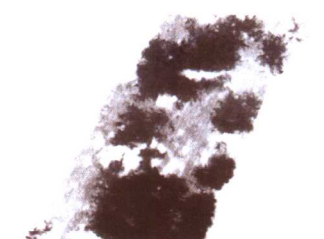
照片 20



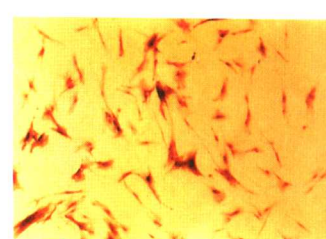
照片 21



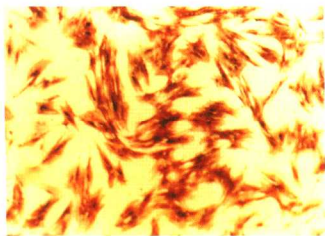
照片 22



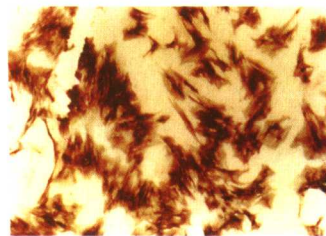
照片 23



照片 24



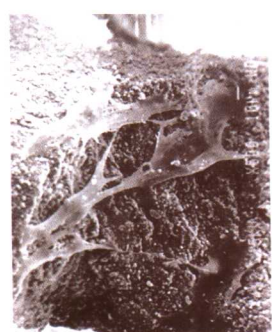
照片 25



照片 26



照片 27



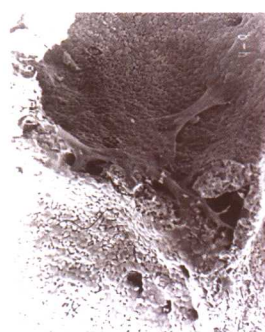
照片 28



照片 29



照片 30



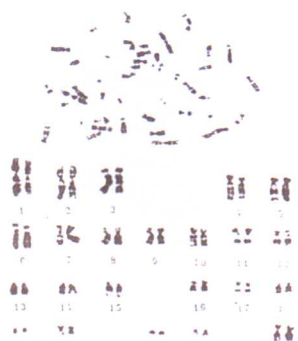
照片 31



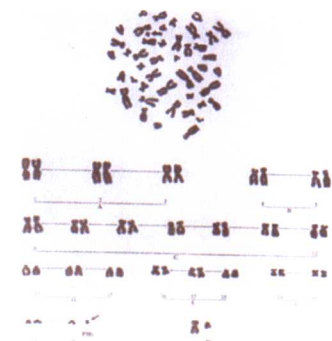
照片 32



照片 33



照片 34



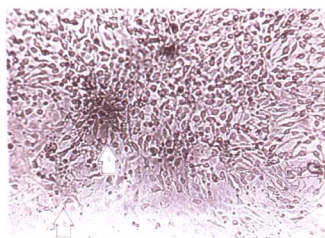
照片 35



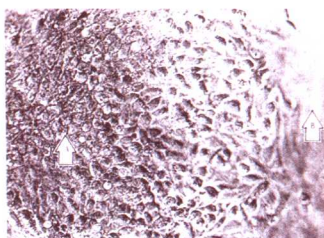
照片 36



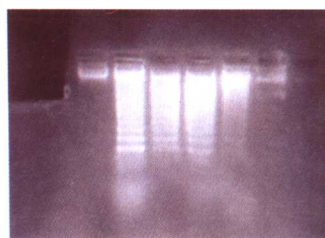
照片 37



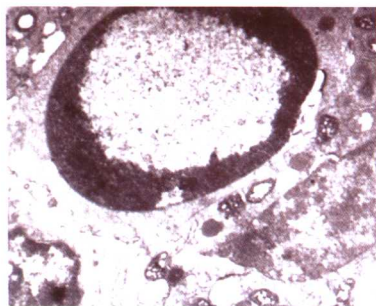
照片 38



照片 39



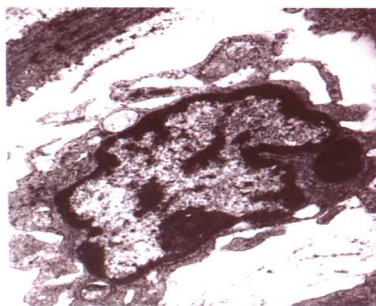
照片 40



照片 41



照片 42



照片 43



照片 44

本书编写人员

主 编 杨吉成

副 主 编 缪竞诚 周建华 盛伟华 郝思国

其他编写人员 李丽娥 吕海涛 赵小瑜 龚爱华

张晓峰 吴 康 谢宇锋 马丽丽

陈雄艳 张 虎 张海峰 叶震敏

赵耀东 郁 心 苗 莉 黄 泉

单云波 刘铁连 井莹莹 胡志清

前 言

根据细胞生物学及工程原理,运用细胞培养技术定向改造人及动物细胞遗传性,创造新型细胞系,并通过工程化的大规模细胞生产方法和工艺,制造生化产品或生物制品,为生物制药和医药研究服务的技术,称为细胞工程。鉴于目前的生命科学、生物技术及生物制药、医学、农学各相关专业的本科生和研究生虽然学习过细胞生物学、微生物学和生物化学等专业基础课,但从未接受过细胞培养技术的训练和细胞工程的学习,而细胞培养技术又是细胞工程的基础和基本功,是必不可缺的基本技术,所以特编写此书。

细胞培养基本技术包括细胞培养的条件,各种组织来源的原代细胞制作和传代培养方法,细胞的营养、环境和影响细胞生长的因素,特别是正常细胞(包括二倍体细胞)、肿瘤细胞的培养和肿瘤细胞的分化及其细胞系(株)的建立,细胞的纯化、克隆分离、干细胞分离培养技术,细胞的长期保存和运输,细胞的形态和生长特性的观测等。这些内容均属于细胞培养的基本技术。如果这些技术都未能掌握,则不能理解和掌握细胞工程中重要的和关键性的技术,不能使细胞工程的操作技能得到提高。若不通过细胞培养技术的基本功训练,是难以真正学好和掌握细胞工程的。因此,首先从细胞培养基本技术着手,进行基础知识学习和基本技术的实际操作,是完全有必要的。

在学好细胞培养基本技术的基础上,才能进一步学习和掌握细胞工程中重要而又常用的专门技术,如细胞染色质和染色体分离分带技术,细胞凋亡,细胞转化,细胞的诱导分化,细胞的药物敏感性试验,细胞毒试验,细胞的融合及单克隆抗体的制备,细胞因子的诱生和检测,细胞的病毒分离和培养,细胞 DNA(基因组 DNA)、RNA 分离鉴定,细胞的转基因等重要的专门技术,这些专门技术在细胞工程中是极为常用的,但专业性强,没有扎实的基础和过硬的操作技能是难以掌握的。一旦掌握了这些技术,既可开展细胞工程的科学研究,又可在细胞工程的应用技术中大显身手。同时这些技术也是分子细胞生物学的基础,学好了这些技术也可开展分子生物学和基因工程的科学研究打下扎实的基础,而且也利于熟练地开展细胞工程的生产应用,并能直接指导生产实践。总而言之,细胞培养基本技术是基础,细胞工程常用的专门技术是关键。

细胞工程的应用技术是细胞培养基本技术和细胞工程常用的专门技术具体应用的体现,本书不仅详细介绍了规模化大量生产细胞的技术,而且还结合生产实际描述了生产工艺,达到了科学实验与生产实践相结合的目的。因此,学好应用技术对今后的生产和研究工作有直接的参考和指导价值,是对所学的实验技术能否真正达到与生产实践相结合的具体检验,学好后,对今后走向社会能更好地适应不同的工作岗位是非常有益的。这正是学习这门课程的目的所在。

目前细胞工程不仅在医药、生物技术的研究中已获广泛的应用,而且在工农业生产中也具有重要的地位,并产生了巨大的社会和经济效益。自 19 世纪 70 年代后,由于现代生物技术迅速发展成熟,人们发现人和动物细胞培养具有功能的全能性,可利用细

胞制造许多生物活性物质，并形成了相当规模的细胞工程工业。其主要产品除病毒疫苗及单克隆抗体外，大多用于生产人和动物体内含量极低的具多功能的高活性蛋白如 IL-2、IFN- α 等细胞因子。由于医药事业和生物技术的发展，目前已实现商品化的产品有口蹄疫疫苗、狂犬病病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒活疫苗、麻疹疫苗、流行性乙型脑炎疫苗，此外还有乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 I 型和 II 型、巨细胞病毒和艾滋病病毒的抗原疫苗，以及疟疾和血吸虫抗原疫苗。生物活性蛋白类制品有 IFN- α 和 IFN- β ，血纤维蛋白溶解酶原激活剂，凝血因子 VIII 和 IX、蛋白 C，免疫球蛋白，促红细胞生成素、松弛素、激肽释放酶、尿激酶、生长激素及 200 多种单克隆抗体，以及真核细胞（CHO 等）表达的基因工程产品，如 G-CSF、GM-CSF 等，临床研究中的干细胞分离培养和移植，各种转基因细胞的扩增和基因治疗，转基因动物的品种改良和药用价值已获得了充分的体现。利用无血清培养基培养动物细胞，生产单克隆抗体，采用气升式培养罐达到 1000L 规模，生产周期为 260h，抗体浓度达到 50~500mg/L，为实验室浓度的 4~5 倍，产品批量达到 200g。此外在 1000L 规模上采用微载体法培养人二倍体成纤维细胞和生产 IFN- β 获得成功。英国 Wellcome 公司采用 8000L 培养罐培养 Namalva 细胞生产 IFN- α ，亦为工业化生产规模的典型实例，被称为“超大规模”人类淋巴细胞培养技术。近年来又采用 100L 培养罐进行灌注式连续培养细胞的生产获得成功，缩小了反应体积，扩大了培养规模，提高了产品的产量，为大量细胞培养提供了新技术，推动了细胞工程的工业化进程。相信随着技术的不断进步，新的细胞培养设备不断出现，必然形成一个有广泛市场前景的细胞工程产业。

细胞工程是生物工程的重要高新技术，与基因工程、蛋白工程关系密切。细胞工程既是基因工程的基础，又是基因工程的目的，基因工程的表达离不开细胞工程。细胞工程是蛋白工程产物的重要生产手段，可为蛋白工程提供大量的加工原料，若没有细胞工程，蛋白工程就难以实现产物的加工和纯化。由此可见细胞工程在生物工程中占有重要地位。

本书介绍细胞培养基本技术，常用的专门技术和生产应用技术，重点是突出技术、方法、工程和应用。具有题材新颖、技术先进、方法具体、步骤分明、操作方便、内容实用的特点。本书可作为医学各相关专业的基础课和生物技术及生物制药专业本科生专业课教材。

由于编者水平有限，书中遗漏及不足在所难免，恳望广大读者批评指正。

主编 杨吉成

目 录

第一篇 细胞培养基本技术

第一章 细胞培养的基本知识	1
第一节 基本概念和名词	1
第二节 细胞的特性	3
一、培养细胞的形态与结构	3
二、培养细胞的生长方式和类型	5
三、培养细胞的生长特点和生长增殖过程	5
第二章 细胞培养的条件	10
第一节 细胞的营养	10
一、水	10
二、糖	11
三、氨基酸	11
四、维生素	12
五、无机离子和微量元素	12
六、血清	13
七、促细胞生长因子	14
第二节 影响细胞生长的因素	15
一、温度	15
二、渗透压	15
三、气体环境和 pH 值	16
四、无毒和无菌	17
五、辐射线和超声波	17
六、细胞接种密度	17
七、容器转动速度和悬浮搅动速度	18
第三章 细胞培养的必备设施、常用器材和培养基	19
第一节 细胞培养的必备设施	19
一、无菌实验室	19
二、超净工作台	19
三、恒温培养箱	20
四、其他设备	20
第二节 细胞培养常用器材及处理方法	21
一、玻璃器材	22
二、塑料器材	23
三、橡胶器材	23
四、金属器材	24
五、其他用品	24
第三节 常用溶液、培养基及其配制	25

一、平衡盐溶液	25
二、其他溶液	26
三、培养基	27
第四章 原代细胞的培养与建系	32
第一节 原代细胞的取材	32
一、取材的基本要求	32
二、各类组织的取材技术	33
第二节 原代细胞的分离和制作	34
一、悬浮细胞的分离方法	34
二、实体组织材料的分离方法	34
三、原代细胞的培养方法	38
第三节 原代和传代细胞的培养和维持	40
一、原代细胞的培养与维持	40
二、原代细胞培养的首次传代	42
三、传代细胞的传代培养	42
四、传代细胞的建系和维持	43
第四节 原代细胞的纯化和克隆	44
一、细胞的纯化	44
二、细胞的克隆	46
第五章 正常细胞的培养	50
第一节 上皮细胞的培养	50
一、表皮细胞分离培养	51
二、乳腺上皮细胞分离培养	52
三、子宫颈上皮细胞分离培养	52
四、肝细胞分离培养	53
五、胰腺细胞分离培养	54
六、气管及支气管上皮细胞分离培养	54
七、前列腺细胞培养	55
八、口腔黏膜上皮细胞培养	55
九、胃上皮细胞培养	56
第二节 中胚层细胞培养	57
一、结缔组织细胞培养	57
二、肌肉组织细胞培养	61
三、各种骨细胞分离培养	62
四、骨髓细胞分离培养	65
五、内皮细胞分离培养	68
六、血细胞分离培养	69
第三节 神经外胚层细胞培养	73
一、神经细胞分离培养	73
二、神经胶质细胞分离培养	74
第四节 眼细胞培养	74
一、概述	74
二、眼细胞培养类型及方法	77
第六章 干细胞的培养	85

第一节 干细胞的概念和来源	85
一、干细胞的概念	85
二、干细胞的来源	85
第二节 胚胎干细胞培养	86
一、胚胎干细胞的特性和分化潜能	86
二、胚胎干细胞的建系	88
三、胚胎干细胞的培养	89
第三节 造血干/祖细胞培养	90
一、造血干/祖细胞的生物学特性及研究方法	91
二、造血祖细胞培养技术	92
三、造血干/祖细胞的分离纯化	101
四、造血干/祖细胞的体外扩增	103
五、造血干/祖细胞体外扩增的临床应用	106
第四节 神经干细胞的分离和培养	108
一、神经干细胞生物学特性	108
二、影响神经干细胞分化的因素	109
三、神经干细胞的培养技术	109
四、神经干细胞培养的意义及应用	113
第七章 昆虫、鱼及其他动物细胞的培养	115
第一节 昆虫细胞的培养	115
一、鳞翅目昆虫细胞原代培养的基本方法	115
二、鳞翅目昆虫细胞系的建立	119
三、昆虫缺陷型细胞株的建立	120
第二节 鱼类细胞培养	123
一、鱼类组织细胞培养	124
二、鱼类血细胞培养方法	125
第三节 中华鳖胚胎细胞培养	126
一、中华鳖胚胎细胞的原代培养	126
二、中华鳖胚胎细胞的传代培养	126
三、中华鳖胚胎细胞培养应注意的问题	126
第八章 肿瘤细胞的诱导分化和培养	127
第一节 肿瘤细胞的培养	127
一、肿瘤细胞的生物学特性	127
二、肿瘤细胞的生物学特性的检测	128
三、肿瘤细胞的取材和培养	129
第二节 肿瘤细胞的诱导分化	134
一、白血病细胞的诱导分化	135
二、实体瘤细胞的诱导分化	135
三、肿瘤细胞体内分化诱导实例	137
第九章 细胞培养的污染及控制	139
第一节 污染的类型	139
一、细菌污染	139
二、真菌污染	139
三、支原体污染	139

四、病毒污染	139
五、其他污染	140
第二节 污染来源及鉴别	140
一、污染来源	140
二、污染的鉴别	141
第三节 污染的清除和预防	142
一、污染的清除	142
二、污染的预防	143
第十章 细胞的冷冻保存复苏技术	144
第一节 细胞的冻存	144
一、概述	144
二、主要冷冻设备和材料	144
三、细胞冻存方法	144
第二节 细胞的复苏	145
一、细胞复苏的原则	145
二、细胞复苏的主要操作步骤	145
三、复苏时的注意事项	145
第三节 细胞的运输	146
一、冷冻储存运输	146
二、充液法	146
第十一章 培养细胞观察与检测方法	147
第一节 培养细胞的常规检查和观察方法	147
一、肉眼观察	147
二、显微镜观察	147
三、细胞的生长状态的观察	147
四、微生物污染的观察	148
第二节 培养活细胞的观察方法	148
一、相差显微镜直接观察法	148
二、暗视野显微镜观察活细胞	149
三、缩时显微摄影观察	149
四、离体活细胞染色观察	150
第三节 细胞固定观察法	150
一、细胞固定基本方法	150
二、常用染色方法	150
三、特殊染色方法	152
第四节 细胞生长状况有关指标的检测方法	156
一、细胞计数	156
二、细胞生长曲线和生长倍数	156
三、细胞分裂指数	156
四、细胞接种存活率	157
五、克隆形成率	157
第五节 细胞生物活性的化学检测法	158
一、四唑盐 (MTT) 比色法	158
二、细胞蛋白质含量测定法 (考马斯亮蓝测定法)	159

三、细胞蛋白质合成测定法 (^3H -亮氨酸掺入法)	159
四、细胞 DNA 合成测定法	159
第六节 电子显微镜观察法	160
一、透射电子显微镜细胞样品制备技术和观察方法	161
二、扫描电子显微镜细胞样品制备	162
第七节 激光扫描共聚焦显微镜观察法	163
一、激光扫描共聚焦显微镜基本结构	163
二、激光扫描共聚焦显微镜使用步骤	164
三、激光扫描共聚焦显微镜功能	165

第二篇 细胞工程常用专门技术

第十二章 细胞染色体检测和荧光原位杂交技术 167

第一节 性染色质检测	167
一、X 染色质显示法	167
二、Y 染色质显示法	168
第二节 培养细胞染色体显示方法	168
一、原理	168
二、传代细胞染色体检测	169
三、微量外周血白细胞染色体检查	169
四、羊水细胞培养	169
第三节 染色体结构显示和检测	169
一、染色体显带原理和种类	169
二、染色体显带方法要点	170
三、常用染色体显带法	170
四、姐妹染色单体分化染色	171
第四节 荧光原位杂交技术	172
一、探针的类型和制备	172
二、荧光素标记原位杂交的方法	173
三、荧光原位杂交的基本步骤	174
四、染色体荧光原位杂交基本步骤	176
五、影响荧光原位杂交实验结果的因素	176
六、荧光原位杂交技术的优点和存在的主要问题	177

第十三章 体外培养细胞的转化和转化灶的分离培养 178

第一节 细胞转化的概念、方式和过程	178
一、细胞转化与恶变的区别	178
二、细胞转化的方式	178
三、细胞转化的基本过程	179
第二节 转化细胞的诱变因素及选择	180
一、诱变剂的选择	180
二、转化细胞的选择和常用的细胞种类	180
第三节 细胞转化方法和转化灶的分离纯化	181
一、细胞转化方法	181
二、转化灶的分离	182
三、转化细胞的筛选	182

第四节 几种常用细胞转化技术实例	183
一、化学致癌物转化细胞	183
二、病毒转化细胞	184
第十四章 DNA 损伤和细胞凋亡检测技术	185
第一节 DNA 损伤检测技术	185
一、DNA 片段分析——DNA 梯形条带分析	185
二、DNA 断裂检测	186
第二节 细胞凋亡及其检测技术	190
一、细胞凋亡的特征	191
二、细胞凋亡的分子机制	191
三、细胞凋亡的医学意义	194
四、细胞凋亡试验常用的方法	195
五、 <i>bcl-2</i> 凋亡基因表达的检测	197
六、JAM 检测技术	199
第十五章 细胞融合、单克隆抗体的杂交瘤技术和生产技术	201
第一节 细胞融合	201
一、常用细胞融合剂	201
二、细胞融合方式	201
第二节 单克隆抗体的杂交瘤技术	202
一、单克隆抗体技术基本原理	202
二、单克隆抗体技术的特点	203
三、单克隆抗体技术的应用	203
四、杂交瘤细胞制备的操作程序	204
第三节 单克隆抗体生产技术	211
一、牛淋巴液体外循环培养法	211
二、微囊培养法 (micro-encapsulation)	211
三、含血清的杂交瘤细胞大量培养法	212
四、无血清的杂交瘤细胞培养法	212
五、工业化悬浮培养生产单克隆抗体的工艺流程	212
第十六章 细胞毒试验技术和药物敏感试验的细胞培养法	214
第一节 癌细胞的杀伤研究	214
一、癌细胞杀伤研究的种类	214
二、细胞毒试验	215
第二节 药物敏感试验的细胞培养法	218
一、细胞培养在药物敏感试验中的作用	218
二、药物敏感试验方法	219
三、不同抗癌药物的生物效应指标的选择	223
第十七章 病毒研究中应用的细胞培养技术和疫苗生产技术	225
第一节 细胞培养用于病毒研究的优点	225
第二节 用细胞培养技术分离病毒	225
一、接种标本的处理	225
二、病毒的细胞培养	226
三、在细胞培养中病毒作用之识别	227

四、在单层细胞上滴定病毒	227
第三节 病毒的鉴定技术	227
一、病毒蚀斑技术	227
二、病毒蚀斑抑制试验	230
三、细胞培养系统中的中和试验	231
四、用细胞培养法制备病毒血清学抗原应注意的问题	232
第四节 病毒和疫苗的生产制备技术	233
一、病毒的生产制备	233
二、病毒疫苗的生产制备	234
第十八章 细胞因子	239
第一节 细胞因子概况	239
一、细胞因子研究概况	239
二、细胞因子的特点	239
三、各类细胞因子特性和功能	240
四、细胞因子的医学意义及其应用	245
第二节 细胞因子的诱导表达	246
一、白细胞介素类的诱生	246
二、集落刺激因子类的诱生	248
三、肿瘤坏死因子的诱生	249
四、干扰素的诱生和制备	249
第三节 细胞因子的效价测定	253
一、细胞因子效价测定的原理	253
二、细胞因子效价测定方法	253
第十九章 细胞基因分离鉴定和原位杂交	267
第一节 细胞 DNA、RNA 的分离鉴定技术	267
一、培养细胞基因组 DNA 的提取及鉴定	267
二、培养细胞总 RNA 的提取及鉴定	268
第二节 核酸、蛋白质转移电泳及杂交	269
一、DNA Southern Blot 及杂交	269
二、RNA Northern Blot 及杂交	271
三、蛋白质 Western Blot 及分析	272
第三节 荧光定量 PCR 技术	273
一、主要应用技术原理和特点	273
二、实验仪器	277
三、荧光定量的主要应用领域	277
第四节 细胞的原位杂交技术	278
一、探针的制备原则和选择	279
二、载玻片和盖玻片的预处理	279
三、组织细胞固定	279
四、原位杂交	280
第二十章 基因细胞内转导技术	283
一、基本概念	283
二、物理、化学法基因转染技术	284
三、逆转录病毒载体介导 DNA 转染	288