



“十二五”职业教育国家规划教材
经全国职业教育教材审定委员会审定



细胞培养技术

(第二版)

兰 蓉 主编



化学工业出版社

“十二五”职业教育国家规划教材
经全国职业教育教材审定委员会审定

细胞培养技术

(第二版)

兰 蓉 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本教材以普通高等教育“十一五”国家级规划教材《细胞培养技术》为基础,融入“工学结合”的办学思路,聘请企业一线专家参与教材建设,开发企业真正用得上的教学内容,项目教学、行为引导式教学、任务驱动式教学等在教材中得到了充分体现。教材中的五个项目均取材于企业(或行业)的真实工作任务,包括 VERO 细胞的传代培养、鸡胚成纤维细胞的原代培养、CHO 细胞的大规模培养、抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的制备、胡萝卜细胞的悬浮培养,设计了 12 个工作任务。本教材采用“富媒体”教材编写理念,将教材与多媒体资源库相结合,每个项目都附有与之配套的实训音像资料(时长共约 1 个小时),读者可以通过使用移动终端扫描与之对应的二维码,感受时效性较强的视频案例等多媒体素材。另外本书每个项目还附有配套的学生工作手册和免费的教学课件,这些都为教材使用者的自主学习提供了方便。

本教材适合高等职业院校生物技术相关专业使用,也可作为生物技术人员的参考书和培训教材。

图书在版编目(CIP)数据

细胞培养技术/兰蓉主编. —2 版. —北京:化学工业出版社,2017.2

“十二五”职业教育国家规划教材

ISBN 978-7-122-28554-6

I. ①细… II. ①兰… III. ①细胞培养-高等职业教育-教材 IV. ①Q813.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 278675 号

责任编辑:李植峰 张春娥

装帧设计:张 辉

责任校对:边 涛

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 装:中煤(北京)印务有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 20¼ 字数 510 千字 2017 年 5 月北京第 2 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:45.00 元

版权所有 违者必究

《细胞培养技术》(第二版) 编写人员

主 编 兰 蓉

副 主 编 秦静远 段院生 边亚娟 张乃群

参编人员 (以姓名汉语拼音为序)

边亚娟 (黑龙江生物科技职业学院)

段院生 (黄冈职业技术学院)

冯 晖 (北京电子科技职业学院)

韩明娣 (北京四环生物制药有限公司)

金小花 (苏州农业职业技术学院)

兰 蓉 (北京电子科技职业学院)

李恒思 (广州瑞姆生物科技有限公司)

李双石 (北京电子科技职业学院)

刘玉琴 (北京协和医学院基础医学院细胞中心)

吕健龙 (北京四环生物制药有限公司)

秦静远 (杨凌职业技术学院)

任平国 (漯河职业技术学院)

桑建彬 (北京四环生物制药有限公司)

唐业刚 (武汉生物工程学院)

王 迪 (黑龙江职业学院)

张乃群 (南阳师范学院)

周珍辉 (北京农业职业学院)

主 审 章静波 (北京协和医学院)

前 言

细胞培养技术是生物技术的重要组成部分，是生物学各研究领域的基本技术和技能，现已广泛应用在生物学、医学、生物制药等各个领域。目前，全国开设生物相关专业的高等职业院校共有 200 多所，绝大多数学校都开设细胞培养方面的课程，但有关细胞培养技术方面的书籍或教材，还不是完全适宜高职院校的基于工作过程的教学改革需求。本教材以普通高等教育“十一五”国家级规划教材《细胞培养技术》为基础，融入“工学结合”的办学思路，聘请企业一线专家参与教材建设，开发企业真正用得上的教学内容，项目教学、行为引导式教学、任务驱动式教学等在教材中得到了充分体现。

教材中的五个项目均取材于企业（或行业）的真实工作任务，包括 VERO 细胞的传代培养、鸡胚成纤维细胞的原代培养、CHO 细胞的大规模培养、抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的制备、胡萝卜细胞的悬浮培养，设计了 12 个工作任务。本教材采用“富媒体”教材编写理念，将教材与多媒体资源库相结合，每个项目都附有与之配套的实训音像资料（时长共约 1 个小时），读者可以通过使用移动终端扫描与之对应的二维码，感受时效性较强的视频案例等多媒体素材。另外本书每个项目还附有配套的学生工作手册和免费的教学课件，这些都为教材使用者的自主学习提供了方便。

参与本书编写的人员既有具备多年细胞培养技术教学经验的教师，也有工作在细胞培养一线的企业技术人员。其中，边亚娟、周珍辉、任平国等主要负责动物细胞培养概论、项目一和项目二的编写工作；秦静远、张乃群、金小花等主要负责植物细胞培养概论和项目五的编写工作；冯晖、吕健龙等主要负责项目三的编写工作；李恒思、唐业刚等主要负责项目四的编写工作；其他编写人员主要参与了实验视频的拍摄工作。

本书还配套有丰富的立体化教学资源，可从 www.cipedu.com.cn 免费下载。

本书在编写与出版过程中，得到了化学工业出版社、北京协和医学院与北京四环生物制药有限公司等单位的大力支持。北京协和医学院的章静波教授审阅了全部书稿，并对本书的构架和内容提出了许多建设性意见。北京协和医学院基础医学院细胞中心的刘玉琴教授和北京四环生物制药有限公司的车间主任吕健龙以及黄冈职业技术学院段院生等在配套音像资料的拍摄上做了大量工作。在此，作者谨向化学工业出版社、北京协和医学院和北京四环生物制药有限公司等单位致以诚挚的感谢。

由于作者的经验和水平有限，书中难免会有疏漏与不足之处，敬请广大读者与同仁批评指正。

编者

2014 年 4 月

目 录

第一部分 动物细胞培养

动物细胞培养概述	2	任务三 VERO 细胞的冻存和复苏	60
一、动物细胞培养的基本概念及优缺点	2	• 必备知识	60
二、动物细胞培养发展史	4	一、细胞的冻存	60
三、动物细胞培养的应用	6	二、细胞的复苏	61
四、动物细胞培养工作的基本要求和工 方法	8	三、细胞活性检查	61
【难点自测】	9	四、细胞计数	62
项目一 VERO 细胞的传代培养	10	• 操作规程	63
【项目介绍】	10	一、VERO 细胞的冻存	63
一、项目背景	10	二、VERO 细胞的复苏	64
二、学习目标	10	三、VERO 细胞的活性检查	65
三、项目任务	10	【项目拓展知识】	66
【项目实施】	10	一、动物细胞培养实验室的设计与布局	66
任务一 VERO 细胞培养前的准备	10	二、动物细胞培养的其他常用液	67
• 必备知识	11	三、培养细胞的运输和短期保存	68
一、培养细胞的生长条件	11	【项目难点自测】	69
二、动物细胞培养设备	14	项目二 鸡胚成纤维细胞的原代培养	71
三、动物细胞培养用品	18	【项目介绍】	71
四、动物细胞培养用液	25	一、项目背景	71
五、动物细胞培养常用的消毒和无菌处 理	31	二、学习目标	71
• 操作规程	34	三、项目任务	71
一、动物细胞培养常用设备的使用	34	【项目实施】	71
二、动物细胞培养用品的清洗、包装和 灭菌	36	任务一 组织块法培养鸡胚成纤维细胞	71
三、动物细胞培养用液的配制和无菌 处理	39	• 必备知识	71
四、动物细胞培养的无菌操作	41	一、培养细胞的取材	72
任务二 VERO 细胞的传代和观察	43	二、组织块培养法	73
• 必备知识	43	• 操作规程	74
一、动物细胞传代培养技术	43	一、操作用品	74
二、培养细胞的细胞生物学	45	二、操作步骤	75
三、培养细胞的观察和检测技术	52	任务二 消化法培养鸡胚成纤维细胞	76
• 操作规程	58	• 必备知识	76
一、VERO 细胞的传代培养	58	一、组织材料的分离	76
二、VERO 细胞的常规观察	59	二、消化培养法	77
		• 操作规程	78
		一、操作用品	78
		二、操作步骤	78
		【项目拓展知识】	79

一、正常组织细胞的培养	79	二、杂交瘤技术制备单克隆抗体的基本	
二、肿瘤细胞培养	82	原理	116
【项目难点自测】	85	三、杂交瘤技术制备单克隆抗体的主要	
项目三 CHO 细胞的大规模培养	87	过程	116
【项目介绍】	87	四、动物免疫	116
一、项目背景	87	• 操作规程	117
二、学习目标	87	一、操作用品	117
三、项目任务	87	二、操作步骤	117
【项目实施】	88	任务二 骨髓瘤细胞和脾细胞的融合	118
• 必备知识	88	• 必备知识	118
一、动物细胞大规模培养技术概述	88	一、脾细胞、骨髓瘤细胞及饲养细胞的	
二、动物细胞大规模培养的方法	89	制备	118
三、动物细胞培养反应器	96	二、细胞融合和杂交瘤细胞的筛选	119
四、动物细胞大规模培养技术的操作		• 操作规程	121
方式	100	一、操作用品	121
• 操作规程	101	二、操作步骤	121
【项目拓展知识】	105	任务三 抗人血白蛋白杂交瘤细胞的	
一、植物细胞大规模培养技术的概念	105	筛选	124
二、植物细胞大规模培养的应用和工业		• 必备知识	124
前景	105	一、酶联免疫吸附法	124
三、植物细胞大规模培养流程	107	二、双向扩散法	124
四、植物细胞的规模化培养体系的		• 操作规程	125
建立	107	任务四 抗人血白蛋白杂交瘤细胞的克隆	
五、植物细胞的大规模培养方法	109	培养	126
六、植物细胞生物反应器	111	• 必备知识	126
【项目难点自测】	113	一、有限稀释法	127
项目四 抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的		二、软琼脂平板法	127
制备	115	三、显微镜操作法	127
【项目介绍】	115	四、荧光激活分离法	127
一、项目背景	115	• 操作规程	128
二、学习目标	115	【项目拓展知识】	128
三、项目任务	115	一、杂交瘤技术的诞生	128
【项目实施】	115	二、杂交瘤细胞株的冻存和复苏	129
任务一 人血白蛋白免疫小鼠的准备	115	三、单克隆抗体的大量制备与纯化	129
• 必备知识	115	四、细胞的基因转染技术	130
一、单克隆抗体的概念	115	【项目难点自测】	132

第二部分 植物细胞培养

植物细胞培养概述	136	项目五 胡萝卜细胞的悬浮培养	144
一、植物组织培养	136	【项目介绍】	144
二、植物细胞培养	137	一、项目背景	144
三、植物组织细胞培养的发展史	138	二、学习目标	144
四、植物组织细胞培养的应用	140	三、项目任务	144
【难点自测】	142	【项目实施】	145

任务一 MS 培养基的制备	145	任务三 胡萝卜细胞的悬浮培养	164
• 必备知识	145	• 必备知识	164
一、植物细胞培养的实验室条件	145	一、单细胞的分离	164
二、植物细胞培养的培养基	150	二、悬浮培养细胞的生长和测定	166
• 操作规程	156	三、悬浮培养细胞的同步化	167
任务二 胡萝卜愈伤组织的诱导	159	四、植物细胞培养的环境条件	167
• 必备知识	159	• 操作规程	169
一、外植体的选择和预处理	159	【项目拓展知识】	170
二、植物愈伤组织培养的形成过程	161	一、植物细胞的固定化培养	170
三、植物愈伤组织培养的一般程序	162	二、植物单细胞培养	172
四、植物组织细胞培养的无菌操作	163	【项目难点自测】	174
• 操作规程	163		
附录 细胞培养技术常用术语中英文对照	177		
参考文献	182		

第一部分 动物细胞培养

动物细胞培养概述

- 项目一 VERO 细胞的传代培养
- 项目二 鸡胚成纤维细胞的原代培养
- 项目三 CHO 细胞的大规模培养
- 项目四 抗人血白蛋白杂交瘤细胞系的制备

动物细胞培养概述

学习目标

1. 理解动物细胞培养的概念，了解细胞培养与组织培养和器官培养的区别与联系；
2. 熟悉动物细胞培养的特点；
3. 了解动物细胞培养的发展史及其在各领域的应用；
4. 熟悉动物细胞培养的基本要求和工作方法。

一、动物细胞培养的基本概念及优缺点

(一) 动物细胞培养的概念

1. 动物细胞培养

动物细胞培养是指将动物活体体内取出的组织用机械或消化的方法分散成单细胞悬液，然后放在类似于体内生存环境的体外环境中，进行繁育培养，使其生存、生长并维持其结构与功能的方法。动物细胞培养的对象为单个细胞或细胞群，这些细胞不再形成组织。

2. 动物组织培养和器官培养

(1) 动物组织培养 动物组织培养是一个和动物细胞培养相近的概念，其本意是指从生物体内取出活的组织（多指组织块）在体外进行培养的方法。组织培养的对象在体外可发生分化并保持组织的结构和功能，但不具备器官的结构与功能。在培养组织过程中，因为细胞的移动（运动）和其他一些环境因素的影响，现代的培养技术尚不能在体外维持组织的结构和机能长期保持不变。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，最终成为细胞培养。而所谓的细胞培养，也并不意味着细胞彼此是独立的，细胞在培养中的生命活动和体内细胞一样，仍然是相互依存的，呈现出一定的“组织”特性。所以，组织培养和细胞培养的概念并无严格区别，有时会笼统地放在一起。要注意的是，组织培养这一概念在过去常常用来泛指所有的体外培养，即器官培养、组织培养和细胞培养的总称（见图 0-1）。

(2) 动物器官培养 动物器官培养系将动物活体内的器官（一般是胚胎器官）、器官的一部分或器官原基取出，在体外进行培养的方法。器官培养的对象在体外也可能发生一定程度的分化，但始终保持器官的基本结构和功能特征。

事实上，动物器官培养和组织、细胞培养也没有截然界限。器官培养中所培养的器官包含各种各样的组织和细胞，其所应用的培养条件和组织培养、细胞培养的条件是相似的。

(二) 动物细胞培养的优缺点

细胞培养不仅是一种技术，也是一门科学，现已广泛应用于现代医学和生物科学研究之中。细胞培养技术最大的优点在于被培养的细胞能够方便地施加实验因素和观测实验结果，是非常好的实验对象。

细胞培养技术具有以下一系列优点。

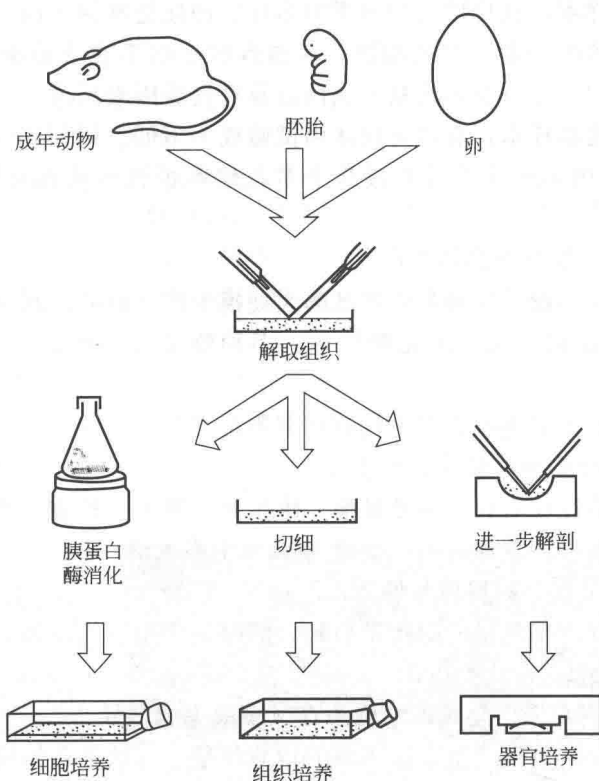


图 0-1 组织培养的类型

(引自：章静波译，动物细胞培养基本技术指南，2004)

1. 可简化细胞的生长环境以实现细胞功能的研究

生物体内任何一个细胞不论是其生存环境还是其发挥功能的条件等都是非常复杂和不易研究的，要想弄清楚某一种细胞的生存条件和生物学功能，一个有效的方法就是将所研究的对象孤立出来单独进行分析。细胞培养技术使得在细胞存活的基础上独立研究细胞生命活动、逐项研究细胞生存条件和细胞功能成为可能。

2. 能够方便地控制实验因素

在细胞培养的条件下，细胞生存的理化环境如 pH、温度、CO₂ 张力等都是可以人为控制的，并且可能做到很精确以及保持其相对的恒定。研究某种实验因素对细胞的生物学作用，只需在培养液中有针对性地加入或者删除这种成分即可。

3. 易于观测实验结果

利用细胞培养技术研究细胞的生命活动规律，可以很方便地采用各种实验技术和方法来观察、检测和记录。例如，通过倒置相差显微镜等直接观察活的细胞；应用缩时电影技术、摄像或者通过闭路电视长时间连续记录和观察被培养细胞的体外生长情况，可以直观地揭示培养细胞的生命活动规律以及所施加因素的反应；利用同位素标记、放射免疫等方法检测细胞内的物质合成和代谢变化等。

4. 可为多种学科的研究提供基础

从低等动物细胞到高等动物细胞以至人类细胞，从胚胎细胞到成体细胞，从正常组织细胞到肿瘤组织细胞皆可用于培养，为多种学科的实验研究提供广泛的实验材料。

5. 可同时提供大量均一性较好的细胞群，降低实验成本

取自一般的组织样本，其构成的细胞类型多样，即使是来源于同一组织，也不可能做到均一性。但是，体外培养一定代数的细胞，所得到的细胞系或细胞株则可达到细胞类型单一、细胞周期同步均匀、生物学性状基本相同以及对实验因素反应一致。由于细胞培养可提供大量均一性较好的实验样本，有时可比体内试验成本更低。例如，一个需要 100 只鼠才能得出结论的实验可能用 100 片盖玻片或几个多孔培养板就可获得具有相同统计学意义的结果。

6. 能够进行大规模生物产品的生产

通过大规模细胞培养设备实现生物产品的大规模生产。目前，利用动物细胞大规模培养技术所生产的生物产品包括酶、单克隆抗体、多种疫苗以及胰岛素、干扰素等基因工程产品。

细胞培养虽然具有很多优点，但是也有以下不足之处。

1. 体外培养的动物细胞对营养的要求较高

动物细胞培养液中往往需要多种氨基酸、维生素、辅酶、核酸、嘌呤、嘧啶、激素和生长因子等，在很多情况下还需加入 10% 的胎牛或新生牛血清。

2. 动物细胞生长缓慢，对环境条件要求严格

动物细胞培养不仅需要严格的防污染措施，同时还要用空气、氧、二氧化碳和氮的混合气体进行供氧和调节 pH。

3. 体外培养的细胞与体内生长的细胞存在或多或少的差异

组织和细胞离体之后，独立生存在体外的培养环境中，缺乏在体内时的血液供应和神经体液调节作用，其生物学行为与体内生长时相比会发生某些变化。即使当前模拟体内技术发展很快，但终究是一种人工条件，始终不如真正的体内生存条件完美。因此，在利用培养细胞作研究对象时，切不要与体内细胞等同起来，对实验结果做出轻易判断。

4. 细胞培养存在一定的不稳定性

体外培养的细胞，尤其是反复传代、长期培养的，有可能发生染色体非二倍体改变等情况。

二、动物细胞培养发展史

(一) 动物细胞培养技术的创立

现在一般认为细胞培养技术是从 R. Harrison 和 A. Carrel 两人真正开始的。



图 0-2 单玻片悬滴培养法

(引自：薛庆善，体外培养的原理与技术，2001)

1907 年，实验胚胎学家 Harrison 在无菌条件下，将蛙胚髓管部的小片组织接种于蛙的淋巴液中，共同保持在一个盖玻片上，然后翻转盖玻片，使组织小片和淋巴液悬挂在盖玻片的表面，再将这块玻片密封在一凹载

玻板上。一定时间后，更换淋巴液。Harrison 用这种方法，将蛙胚髓管部的小片组织在体外培养了数周之久。Harrison 的实验开创了动物组织和细胞培养的先河，标志着盖玻片悬滴培养法的建立（见图 0-2）。

在动物组织和细胞培养的先驱者中，法国学者 A. Carrel 也功不可没。Carrel 把外科手术的无菌操作观念带到了组织培养实验中，在进行实验时特别注意无菌操作。在没有抗生素的情况下，仅仅依靠小心而细致的工作，使鸡胚心脏植块连续培养长达数年之久。除了将无菌操作观念带入组织培养过程外，Carrel 的第二个重要贡献是将培养组织包埋技术、营养供应以及传代培养等许多重要的培养条件和方法引入组织培养过程中，从而使多种动物组织培

养获得成功。1923 年, Carrel 又设计了用卡氏瓶培养的方法, 以扩大组织的生存空间, 为组织细胞培养的发展奠定了基础。在卡氏瓶培养法的启发下, 相继出现了各种类型的培养瓶、培养皿、试管以及多孔培养板的培养法。

(二) 动物细胞培养技术的发展

组织和细胞技术创立以后, 这门技术的发展非常迅速, 特别是从 20 世纪 50 年代开始, 细胞培养技术进入了一个飞速发展的阶段。相继有很多学者从改进培养器材、培养方法和培养液三个方面进行了很多革新。现在细胞培养已成为细胞工程、基因工程、抗体工程、酶工程等生物技术的重要手段, 广泛应用于生物学和医学研究各个领域。

1. 培养器材的发展

1923 年, Carrel 设计出了培养空间较大且换液传代方便的卡氏瓶, 并用卡氏瓶培养各种组织细胞, 发表了大量论文。在卡氏瓶原理的启发下, 出现了试管培养, 继而又出现了多种类型的培养瓶、培养皿和多孔培养板的培养 (见图 0-3)。从 20 世纪 40 年代开始, 大多数培养工作都过渡到用瓶子培养。

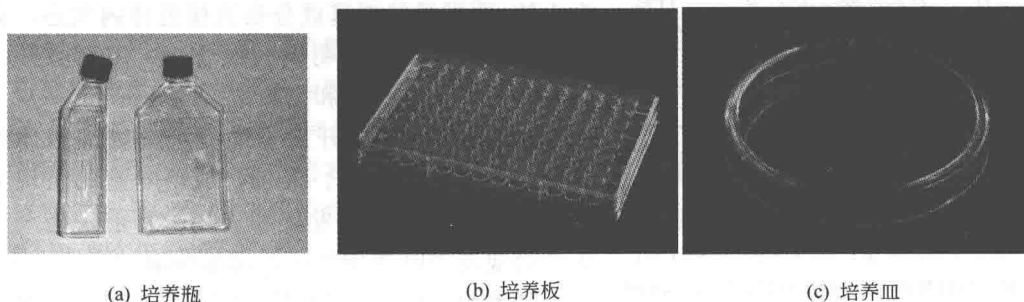


图 0-3 多种类型的细胞培养容器

(引自: 中国实验室装备, 2006)

2. 培养方法的发展

在培养器材更新的同时, 培养方法的改进也十分迅速。1925 年, A. Maximow 改良了 Harrison 创立的单盖片悬滴培养法, 使之成为双盖片悬滴培养法。双盖片悬滴培养法是将接种组织的盖玻片与用于封闭培养环境的盖玻片分成两张盖玻片 (见图 0-4), 方便了更换培养液的手续, 大大降低了污染的概率。



图 0-4 双盖玻片法图解

1—载体盖玻片; 2—带培养物盖玻片

(引自: 陈瑞铭, 动物组织培养技术及其应用, 1998)

1933~1934 年, Gey 和 Lewis 建立了旋转管培养的方法, 将培养物接种于一管状培养器皿中, 再将其固定在一可以旋转的装置 (见图 0-5) 上旋转培养。采用这种培养方法, 培养物可交替地接触培养液和气体环境, 既利于细胞或组织成长, 也扩大了培养面积, 增加了培养细胞的数量。Gey 等利用旋转管培养法建立了许多细胞系, 但这种方法有一个最显著的缺陷就是旋转管是球形的, 因而不宜在显微镜下观察。

1951 年, Pomerat 建立了灌流小室培养法。培养时, 将细胞接种于一个由上下两个盖玻片 (分别构成上壁与下壁) 与一金属圈 (构成侧壁) 密封围成的小室内, 保持在一定条件下培养。在小室的侧面分别有液体流入和流出的开口, 供新鲜培养液流入小室和旧培养液排出, 使细胞生活在不断更新的培养液中 (见图 0-6)。

1957 年, Dulbecco 等采用胰蛋白酶消化处理来分离细胞的方法和应用液体培养基的方

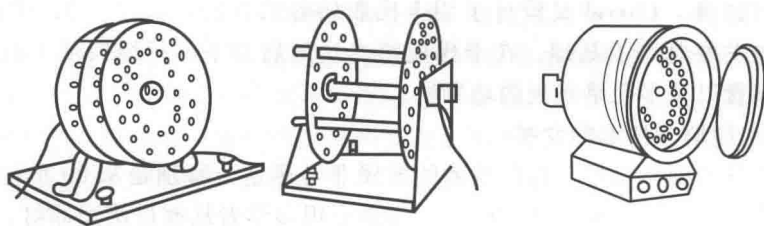


图 0-5 旋转管培养法中的旋转装置

(引自：陈瑞铭，动物组织培养技术及其应用，1998)

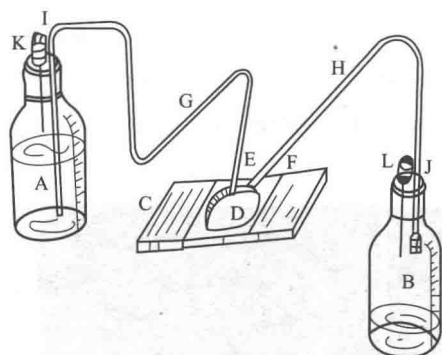


图 0-6 灌注小室培养系统

A—排液瓶；B—受液瓶；C—不锈钢灌注小室；
D—扁锥形的小孔道；E、F—2 号注射针头；
G、H—塑料导管；I—玻璃导管；J—2 号注射
针头；K、L—14 号注射针头（塞以棉花）

（引自：陈瑞铭，动物组织培养
技术及其应用，1998）

法，建立了单层细胞培养法。单层细胞培养法的出现对细胞培养的发展起了很大的推动作用。此后单层细胞培养法便成了细胞培养普遍应用的培养方法。

3. 培养液的发展

早期的细胞培养采用天然培养基（胎汁、血浆和血清）。天然培养基成分虽然接近体内状态，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应。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 40 年来，已有几十种细胞株在无血清培养基中生长和繁殖。

随着科学技术的发展，用于动物细胞培养的各种物质条件都已进入商品化、规范化和系列化的时代。培养器皿、培养用水、培养基、血清、特殊添加剂、操作器械等物品都有专业化生产厂家，可以通过商业部门得到供应，一次性用品在细胞培养工作中的使用也越来越普遍。

三、动物细胞培养的应用

动物细胞培养技术几乎已应用到生物、医学研究的各个领域。这门技术自创立至今，已在多个学科领域甚至生产实践中发挥了巨大的作用。

（一）在生物学领域基础研究中的应用

离体培养的动物细胞具有培养条件可人为控制且便于观察检测的特点，因而可广泛应用于生物学领域的基础研究中。

1. 在细胞生物学上的应用

动物细胞培养可用于研究动物的正常或病理细胞的形态、结构、生长发育、细胞营养、代谢以及病变等微观过程。如神经细胞的增殖、突起生长、相互识别、刺激传递等机理就是通过进行各种神经细胞的培养才研究清楚的。

2. 在遗传学上的应用

除可用培养的动物细胞进行染色体分析外，还可结合细胞融合技术建立细胞遗传学，进

行遗传分析和杂交育种。

3. 在胚胎学上的应用

通过体外培养卵母细胞,并进行体外授精、胚胎分割和移植已发展成了一种较成熟的技术而应用于家畜的繁殖生产及通过试管婴儿使部分患不孕症的妇女受孕。

4. 在病毒学上的应用

培养细胞为病毒的增殖提供了场所,细胞是分离病毒的最好和最方便的基质,利用细胞培养可准确进行病毒定性和定量的研究。另外,在病毒学研究中,用培养的动物细胞代替试验动物做斑点分析,不仅方法简便、准确、费用低、而且重复性好。

5. 在药理学领域的应用

在进行药品、食品添加剂等对机体的毒性实验及其产生不良影响的安全性研究中,不能用人体试验,用动物试验成本也很高,而细胞培养技术为其提供了最简易而又可靠的方法,并对研究毒性机制提供了良好的实验对象。

(二) 在临床医学上的应用

1. 用于遗传疾病和先天畸形的产前诊断

目前,人们已经能够用羊膜穿刺技术获得脱落于羊水水中的胎儿细胞,经培养后进行染色体分析或甲胎蛋白检测即可诊断出胎儿是否患有遗传性疾病或先天畸形。

2. 用于癌症的早期诊断和预防

我国的科学工作者通过培养淋巴细胞,并对其染色体进行对比分析检测出易患癌症的病人,以便进行及早的预防和治疗。

3. 用于临床治疗

目前已有将正常骨髓细胞经大量培养后植入患造血障碍症患者体内进行治疗的报道。另外,动物细胞培养生产的生物大分子制品也可用于治疗某些疾病,如利用动物细胞培养生产的重组人促红细胞生成素(rHuEPO)在临床上可用于治疗肾衰性贫血、癌症患者化疗后贫血。

4. 用于药物效应的检测

近年来随着细胞培养技术的发展,体外培养的细胞已成为测试药物效应的常用对象。利用体外培养的动物细胞测试药物效应,不仅比动物实验经济,而且加药后药物与细胞直接接触,获得实验结果更迅速。同时,如果检测的药物具有组织特异性时,可选用相应的细胞,如检测治疗肝病的药物可选用肝细胞、检测抗癌药物可选用癌细胞。

(三) 在动物育种上的应用

目前,由于细胞培养技术、细胞融合技术、细胞杂交技术以及转基因技术的创建与相互结合,使得人们能够在细胞水平操作并改变动物的基因,进行遗传物质的重组。这样就可以按照人类的需要大幅度地改变生物的遗传组成,从而使新品种的培育在实验室中即可完成,可大大缩短育种进程,且使育种工作更加经济有效。胚胎干细胞的研究成果和克隆羊多莉的问世可以说已为动物遗传育种开辟了一条新途径。

(四) 在生物制品生产上的应用

1953年,Salk用细胞培养的脊髓灰质炎病毒制备出灭活疫苗,从而开创了疫苗研制与生产的新领域,也开创了细胞培养在疫苗、抗体、诊断类抗原等生物制品生产领域的应用。另外,利用动物细胞培养技术生产大分子生物制品始于20世纪60年代,当时是为了满足生产口蹄疫疫苗的需要。后来随着动物细胞培养技术的逐渐成熟和转基因技术的发展与应用,人们发现利用动物细胞培养技术来生产大分子药用蛋白比原核细胞表达系统更有优越性。因

为,重组 DNA 技术修饰过的动物细胞能够正常地加工、折叠、糖基化、转运、组装和分泌由插入的外源基因所编码的蛋白质,而细菌系统的表达产物则常以没有活性的包涵体形式存在。

目前,用动物细胞可生产的生物制品有各类疫苗、干扰素、激素、酶、生长因子、病毒杀虫剂、单克隆抗体等,从全球市场来看其销售额增长迅猛。如单抗在全球 1999 年的销售额仅为 12 亿美元,2002 年已经达到 40 亿美元,2004 年全球销售额大约在 103 亿美元,2011 年单抗药物的市场总量已经达到 628 亿美元,2015 年大约在 980 亿美元。未来,全球单克隆抗体药物依旧会保持较高的增长率。我国的单克隆抗体药物从无到有,并且在我国医药市场发挥着越来越重要的作用。目前我国单抗市场规模每年以 50% 以上的速度递增。

四、动物细胞培养工作的基本要求和操作方法

(一) 动物细胞培养工作的基本要求

1. 培养前准备

在开始实验前要制订好实验计划和操作程序。有关数据的计算要事先做好。根据实验要求,准备各种所需器材和物品(无菌物品的准备数要大于使用数),清点无误后将其放置操作场所(培养室、超净台)内,然后开始对超净工作台的消毒。

2. 操作野消毒

无菌培养室每天都要用 0.2% 的新洁尔灭拖洗地面一次(拖布要专用),紫外线照射消毒 30~50min。超净工作台台面用紫外线消毒至少 30min,然后启动超净台风机和照明灯,再用 75% 酒精擦拭台面即可开始实验操作。

3. 洗手和着装

原则上和外科手术相同。平时仅做观察不做培养操作时,可穿着细胞培养室内紫外线照射 30min 的清洁工作服。在利用超净台工作时,因整个前臂要伸入箱内,应着长袖的清洁工作服,并于开始操作前用肥皂洗手,再用 75% 的酒精擦拭手。如果实验过程中手触及可能污染的物品和出入培养室都要重新用消毒液洗手。进入原代培养室需彻底洗手还要戴口罩、着消毒衣帽。

4. 火焰消毒

在无菌环境进行培养或做其他无菌工作时,首先要点燃酒精灯或煤气灯。以后一切操作,如安装吸管帽、打开或封闭瓶口等,都需在火焰近处并经过烧灼进行。但要注意:金属器械不能在火焰中烧的时间过长,烧过的金属镊要待冷却后才能夹取组织,以免造成组织损伤。吸管使用前其使用端要经火焰消毒,吸取过营养液后的吸管不能再用火焰烧灼,因残留在吸管头中的营养液能烧焦形成炭膜,再用时会把有害物带入营养液。开启、关闭装有细胞的培养瓶时,火焰灭菌时间要短,防止因温度过高烧死细胞。另外,胶塞过火焰时也不能时间长,以免烧焦产生有毒气体,危害培养细胞。

5. 实验中的操作要求

进行培养时,动作要准确敏捷,但又不必太快,以防空气流动,增加污染机会。不能用手触及已消毒器皿,如已接触,应先用酒精棉擦拭再用火焰烧灼消毒或取备用品更换。为拿取方便,工作台面上的用品要有合理的布局,原则上应是右手使用的东西放置在右侧,左手用品在左侧,酒精灯置于中央。工作由始至终要保持一定的顺序性,组织或细胞在未做处理之前,勿过早暴露在空气中。同样地,培养液在未用前,不要过早开瓶;打开的瓶口要顺风斜放在支架上或远处;试剂用过之后如不再重复使用,应立即封闭瓶口,因直立可增加落菌机会。吸取营养液、PBS、细胞悬液及其他各种用液时,均应分别使用不同吸管,做到专管

专用,以防扩大污染或导致细胞交叉污染。工作中不能面向操作野讲话或咳嗽,以免唾沫把细菌或支原体带入工作台面发生污染。手或相对较脏的物品不能经过开放的瓶口上方,瓶口最易污染,加液时如吸管尖碰到瓶口,则应将吸管丢掉。

(二) 动物细胞培养工作方法

细胞培养是一项程序比较复杂、需求条件多而严格的实验性工作,工作时必须注意以下几点。

① 将所有的操作程序如洗刷、配液、消毒等制定出统一的规范和要求,并在一定时间内保持相对稳定,同时要求人人遵守。

② 各种用液(培养液、胰蛋白酶、Hank's 液、 NaHCO_3 、抗生素液),均应由专人负责配制,并保证做到制备浓度精确、灭菌可靠。所有制备好的溶液和试剂瓶上都要贴有标签,注上名称、浓度、消毒与否、制备日期及使用人。

③ 一切培养用品都要有固定的存放地点,其中尤为重要的是:培养用品与非培养用品应严格分开;已消毒与未消毒品应严格分开存放。

一切措施都是为了避免各种杂质混入细胞生存环境,防止微生物感染和细胞“污染”。所谓细胞污染,即细胞间的交叉污染,是指不同的细胞之间因操作不严造成的相互混杂,使细胞群体不纯的现象,近年来世界上不少实验室都出现过这种事故,应引起注意。

【难点自测】

一、名词解释

细胞培养、组织培养、器官培养

二、填空题

1. 体外培养(或组织培养)主要包括_____、_____和_____三种类型。
2. _____的实验开创了动物组织和细胞培养的先河,他建立了_____培养法。
3. 在卡氏瓶原理的启发下,出现了试管培养,继而又出现了多种类型的_____、培养皿和_____的培养。从 20 世纪 40 年代开始,大多数培养工作都过渡到用_____培养。
4. 在动物细胞培养方法的发展过程中,具有历史意义的培养方法有:盖玻片悬滴培养法、_____、_____和目前普遍应用的单层细胞培养法。
5. 早期细胞培养采用_____培养基,现在广泛采用添加_____的_____培养基,近二十年来,动物细胞培养基朝着_____培养基的方向发展。

三、问答题

1. 动物细胞培养技术现已应用到哪些领域?请举例说明。
2. 动物细胞培养有哪些基本要求和工作方法?
3. 为什么在细胞培养过程中要保证最大程度的无菌?
4. 为什么将吸管插到吸耳球中、打开或封闭瓶口等,都需在火焰近处并经过烧灼进行?