

动物组织培养入门

[英] J. A. 夏普 著



动物组织培养入门

〔英〕 J. A. 夏普 著

章静波 王瑞珍 译

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书是英国出版的《生物学研究》丛书之一(no.82)。全书共分引论、培养基、器皿与技术、检验方法和体外培养的基本组织等五章,简明扼要地介绍了进行动物细胞和组织培养所必须的基本知识和技术。

本书可供生物、医、农专业的学生、从事体外培养的医务工作者和一般生物科研人员参考。

J. A. Sharp
An Introduction to Animal Tissue Culture
Edward Arnold, 1977

动物组织培养入门

〔英〕J. A. 夏普 著
章静波 王瑞珍 译
责任编辑 朱博平

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年5月第 一 版 开本: 787×1092. 1/32
1982年5月第一次印刷 印张: 2 3/8
印数: 0001—5,300 字数: 42,000

统一书号: 13031·1843

本社书号: 2503·13—10

定价: 0.40元

总 序

当前要使一本教科书既能概括整个生物学领域，又能充分反映其最新成果，这已经是不再可能的了。同时，中学和大专院校的师生们还需要掌握这个学科的最新动向和了解哪些领域有了重大发展。

为了满足进一步探求这些知识的需要，几年来我们生物研究所主持编辑了这套小丛书，题目由专门编辑小组精心选定，并受到中学和大专院校师生们对这套小丛书的热情欢迎，这就表明这套书的选题范围，特别是在研究方面和观点的进展方面，以及阐述简明而内容新颖，对读者是具有实用价值的。

这套小丛书的特点是注意研究方法，并尽可能为实际工作提出建议。

作者和本研究所主管教育负责人欢迎读者批评。

生物研究所 伦 敦

前 言

最早证明动物组织体外培养为一种有用的实验性技术是在1907年。此后，愈来愈多的生物学家应用组织培养技术，使这门技术日趋发展与完善。如今，组织培养已成为生物学与医学研究中最有成效的方法之一。这本小册子介绍的是成功地进行动物细胞与组织培养应具备的基本知识和技巧，目的在于帮助读者正确了解某些最常用培养技术的应用范围和局限性。或许，它们最大的效果是使我们能研究活细胞的结构与行为。此外，本书还简要地讨论了类如相差显微镜的某些辅助性技术方法，因为应用这些方法可以从组织培养中获得有科学价值的资料。对我来说，观察和描述培养细胞的活动具有无限的魅力。因此，我试图在最后一章中对此作一些介绍，以阐明每种基本组织的细胞体外培养的某些特征。

J. A. 夏普 利兹

目 录

1	引 论	(1)
1.1	组织培养的诞生与发展	(1)
1.2	组织培养术语的定义	(7)
2	组织培养基	(9)
2.1	培养基的基本特性	(10)
2.2	天然培养基	(10)
2.3	合成培养基	(13)
2.4	抗菌素	(17)
2.5	培养基的灭菌	(18)
3	组织培养的器皿与技术	(20)
3.1	马克西莫双盖片法	(20)
3.2	转管	(21)
3.3	长颈瓶、普通培养瓶及陪替氏碟	(22)
3.4	显微术用的小室	(24)
3.5	器官培养	(28)
3.6	器皿的清洗与灭菌	(30)
4	检查培养物的方法	(32)
4.1	固定与染色	(32)
4.2	电子显微镜术	(34)
4.3	光学显微镜术	(35)
4.4	缩时电影显微照相术	(40)
4.5	生长的测定	(42)
5	体外培养的基本组织	(44)
5.1	上皮组织	(45)

5.2 结缔组织.....	(49)
5.3 肌肉.....	(57)
5.4 神经组织.....	(60)
5.5 细胞运动.....	(65)

1.1 组织培养的诞生与发展

本世纪初，研究神经系统发生的生物学家们对于神经细胞轴突最初在胚胎中形成的方式存在着不同的看法，这种争论一直持续了很久。1886年胚胎学家希斯 (Wilhelm His) 提出假说，认为原始的胚胎神经元或成神经细胞的细胞质向外突起而形成轴突，它不断地延伸，直至其前端与周围感觉器官或肌肉纤维接触时为止。1890年卡贾尔 (Santiago Ramon y Cajal) 应用胚胎神经组织切片的银渍染色技术研究神经元的发生，结果支持了希斯的学说。然而，反对希斯和卡贾尔的学者却坚持“细胞链”的理论 (“cell-chain” theory)，此理论认为，从成神经细胞到某种受神经支配的周围组织之间有许多原为分散的细胞，这些连贯的链细胞融合便形成了轴突。

后来，美国动物学家哈里森 (Ross Granville Harrison) 对于外周神经系统的发育深感兴趣。他根据他的研究结果发表了许多有关鱼类和两栖类胚胎外周神经组织发生的科学论文，并得出结论认为希斯和卡贾尔的假说可能是正确的。但是，用他自己的话来说：“用普通组织学方法尚不能肯定地

回答神经纤维的起源问题。”他认为要解决此问题，最好设计出一种能在生活状态下直接观察正在生长的神经末端的方法，以便能得到关于胚胎发育期间神经纤维从神经中枢延伸到外周所发生的变化正确概念。

抱着这个目的，哈里森首先解剖出蛙胚原始脊髓的节段，将它们放入生理盐水内，然而组织块未能存活下来而崩溃解体了。以后他又试用过半固体培养基(明胶)，但仍然失败了。接着于1907年春，他设计出一种很有成效的方法。下面是他在同一年发表的有关这个方法的首次描述：

“使用的方法是分离已知能产生神经纤维的胚胎组织小块，……并观察它们进一步的发育。从长约3毫米的，神经褶闭合后不久的蛙胚取出小块，此时尚未有肉眼可见的分化的神经成分。小心切下一片组织后，即用精细的小吸管将此组织小块移至一块事先滴有从成体蛙淋巴囊吸取的新鲜淋巴的盖片上。淋巴很快凝固，使组织小块固定在一定的位置上。然后将盖片倒置于一块中间凹陷的厚载片上，盖片的周缘用蜡封固(图1-1)。只要采取适当的无菌操作技术，在此条件下，组织能够存活一周，在某些情况下这个标本还可以存活将近四周。这些标本用高倍显微镜能很容易地每天进行观察。”

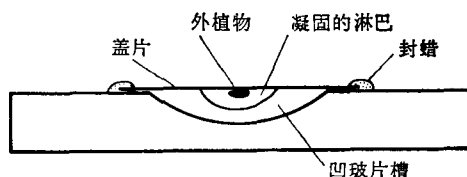


图1-1 哈里森悬滴培养法

毫不奇怪，哈里森必须解决的一个问题是防止培养物被细菌污染，这曾使他多次尝试归于失败，虽然他发现“准备

仪器要化费许多时间，谨慎的繁琐操作令人疲惫，每天能完成的实验却寥寥无几”，但他持之以恒，最后终于建立起一套合理的无菌操作技术。

哈里森的耐性得到了应有的报偿。他成功地在体外培养基(凝结的淋巴)中培养了神经元，从而排除了所有其它活组织参与的可能性，并且能够按小时地观察轴突从成神经细胞长出来，有力地证实了希斯和卡贾尔的理论(图1-2)。

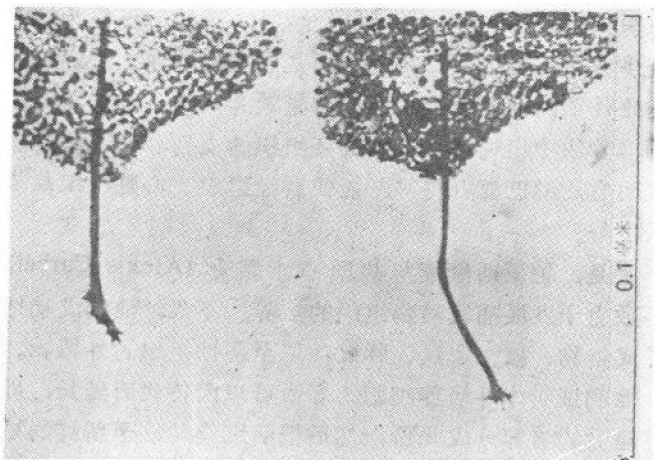


图1-2 哈里森绘图之一，显示体外培养的神经纤维在25分钟时间内的延伸

事实上，哈里森并非是使细胞在体外存活的第一个人。早在1885年劳斯(Wilhelm Roux)已把一小片鸡胚组织培养于温盐水中，它们存活了好几天。此外阿罗德(Arrol)于1885年，乔利(Jolly)于1903年曾把青蛙或蝶螈的白细胞输注于生理盐水或血清中，观察到活细胞的运动及分裂。但是，现在一般皆公认哈里森为组织培养之父，因为他的实验表明，为细菌学家早已应用的凹玻片悬滴制备培养技术，不仅可以维持组织体外生长数周，而且是一种能对生物学知识作出十分重要贡献的研究方法。

由于哈里森的发明才能和坚持实验，他成功地建立了能解决当时问题的这种技术。他还通过发表文章和演讲，间接地吸引了许多其他科学家注意到组织培养的潜在重要性，从而作出有意义的贡献。然而，他本人没有使这项技术得到进一步完善。实际上，最初对本方法作出重大改进的是一位美国医生伯罗斯(M. T. Burrows)，他于1910年在哈里森实验室工作了数月，学习了这种技术。当时伯罗斯对培养温血动物的组织很感兴趣，因为那时已很明显，青蛙淋巴作为培养基有许多有待改进之处，部分原因是它不能形成很坚实的凝块，此外还因为要得到足够的数量颇为困难。伯罗斯决定在悬滴培养法中用鸡血浆作为鸡胚组织的支持和营养物质。事实证明它比淋巴要好得多，能使神经组织、心脏组织及皮肤生长良好。

于是，伯罗斯继续与其同事卡雷尔(Alexis Carrel)合作，致力于发展哺乳动物组织的培养。不久，他们成功地培养了成年狗、猫、家鼠、豚鼠，以至恶性组织的外植物。此外，他们证明体外培养细胞的寿命可以因传代而延长，即可把已建立的培养分成几份，然后把活细胞转移至新鲜的培养基中。卡雷尔和伯罗斯还证明，若把胚胎提取液(鸡胚匀浆的组织“汁”)与血浆混合使用，培养物可存活与生长得更好一些。

卡雷尔在进一步改进组织培养技术方面也作出了很大的贡献。他原是个外科医生，他把严格的外科无菌操作引进到组织培养技术中来。事实上，他所发展的方法给其他生物学家留下的印象是：组织培养是一项十分费力而昂贵的工作。然而，他指出，用反复传代的方法使细胞株存活34年之久是可行的。他的这一成就在很大程度上归功于他所发明的卡氏培养瓶(Carrel flask, 图1-3)。使用这种瓶能容易地避免

组织的偶然性污染，同时也简化了许多维持长期培养所需的操作。

两位美国科学家W·H·刘易斯 (Lewis) 和M·R·刘易斯从另一个角度研究了培养技术。他们最先试图用已知成分的合成培养基取代不能正确肯定其成分的天然培养基（血浆及胚胎提取液）。由于他们以及其他许多科学家在此后30年的努力，终于发展出许多合成培养基。现在这些培养基都已定型，可现成购得。由于有了人工合成的培养基，可以大量减少天然培养基的比重，甚至在一定程度上细胞可以在已知成分的纯合成培养基中生长。

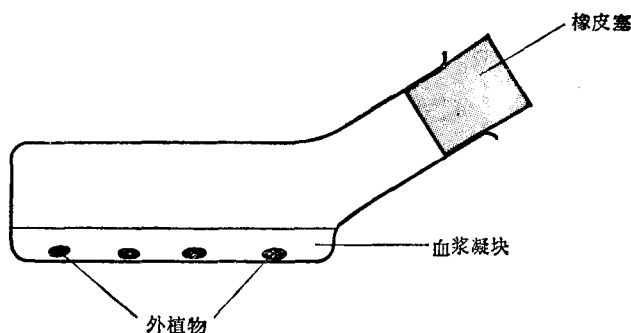


图1-3 卡氏培养瓶

培养方法的另一次主要进展不在美国，而是在英国。它使人们有可能用一种十分不同的方法进行组织培养，其目的在于维持小块组织，以至整个胚胎器官的体外生长，藉此保持它们正常的组织学结构，并防止从外植物新长出的细胞生长紊乱。一般称这种技术为器官培养。剑桥的斯特兰奇韦斯 (Strangeways) 研究实验室的费尔 (Honor Fell) 夫人使此方法更臻完善。她在1929年发表的论文中是这样描述这个方

法的：事先准备好置有小鸡血浆与胚胎提取液混合形成凝块
的表玻皿，把鸡胚器官原基置于凝块上，再将表玻皿置于陪
替氏碟内，同时在碟内备有湿润的棉花(图 1-4)。外植物

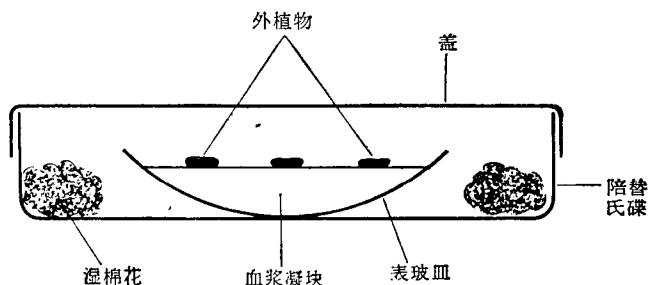


图1-4 表玻皿器官培养法

从下面的血浆凝块中吸取营养，同时从与之接触的空间中吸
取氧气。这样细胞从外植物中迁移出去的倾向极小。费尔及
其同事使用这种技术培养骨和关节组织，给了我们大量有关
这些组织发育的知识。

在过去70年中，对组织培养技术的改进作出过贡献，并
把它日益广泛地用于生物学研究中去。科学工作者很多，但
在这个简短的导论里，我们只能提及其中的少数几位。从下
述事实可看出这些方法得到了愈来愈广泛的应用：在1927年
发表的组织培养参考文献目录(包括前两年的)计有400篇，而
在1974年的1月至12月的医学年度索引中有关组织培养的论
文超过三万篇。由于应用了动物或人体细胞的培养技术，从
而在某些方面取得了十分有意义的成绩，其中包括1956年证
实人染色体的正确数目，以及稍后又发现唐氏综合症(Dow-
n's syndrome)是由于出现额外染色体所致。在病毒学领域
里，细胞培养的应用使病毒培养更为简化，对于建立脊髓灰
白质炎免疫也作出了极为重要的贡献。此外，由于最近在体

外细胞培养中应用了电子显微镜术，人们对细胞运动机制有了更深入的了解。

1.2 组织培养术语的定义

随着组织培养的发展，不可避免地会在正确理解各种术语上出现混乱现象。于是，导致成立一个命名委员会，并于1967年发表了关于“建议使用的动物组织培养术语”的报告。下列是一些最常用术语的定义。

动物组织培养 (Animal tissue culture)：是指从动物取得细胞、组织和器官外植块，并在体外维持或生长24小时以上。根据细胞、组织或器官是否能维持或生长，发展成下述两种培养方法。

细胞培养 (Cell culture)：这一术语用于表示包括单个细胞培养在内的细胞体外生长。在细胞培养中，细胞不再构成组织。

器官培养 (Organ culture)：此术语指的是组织、器官原基，以至整个器官或其一部分在体外的维持或生长，它们可以分化与保持原来结构和(或)功能。

其他常用的术语如下：

细胞系 (Cell line)：来源于经第一次传代的原代培养，它由原先存在于原代培养中的细胞的许多谱系组成。

细胞株 (Cell strain)：是由具有某些特性与标志的细胞选择或克隆化而派生的，这些特性或标志在尔后的培养中必须保持下去。

克隆 (Clone)：由单个细胞经有丝分裂衍生而来的一组细胞群体。

外植物 (Explant)：用于开始体外培养而切下的一小块

组织或器官。

单层 (Monolayer)：生长于表面的单层细胞。

原代培养 (Primary culture)：直接从有机体取下细胞、组织或器官，开始进行培养。

再次培养或传代 (Subculture)：把细胞从一个培养器皿中移植至另一器皿中。

悬浮培养 (Suspension culture)：细胞悬浮于培养基中并进行增殖的一种培养方法。

2

组织培养基

现存后生动物所有的单个细胞都生活在有十分精确控制的环境里。在体内，细胞的表面膜暴露于细胞外组织液中，并从组织液中取得细胞存活所必需的物质，如水、无机盐、氨基酸、维生素、葡萄糖、氧气等等，同时又将代谢产物排入其中。组织液的某些特性保持在一定的小范围内；因此，哺乳动物体液的pH值保持在7.4，渗透压与0.9%氯化钠溶液的渗透压相当，并且在正常情况下是无菌的。此外，在鸟类与哺乳类，细胞的环境温度受到相当精细的调节。

体内的细胞对其他组织和器官有着密切的依赖关系；它们依靠肝、肾和肺来控制组织液的成分、pH值和渗透压，依靠造血组织来防御外来的感染；依靠神经系统来调节温度。当从动物体切取活的细胞时，它们便立即失去所有这些生理性的支持和保护机制。如果要想让这些细胞在体外继续存活，那么必须给予它们一个尽可能类似于体内的人为环境，这十分酷似宇航员在外层空间的情况，他必须处于一个密封的保护舱内，并装备有维持生命的机械设施。

2.1 培养基的基本特性

要使细胞体外培养获得成功，最关键的因素是培养基的成分和特性。为此，培养基必须具有下述基本条件。

1. 营养物质

培养基必须供给活细胞所需要的全部盐类、氨基酸、脂类、糖类、维生素等等。

2. 缓冲能力

培养基必须含有非毒性的缓冲液，而且即使细胞产生酸性物质，仍能保持pH值在7.0—7.3之间。

3. 等渗性

溶解于培养基的物质浓度所产生的等渗性必须与细胞外的液体一致。如果培养液是高渗的，细胞会失去水分并发生皱缩。如果培养基是低渗的，细胞就会吸收水分而膨胀。

4. 无菌

培养基不能有微生物。倘若有的话，则这些微生物便会利用培养基中的适于它们迅速繁殖的良好条件，很快增殖起来，并破坏培养的活细胞。

培养基可分为不同的两类，即天然培养基和合成培养基。前者由动物的体液或组织衍生而来；后者的精确定义是溶于纯净水的某些物质的混合物。

2.2 天然培养基

2.2.1 小公鸡血浆

在前一章中已经谈到最初成功的组织培养有赖于天然培养基，其中小公鸡血浆很快就成为最常用的了。它可达到两