

高职高专系列教材

GAOZHI GAOZHUAN  
XILIE JIAOCAI

# 动物细胞 培养技术

DONGWU XIBAO PEIYANG JISHU

周珍辉 主编

中国环境科学出版社

高职高专系列教材

# 动物细胞 培养技术

DONGWU XIBAO PEIYANG JISHU

周珍辉 主编

中国环境科学出版社·北京

**图书在版编目 (CIP) 数据**

动物细胞培养技术 / 周珍辉主编. —北京: 中国环境科学出版社, 2006.8

(高职高专系列教材)

ISBN 7-80209-316-3

I. 动… II. 周… III. 动物—细胞培养—高等学校: 技术学校—教材 IV. Q954.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 099599 号

**责任编辑** 张玉海

**责任校对** 扣志红

**封面设计** 陆 臻

---

**出版发行** 中国环境科学出版社  
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)

网 址: <http://www.cesp.cn>

联系电话: 010-67112765 (总编室)

发行热线: 010-67125803

**印 刷** 北京东海印刷有限公司  
**经 销** 各地新华书店  
**版 次** 2006 年 8 月第一版  
**印 次** 2006 年 8 月第一次印刷  
**印 数** 1-3000  
**开 本** 787×960 1/16  
**印 张** 17.75  
**字 数** 370 千字  
**定 价** 35.00 元

---

**【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 侵权必究】**

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

# 高职高专系列教材

编写委员会

北京农业职业学院

赵晨霞 李玉冰 王晓梅 周珍辉

江苏畜牧兽医职业技术学院

葛竹兴 刘靖 曹斌 高勤学 朱善元

锦州医学院畜牧兽医学院

曲祖乙 王玉田

黑龙江生物科技职业学院

王鹏 蔡长霞 马贵民

广西农业职业技术学院

杨昌鹏

杨凌职业技术学院

马文哲

江西生物科技职业学院

徐光龙

上海农林职业技术学院

张江



# 高职高专系列教材

## 审读委员会

江苏食品职业技术学院	贡汉坤
杨凌职业技术学院	陈登文 陈淑茗
黑龙江农业经济职业学院	杜广平 张季中
苏州农业职业技术学院	潘文明 夏红
吉林农业科技学院	孙艳梅
扬州大学兽医学院	秦爱建
复旦大学生命科学学院	黄伟达
中国农业大学实验动物中心	张冰
中国绿色食品发展中心	张志华
国家环保总局有机食品发展中心	周泽江
江苏省兽药监察所	王苏华
江苏省农业科学院兽医研究所	戴鼎震

# 前 言

细胞培养是一门实践性很强的学科，其基础理论涉及面较广。但是从应用角度来说，它仍是一种方法和技术学科，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领域。考虑到高等职业院校对技能型人才的培养要求，本书在编写时突出了实用性与技能性。

本书详细地介绍了动物细胞培养及单克隆抗体生产的关键技术。全书共有七章，除第一章第一节、第四章第一节及第六章第一节讲授基本理论和概念外，其他各章的每一节分为资料单和技能单两部分。资料单部分主要介绍相关的理论知识，技能单部分介绍必须掌握的一项或多项技能。全书共有实验操作技能 45 个。本课程在讲授时应以实验操作为主，宜采用边讲边练的方式进行。教师边讲授理论内容边演示操作技能，学生对技能单内容进行实验操作训练，有利于理论与实践的结合、基本功训练和操作技能的培养。

本书在内容的编排上由浅入深，紧密衔接，注重知识的整体性和系统性。第一章主要训练学生学会使用和保养细胞培养实验室的设备，认识细胞培养用的器材，学会清洗液的配制，进行培养器材的清洗包装消毒，学会使用正压式除菌滤器及一次性滤器，为第二章细胞培养用液的配制做好准备。第二章主要训练学生学会 BSS 液、Hank's 液、细胞消化液、常用抗生素溶液、DMEM 培养液、RPMI-1640 培养液的配制技能，并让学生了解它们的用途，为第三章细胞培养技能及以后相关章节的技能操作打下基础。第三章主要训练学生学习组织的取材与消化技能、细胞计数技术、细胞密度的换算、鸡胚细胞及小鼠胎儿细胞的原代培养和传代培养技术、培养细胞的纯化技术、培养细胞的常规检查技能、细胞活性检查方法、培养细胞染色体的染色及观察技能、细胞生长曲线的绘制方法、细胞的克隆形成实验等技能，为第四章病毒的细胞培养技术及后面相关章节的技能操作打下基础。第四章主

要训练学生掌握病毒的细胞培养技能,观察细胞病变、病毒的蚀斑技术,单层细胞微量中和试验等技能。第五章主要训练学生掌握细胞的冻存与复苏技术。第六章的技能是前五章技能的综合与提高,主要训练学生掌握 McAb 的制作技术,包括动物免疫技术、骨髓瘤细胞的培养与观察、饲养细胞的制备技能、细胞融合技术、杂交瘤的培养观察技能、McAb 的筛选与检测技能、阳性杂交瘤的克隆化技术、腹水制备 McAb 及检测技术等。第七章主要训练学生掌握冲卵液的配制、小鼠的胚胎细胞回收与检胚技术、卵母细胞的采集技术、卵子体外成熟用培养液的配制、卵母细胞的体外培养及观察、胚胎干细胞的培养技能等。

本教材内容丰富、技术性和实用性强、图文并茂,可作为高等职业院校生物技术及应用专业、医药专业的教材。

本教材主编是北京农业职业学院周珍辉,参加编写的人员有江西生物科技职业学院张明、上海农林职业技术学院王金福、黑龙江生物科技职业学院边亚娟、北京农业职业学院程鹏。杨凌职业技术学院陈淑茗担任本教材主审。

本教材在编写过程中,特别是在拍摄图片素材时,得到了军事医学科学院流行病学研究所分子病原研究室陈万荣研究员、周育森研究员的大力支持和鼎力相助,在此对他们表示衷心感谢。

本教材编写人员虽然各具相应的专业特长,且都是多年从事高职一线教育的老师,但由于时间仓促,知识和能力有限,整理撰写过程中难免有所遗漏、不尽完善和错误之处,敬请同行及广大读者多提宝贵意见,以使其更加完善。

编 者

2006年7月

# 目 录

第一章 细胞培养概述及细胞培养前的准备工作 .....	1
第一节 细胞培养概述 .....	1
资料单 .....	1
一、细胞培养的发展史 .....	1
二、细胞培养的基本概念及优缺点 .....	3
三、细胞培养的作用 .....	4
四、细胞培养实验的基本要求 .....	7
五、与细胞培养相关的专业术语 .....	8
第二节 细胞培养实验室的设置及设备 .....	13
资料单 .....	13
一、细胞培养实验室的设置 .....	14
二、细胞培养实验室的设备 .....	16
技能单 1 细胞培养实验室设备的使用、保养和作用 .....	18
一、超净工作台 .....	19
二、培养箱 .....	20
三、倒置显微镜 .....	22
四、冰箱 .....	23
五、干热灭菌箱 .....	23
六、高压蒸汽灭菌器 .....	24
七、离心机 .....	26
八、液氮罐 .....	27
技能单 2 认识常用细胞培养的器材 .....	28
一、细胞培养瓶 .....	28
二、培养皿 .....	29
三、多孔培养板 .....	29
四、加样器及吸头 .....	30
五、其他与培养操作有关用品 .....	31



第三节 细胞培养用品的清洗和消毒灭菌 .....	32
资料单 .....	32
一、培养用品的清洗 .....	32
二、包装 .....	34
三、培养用品的消毒灭菌 .....	34
技能单 1 清洗液的配制及培养器材的清洗、包装与消毒 .....	38
一、清洗液的配制 .....	38
二、玻璃器皿的清洗、包装、消毒 .....	39
三、橡胶制品的清洗、包装、消毒 .....	42
四、塑料制品的清洗 .....	42
五、器材包装时应注意事项和要求 .....	42
技能单 2 正压式除菌滤器及一次性滤器的使用 .....	43
一、正压除菌滤器 .....	43
二、小型针头滤器的使用 .....	44
第二章 细胞培养用液和培养液 .....	46
第一节 细胞培养用液 .....	46
资料单 .....	46
一、水和缓冲溶液 .....	47
二、生理盐水和平衡盐溶液 .....	48
三、其他常用液 .....	49
技能单 1 常用 BSS 液的配制 .....	52
一、Hank's 液的配制 .....	52
二、D-Hank's 液的配制 .....	53
三、配制 BSS 液的要求 .....	54
四、Hank's 液的作用 .....	54
技能单 2 常用细胞消化液的配制 .....	55
一、0.25%胰蛋白酶溶液的配制 .....	55
二、0.02% EDTA 的配制 .....	56
三、0.02% EDTA+0.25%胰蛋白酶 (1:1) 混合液的配制 .....	56
技能单 3 常用抗生素溶液的配制 .....	57
一、青霉素、链霉素 (双抗) 液 .....	58
二、卡那霉素液 .....	58

三、制霉菌素液 .....	58
第二节 细胞培养液 .....	59
资料单 .....	59
一、培养细胞的生长条件 .....	59
二、培养液(基) .....	64
技能单1 DMEM 培养液的配制 .....	80
一、配方 .....	81
二、合成培养液的配制 .....	81
技能单2 PRMI-1640 溶液的配制 .....	83
一、不完全 RPMI-1640 培养液配方 .....	83
二、合成培养液的配制 .....	83
<b>第三章 细胞培养的基本技术 .....</b>	<b>85</b>
第一节 培养细胞的取材与分离 .....	85
资料单 .....	85
一、培养室内的无菌操作 .....	85
二、培养细胞的取材 .....	87
三、组织材料的分离 .....	89
技能单1 组织的剪切与消化技术 .....	92
技能单2 细胞计数技术 .....	93
技能单3 细胞密度换算 .....	95
第二节 原代培养 .....	96
资料单 .....	96
一、组织块培养法 .....	97
二、消化培养法 .....	98
三、器官培养 .....	99
技能单1 鸡胚原代细胞的培养 .....	100
一、鸡胚的孵育 .....	100
二、鸡胚的发育过程 .....	100
三、操作步骤 .....	101
技能单2 小鼠胎儿细胞的原代培养 .....	103
一、组织块培养法 .....	104
二、消化培养法 .....	105

<b>第三节 传代培养和细胞系的维持</b> .....	106
<b>资料单</b> .....	106
一、原代培养的首次传代 .....	107
二、细胞传代方法 .....	107
三、细胞系的维持 .....	109
四、培养细胞的纯化 .....	109
<b>技能单 1 细胞传代技术</b> .....	111
<b>技能单 2 培养细胞的纯化</b> .....	114
一、酶消化法 .....	114
二、反复贴壁法 .....	114
<b>第四节 培养细胞的特性及观察</b> .....	115
<b>资料单</b> .....	115
一、培养细胞的生长方式及类型 .....	115
二、培养细胞的生长特点 .....	117
三、培养细胞的生长过程 .....	119
<b>技能单 1 培养细胞常规检查</b> .....	124
一、培养细胞常规检查的意义 .....	124
二、检查营养液 pH 值 .....	124
三、细胞污染的检查及排除 .....	125
四、健康细胞与衰老死亡细胞的观察 .....	129
<b>技能单 2 细胞活性检查</b> .....	130
一、原理 .....	130
二、配制染色液 .....	130
三、制备细胞悬液 .....	130
四、染色 .....	131
<b>技能单 3 培养细胞染色体的染色及观察</b> .....	132
<b>技能单 4 细胞生长曲线的绘制</b> .....	134
<b>技能单 5 细胞的克隆形成实验</b> .....	135
一、概述 .....	135
二、平板克隆形成实验 .....	136
三、软琼脂克隆形成实验 .....	136
四、平板琼脂克隆培养法 .....	137
五、提高克隆形成率的方法 .....	137

<b>第四章 病毒的细胞培养技术</b> .....	139
<b>第一节 病毒的结构及生物学特性</b> .....	139
资料单 .....	139
一、病毒的基本特征 .....	140
二、病毒的形态结构 .....	141
三、毒粒的化学组成 .....	143
四、病毒的复制 .....	145
五、病毒的培养 .....	148
六、病毒的生物学特性 .....	148
<b>第二节 病毒的细胞培养</b> .....	151
资料单 .....	151
一、细胞培养用于病毒研究的优点 .....	151
二、用细胞培养分离病毒 .....	152
三、用细胞培养法制备病毒血清学抗原 .....	157
技能单 1 病毒的细胞培养技术 .....	158
一、制备病毒悬液 .....	158
二、将病毒接种于培养细胞 .....	159
技能单 2 观察细胞病变 .....	160
<b>第三节 病毒的鉴定技术</b> .....	163
资料单 .....	163
一、病毒蚀斑技术 .....	163
二、病毒蚀斑抑制试验 .....	167
三、细胞培养系统中的中和试验 .....	168
技能单 1 病毒的蚀斑技术 .....	173
一、配制双层营养琼脂糖 .....	173
二、操作步骤 .....	173
技能单 2 单层细胞微量中和试验 .....	175
<b>第五章 细胞冻存、复苏及运输</b> .....	177
<b>第一节 细胞的冻存</b> .....	177
资料单 .....	177
一、细胞冻存的意义 .....	177
二、细胞的冻存原理 .....	178

技能单 细胞冻存技术 .....	179
一、培养瓶培养细胞的冻存 .....	179
二、骨髓瘤细胞的冻存 .....	181
第二节 细胞的复苏及运输 .....	182
资料单 .....	182
一、细胞的复苏 .....	183
二、培养细胞的运输 .....	185
技能单 细胞的常规复苏技术 .....	186
<b>第六章 单克隆抗体 (McAb) 生产技术 .....</b>	<b>188</b>
第一节 杂交瘤技术的概述 .....	188
资料单 .....	188
一、杂交瘤技术发展简史 .....	188
二、杂交瘤技术的概念与分类 .....	189
三、单克隆抗体的概念及特性 .....	189
四、单克隆抗体产生的原理 .....	191
第二节 动物免疫 .....	193
资料单 .....	193
一、抗原的纯度问题 .....	193
二、免疫动物的选择 .....	193
三、免疫 .....	194
技能单 动物免疫技术 .....	197
一、颗粒性抗原的免疫方法 .....	197
二、可溶性抗原的免疫方法 .....	197
第三节 骨髓瘤细胞的准备 .....	199
资料单 .....	199
一、骨髓瘤细胞系的种类 .....	199
二、骨髓瘤细胞系的选择 .....	200
三、骨髓瘤细胞的培养 .....	201
四、血清的筛选 .....	203
技能单 骨髓瘤细胞的复苏及培养观察 .....	204
第四节 饲养细胞及其制备 .....	206
资料单 .....	206



一、饲养细胞及其作用 .....	206
二、饲养细胞的类型 .....	206
技能单 饲养细胞制备技术 .....	207
第五节 细胞融合 .....	209
资料单 .....	209
一、细胞融合 .....	209
二、细胞融合剂的选择 .....	210
技能单 1 细胞融合用主要试剂的配制 .....	211
一、不完全 RPMI-1640 培养液 .....	212
二、完全 RPMI-1640 培养液 .....	212
三、氨基喋呤 (A) 贮存液 (100x, $4 \times 10^{-6}$ mol/L) .....	212
四、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷 (HT) 贮存液 [ $100\text{H}: 10 \sim 2$ mol/L; $\text{T}: 1.6 \times (10 \sim 3)$ mol/L] .....	212
五、HAT 培养液 .....	213
六、HT 培养液 .....	213
七、50% PEG .....	213
技能单 2 制备免疫脾细胞悬液 .....	213
技能单 3 制备骨髓瘤细胞悬液 .....	215
技能单 4 细胞融合技术 .....	215
第六节 杂交瘤的培养及观察 .....	217
资料单 .....	217
杂交瘤细胞的选择性培养 .....	217
技能单 杂交瘤的培养观察 .....	220
第七节 单克隆抗体的筛选与检测 .....	221
资料单 .....	221
一、概述 .....	221
二、ELISA 原理 .....	222
三、ELISA 间接法 .....	223
技能单 1 ELISA 试剂的配制 .....	223
技能单 2 ELISA 间接法筛选杂交瘤阳性孔法 .....	225
第八节 杂交瘤的克隆化及冻存与复苏 .....	227
资料单 .....	227
一、杂交瘤克隆化概述 .....	227

二、杂交瘤克隆化方法 .....	228
三、杂交瘤细胞的冻存与复苏 .....	230
技能单 1 克隆化技术 1——有限稀释法 .....	231
技能单 2 克隆化技术 2——软琼脂法 .....	233
技能单 3 克隆化技术 3——单细胞显微操作法 .....	234
第九节 单克隆抗体的大量制备及影响因素和失败原因分析 .....	235
资料单 .....	235
一、单克隆抗体的制备 .....	235
二、单克隆抗体的鉴定 .....	236
三、McAb 的影响因素和失败原因分析 .....	237
技能单 1 腹水制备单克隆抗体法 .....	238
技能单 2 ELISA 间接法检测腹水中抗体滴度 .....	241
<b>第七章 卵细胞及胚胎干细胞培养技术 .....</b>	<b>243</b>
<b>第一节 卵细胞 .....</b>	<b>243</b>
资料单 .....	243
一、卵泡的发育及其形态特点 .....	243
二、卵子 .....	245
三、卵母细胞的采集和成熟培养 .....	247
四、受精卵(胚胎)的早期发育 .....	251
五、早期胚胎的体外培养 .....	253
技能单 1 冲卵液的配制 .....	255
技能单 2 屠宰家畜卵巢卵母细胞的采集 .....	256
技能单 3 活体卵巢卵母细胞的采集 .....	257
技能单 4 猪卵母细胞的体外成熟培养 .....	258
技能单 5 小鼠的胚胎回收与检胚 .....	260
<b>第二节 胚胎干细胞培养 .....</b>	<b>261</b>
资料单 .....	261
一、早期胚胎来源的 ES 细胞分离克隆程序 .....	261
二、胚胎干细胞培养及要求 .....	262
三、影响胚胎干细胞分离克隆的因素 .....	263
技能单 胚胎干细胞的培养 .....	267
<b>参考文献 .....</b>	<b>269</b>

# 第一章 细胞培养概述及细胞培养前的准备工作

## 第一节 细胞培养概述

### ►资料单

#### 【知识目标】

- 了解细胞培养的发展史。
- 掌握细胞培养的基本概念及优缺点。
- 掌握细胞培养的作用。
- 掌握细胞培养实验的基本要求。
- 掌握与细胞培养相关的基本概念及专有名词。

#### 【教学内容】

### 一、细胞培养的发展史

讲到细胞培养技术的发展史，我们就有必要首先了解细胞是怎样被发现的。众所周知，细胞是一切生命有机体的基本结构和功能单位，但是，如果没有显微镜的出现就不可能发现细胞。1590年，荷兰眼镜制造商 J.Janssen 和 Z.Janssen 父子制作了第一台复式显微镜，标志着人们向微观世界迈出了第一步。1665年，英国人 Robert Hook 用自己设计和制造的显微镜观察了植物栎树皮的薄片，第一次描述了植物细胞的构造，并首次用拉丁文 cell 这个词来称呼他所看到的类似蜂巢样极小的封闭状小室。直到1680年，荷兰人 A.van Leeuwenhoek 用自制的显微镜观察到了原生动物、人类精子、鲑鱼的红细胞、牙垢中的细菌等标本，成为第一个看到活细胞的人。

细胞培养 (cell culture) 技术现已广泛应用于生物学、医学研究等领域，成为生物领域一门重要分支。它起源于1885年，德国人 W. Roux 用温热生理盐水在体外培养鸡胚髓板，使之存活了数天，并首次采用了“Tissue culture”这个名词，第一次获得组织

块人工培养的成功。这一实验被认为是动物组织体外培养的萌芽实验。之后, 1887年, Arnold 又观察到在盛有盐水的盘里白细胞的运动。1906年, Beebe 和 Ewing 用盖玻片悬滴培养法, 以动物血清做培养基, 培养狗淋巴细胞存活了 72 h, 并曾见到细胞生长现象。直到 1907年, 美国生物学家 Harrison 用单盖片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法, 以青蛙的凝固淋巴液作为培养基, 从蝌蚪的脊索中分离出神经组织, 使来自两栖类神经组织的神经细胞存活了数周, 并且还观察到从神经细胞中长出了神经纤维, 而且向培养液中伸出了轴突, 与脑、脊髓神经细胞在体内分化的情况非常类似。Harrison 的实验不仅解决了神经纤维的起源问题, 而且还开创了动物组织培养的先河, 成为动物细胞培养的奠基人。以后 Carrel 对培养条件进行了改进, 并十分注意培养中的无菌操作技术, 他用血浆包埋组织块外加胚胎浸汁的培养法, 通过采用更新培养基和分离组织的传代措施, 完善了经典的悬滴培养法。1923年, 他又设计了用卡氏瓶培养法, 以扩大组织的生存空间, 为组织培养的发展奠定了基础。在卡氏瓶培养法的启发下, 相继出现了各类型培养瓶、培养皿、试管、多孔培养板的培养法。1955—1957年, Sanford 和 Dulbecco 等人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运用。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的研究技术。1975年, Sato 等人用激素、生长因子等替代血清, 使垂体细胞株培养获得成功, 近 20 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在探索之中。

细胞培养技术自 20 世纪 50 年代传入我国, 经 20 世纪 70 年代的发展, 我国学者在动物细胞工程领域也作出了卓越成就。如亲缘关系远近不同的鱼类之间可以进行多种核质组合, 在变种间、属间及科间都获得了具有独特性状的核质重组鱼。体细胞克隆方面, 我国上海、杨凌、山东也成功克隆出了山羊和牛。细胞培养技术已不再是个别研究室所拥有的技术, 而成为医学和生物学研究中普遍应用的技术。细胞库的建成, 细胞培养用品、培养基、血清、试剂及细胞株(系)的商品化, 高新技术的引进, 实验室条件的改进等, 极大地推动了培养技术的发展。加上各种新技术如电镜观察技术、放射性核素标记、单细胞显微注射、荧光免疫、电泳技术、细胞融合杂交瘤技术、DNA