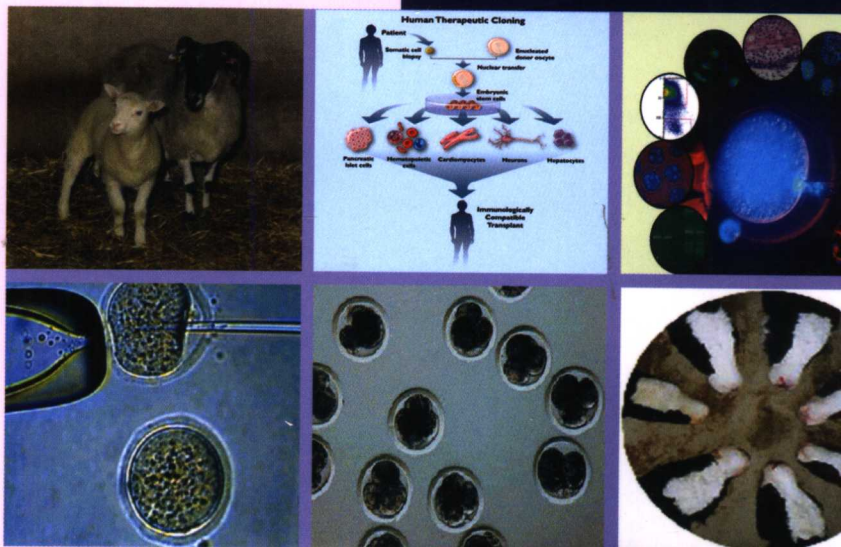




动物细胞工程

DONGWU XIBAO GONGCHENG

主 编 刘玉堂



东北林业大学 出版社

动物细胞工程

主 编 刘玉堂

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞工程/刘玉堂主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003.12

ISBN 7 - 81076 - 558 - 2

I. 动… II. 刘… III. 动物-细胞工程 IV. Q952

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 020839 号

责任编辑: 朱成秋 崔兆玉

封面设计: 彭 宇



NEFUP

动物细胞工程

Dongwu Xibao Gongcheng

主编 刘玉堂

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路26号)

东北林业大学印刷厂印装

开本787×1092 1/16 印张13.75 字数316千字

2003年12月第1版 2005年7月第2次印刷

ISBN 7-81076-558-2

Q·105 定价: 24.00元

前 言

20世纪后半期,以基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程为代表的生物技术领域取得了突飞猛进的成就,给农、林、医、工及生物科学本身带来了深刻的变革。所有的生物工程操作都要进入细胞中才能产生效果,因此,作为生物工程的主体之一,细胞工程技术已成为21世纪生命科学最有生命力、最引人注目的前沿科学之一。

1975年,英国的米尔斯坦成功地利用杂交瘤技术生产单克隆抗体,标志着动物细胞工程的诞生,虽然至今仅有20多年的历史,然而它在世界范围内却得到蓬勃的发展。1997年威尔穆特利用细胞核移植,培养出了体细胞克隆动物——多莉羊,成为科学上的重大突破。1999年胚胎干细胞培养的研究超越人类基因组计划而被评为此年度世界第一大科技新闻。动物细胞工程技术的许多成就已被应用于生产实践,以细胞融合为基础发展起来的单克隆抗体技术已经在医药工业中发挥了巨大的作用。转基因动物技术及克隆动物技术引导出一种新的制药工业,即利用转基因动物的乳房生产治疗人类疾病的蛋白质药物。以及克隆基因修饰猪,为人体器官移植提供外源器官,以缓解临床上对人体器官的迫切需要。另外,由于干细胞所取得的重大进展,可以预见人体器官培养在数年之后将成为产业化,人们可以利用自己的细胞培养出年轻、活力旺盛的器官去置换衰老损伤的器官。

现今已有许多细胞工程产品上市,仍有相当多的新产品正在研发中,有关细胞工程产业如雨后春笋不断涌现,国内从事细胞工程研究和开发的科技人员将会越来越多。为了满足社会发展对生物技术人才的需求,许多高校相继设立了生物技术与生物工程专业。细胞工程,作为生物技术专业必需的主干专业课程,现在还未见到适合于生物技术和生物工程等专业的教材。为了满足学校的学科建设和教学的需求,作者参阅了国内外有关文献、资料 and 相关的教材、专著等,编写了本书,其中动物胚胎工程部分由秦鹏春先生编写。

考虑到教学上的安排及为避免与其他课程重复,与植物细胞的培养及微生物细胞的培养相关的内容未被列入本教材。由于细胞工程知识突飞猛进,限于作者的知识水平、学术水平及时间,书中难免存在不足和错误,恳请同行和读者给予批评指正,以使本书更为规范和完善。

本书的出版得到了东北林业大学出版社的大力资助,在此表示诚挚的谢意。

编 者

2004年1月

目 录

| | |
|------------------------------------|---------|
| 1 绪 论 | (1) |
| 1.1 动物细胞工程的概念 | (1) |
| 1.2 动物细胞工程的主要内容 | (1) |
| 1.3 动物细胞工程在医药及工农业生产中的地位及其重要性 | (2) |
| 1.4 动物细胞工程与其他学科的关系 | (3) |
| 1.5 动物细胞工程的成就及其发展前景 | (3) |
| 2 动物细胞培养 | (5) |
| 2.1 动物细胞培养的发展 | (5) |
| 2.2 培养细胞的生物学特征 | (6) |
| 2.3 建立细胞系(株) | (9) |
| 2.4 细胞培养室的设置、设备和准备工作 | (11) |
| 2.5 动物细胞培养用液 | (21) |
| 2.6 细胞培养的基本方法与技术 | (29) |
| 2.7 细胞的冷冻保存 | (39) |
| 3 动物细胞融合与单克隆抗体技术 | (41) |
| 3.1 动物细胞融合与拆合 | (41) |
| 3.2 杂交瘤技术与单克隆抗体制备技术 | (45) |
| 4 动物胚胎工程的基本技术及试管动物 | (56) |
| 4.1 胚胎移植 | (56) |
| 4.2 胚胎嵌合 | (67) |
| 4.3 试管动物 | (72) |
| 4.4 生殖细胞和胚胎的保存 | (82) |
| 4.5 胚胎性别的鉴定 | (89) |
| 5 干细胞技术与组织工程 | (95) |
| 5.1 干细胞技术 | (95) |
| 5.2 组织工程 | (111) |
| 6 克隆动物技术 | (121) |
| 6.1 克隆动物的概念及研究历史 | (121) |
| 6.2 克隆动物的制作方法 | (125) |
| 7 动物细胞的基因工程与转基因动物 | (135) |
| 7.1 动物细胞基因工程的基本概念及研究历史 | (135) |
| 7.2 外源 DNA 导入动物细胞的方法 | (136) |

| | | |
|----------|-------------------------------|--------------|
| 7.3 | 外源基因在动物细胞中的表达与调控 | (143) |
| 7.4 | 利用转基因动物或细胞生产生物大分子 | (155) |
| 7.5 | 转基因动物 | (160) |
| 7.6 | 基因治疗 | (167) |
| 8 | 动物细胞的大规模培养与生物反应器 | (174) |
| 8.1 | 动物细胞大规模培养的概念及其控制条件 | (174) |
| 8.2 | 动物细胞大规模培养的常用方法及其操作方式 | (177) |
| 8.3 | 动物细胞大规模培养用生物反应器 | (180) |
| 8.4 | 动物细胞大规模培养用微载体系统 | (187) |
| 9 | 动物细胞培养的下游加工技术 | (195) |
| 9.1 | 固液分离 | (195) |
| 9.2 | 产品浓缩 | (201) |
| 9.3 | 培养产物的纯化 | (207) |
| | 参考文献 | (212) |

1 绪论

1.1 动物细胞工程的概念

20世纪70年代开始,由于细胞融合技术的迅速发展,尤其是1975年英国剑桥大学米尔斯坦(Milstein)发展了杂交瘤细胞技术以来,在生物工程中引发了一个新的领域,这就是动物细胞工程。动物细胞工程决不仅限于杂交瘤和单克隆抗体技术,它所涉及的内容要广得多。第三代生物技术的许多产品源于动物细胞工程。这一领域因其涉及面广,有较多的技术突破口,因而迈出了最快的应用开发步伐;有不少产品早已被投入市场,并创造出了巨大的经济效益。因此动物细胞工程在新技术革命中占有重要位置。

动物细胞工程是指利用现代细胞生物学和分子生物学的方法,按照人类的需要和设计,从细胞水平上修饰或改变细胞的特性和功能,从而改良生物品种和创造新品种,提供有用的细胞产品或加速繁育动物个体的过程。所以目前动物细胞工程包括细胞培养、试管动物、细胞融合育种与单克隆抗体制备、动物克隆、转基因动物技术、干细胞技术和发育基因调控与人体器官培养技术等技术领域。

1.2 动物细胞工程的主要内容

动物细胞工程所涉及的主要技术有细胞培养、细胞融合、细胞拆合、染色体或染色体组转移、基因转移以及动物胚胎工程等,是细胞结构的不同层次;也就是说,是从细胞整体水平、核质水平、染色质水平以及基因水平上来对细胞进行遗传操作的。其基因水平上的遗传操作实质上已步入与基因工程重叠的范围。由于目前细胞学中可将核及染色体都纳入细胞器的范畴,因而也可以将上述内容归并为三个层次,即整体水平(细胞融合)、细胞器水平(核移植,改变染色体倍性或组成)和基因水平(外源基因导入)。

动物细胞工程操作的对象可以是细胞或其组成部分以及由其构成的组织、器官,因此,通过生物学、化学或物理学的方法将不同细胞彼此融合的技术(细胞融合),杂交瘤与单克隆抗体技术,细胞的培养技术,对精子、卵母细胞、胚胎等操作为基础的胚胎工程技术,通过细胞在体外构建组织或器官的组织工程,以胚胎分割、细胞核移植为基础的克隆动物技术,以及转基因动物技术,都属于动物细胞工程的范畴。

根据目前动物细胞工程的发展现状,技术最成熟的、影响也最大的当属细胞融合,其中淋巴细胞杂交瘤技术在国内均已普遍开展,其产物单克隆抗体已进入产业化的生产阶段,全世界大大小小的生产单抗的公司不下数百个,是一个不折不扣的动物细胞工程。

1.3 动物细胞工程在医药及工农业生产中的地位及其重要性

生物工程已成为当今极为重要的高新技术领域之一，越来越为人们所重视。作为生物工程的一部分，动物细胞工程的主要特点是以细胞为基本单位，按照人们预定的设计有计划地改造细胞的遗传特性，改良动物品种和创造新的生物品种，加速优良动物个体的繁殖以及通过工程化为人类提供有用的物质，促进医药、工农业的发展，改善人类生存的条件。

在医药工业中，细胞工程技术的应用将会为人类获得优良药品、保障人类健康、促进医学的进步发挥着巨大的作用。自其诞生伊始，即为医学的进步提供了巨大的动力，促使医学进入了一个新纪元。现今细胞工程药物已成为医药界的新主角，例如干扰素 (IFN)、白细胞介素 (IL)、集落刺激因子 (CSF)、B 细胞生长因子 (BCGF)、T 细胞替代因子 (TRF)、巨噬细胞激活因子 (MAF)、血清扩展因子 (SF)、神经生长因子 (NGF)、表皮生长因子 (EGF)、组织纤溶酶原激活剂 (TPA)、促红细胞生成素 (EPO)、链激酶 (RSK)、促黄体生成素 (LH)、促滤泡生成素 (FSH)、乙肝病毒表面抗原 (HBsAg)、狂犬疫苗 (rabies)、小儿麻痹症疫苗 (polio) 等以及各种单克隆抗体，已被用于人和动植物疾病的快速诊断，在单克隆抗体上接上一些能够杀伤癌细胞的物质 (如放射性同位素、化学药物和毒素等)，使单克隆抗体像导弹一样，能够准确地找到并杀死癌细胞，所以人们把这种单克隆抗体称为生物导弹。单克隆已在医学各领域中广泛应用，成为细胞工程在医学上最重要的成就之一，为诊断和治疗人畜疾病开辟了一条新的途径。

现代动物细胞工程逐步应用于农牧业，将使农牧业发生重大变革。通过细胞工程技术使家畜优良品种的培育更加有效和快速。应用细胞融合技术可以培育新型生物物种。它能够打破传统育种技术，即只有同种生物杂交的限制，实现种间杂交。目前，细胞融合技术不仅可以把不同种类不同来源的动物细胞进行融合，还可以把动植物细胞融合在一起，这对于创造新的生物品种具有重大的意义。应用胚胎移植、克隆动物及转基因动物技术培育出新型良种并进行改良，使良种可在较短的时间内大量繁殖推广。例如，将大鼠的生长激素基因导入小鼠卵中，培育出生长速度极快的超级小鼠；人们可以利用基因工程培育大型牲畜等动物；进行瘦肉型猪的基因工程育种，促进农牧业的发展。由此可知，当今的细胞生物工程技术为自由操纵生物、掀起农牧业革命提供了强有力的手段。

海洋有着极其丰富的能够供人类利用的各种资源，是人类尚未开发的领域，如果利用现代科学技术，像陆地那样，对可以利用的海域实行科学“耕作”，那么，海洋就可以每年都向人类提供足够的食物。为提高海产养殖的产量与质量，可以把细胞工程技术应用到改造海洋动植物中，以提高海洋动植物的生长率，改变其遗传性，从而开发海洋生物新品种。例如，人们通过染色体组倍数及数目上的各种变化来选育新的优良品种和创造新的物种。进行单性繁殖研究，例如雌对虾要比雄对虾生长快 30% ~ 50%，罗非

鱼则相反,罗非鱼的雄鱼要比雌鱼生长快 30%~40%。因此,利用性别控制技术研究鱼类单性养殖受到广泛重视。利用显微注射技术将哺乳动物生长激素基因移入鱼受精卵中,使鱼受精卵在胚胎发育过程中产生大量的生长激素,这样孵化出来的鱼生长迅速,产生超级大鱼。

1.4 动物细胞工程与其他学科的关系

作为生物工程的重要组成部分,细胞工程是细胞生物学与工程学综合交叉的边缘学科,具有知识密集、技术密集的特点。虽然细胞工程是一门应用科学,但是它的产生和发展与现代基础学科密切相关,它离不开基础学科的发展;既然此学科是以细胞生命活动为基本原理的,因此首先必须掌握细胞的结构、功能,细胞的代谢、增殖、分化等与生命活动规律有关的知识,所以与细胞生物学、分子生物学、遗传学、微生物学、生理学、生物化学、繁殖学、生物物理学等基础学科有密切关系,而且现代物理学、化学和其他科学也不断地向细胞工程渗透;同时为了运用于生产,实现工程化,还需要掌握诸如生物反应器的构造原理、细胞反应工程原理、计算机程序控制以及各项生理指标应用传感器等检测新技术,这使得现代细胞工程演变为一种高技术。另一方面,由于现代细胞工程广泛应用了高精尖仪器,如超速离心机、液体闪烁仪、电子显微镜、显微操作仪、相差和微分干涉显微镜、高压液相层析仪、DNA合成仪、DNA顺序分析仪等,这些仪器大多数是由计算机控制的半自动化或全自动化设备,正是这些微电子学和电子计算机技术的渗透,使得对这些学科的研究深入到分子水平。

各类生物技术之间的相互渗透,尤其是基因工程与细胞工程的结合,大大地提高了细胞工程的研究和开发层次,成为现代生物工程的核心。酶工程和发酵工程这两种传统技术,正是因为由基因工程和细胞工程为之注入活力,才能在生产上发挥更加重要的作用。总之,与现代细胞工程有关的理论和技术,使理、工、医、农各学科形成了纵横交错的复杂关系,各学科的新成就、新突破都会对细胞工程技术产生推动作用,细胞工程从诞生起即反映了基础学科的新成就。例如,没有微生物营养缺陷型强迫杂交导致基因重组的微生物遗传学的先导性实验成功,便不会有今日的杂交瘤技术,进而也不会有单克隆抗体技术的出现。同样,没有细胞遗传学一系列技术方法的进步,也不会有今日的细胞工程的出现。细胞是生命活动的基本结构和功能单位,所有的生物工程操作最终都要进入到活细胞中才能产生效果,因此,细胞工程操作技术是最基本的生物工程技术。

1.5 动物细胞工程的成就及其发展前景

动物细胞工程是一门新兴的具有产业性质的学科,已在医学、农业等领域取得了良好的成就。其中,最先获得令人瞩目的研究成果是,1975年英国首先研制成功的淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术。单克隆抗体技术诞生以后,很快被应用于临床实践,并被称为20世纪80年代的“生物导弹”。因为它能够引导药物定向和有选择地攻击癌细胞,故被用于治疗、诊断癌症、艾滋病等多种疑难疾病,用于快速诊断人类、动物和农作物

的疾病，成为细胞工程在医学上最重要的成就之一。

自世界上首次获得“试管兔”之后，各国科学家相继在鼠、猫、羊、牛、猪、猴等十几种动物中成功地培育出“试管动物”。人工授精、胚胎移植等技术已被广泛应用于畜牧业生产中。通过体外受精可以充分利用卵巢内潜在卵母细胞，在体外受精以获得大量的优良胚胎，移植到普通母畜的子宫中，繁殖出优良新个体，并可突破动物交配的季节限制，因此可以大大提高良种家畜的繁殖率。

利用嵌合体技术，可以把两种以上的早期胚胎或胚胎聚集在一起，经发育形成一个新个体。例如，将黄、白、黑三种不同毛色的小鼠胚胎聚集在一起，那么所形成的嵌合体就会具有三种不同颜色的皮毛。例如，英国科学家还培育出绵羊和山羊的种间嵌合体——绵山羊，其皮毛既有山羊的部分又有绵羊的部分，血管内流动着的血液既含有山羊的红血球又含有绵羊的红血球。在埃及有狮身人面兽，在希腊有羊首狮身蛇尾兽，在中国的《山海经》、《封神演义》等书中也有诸多一体多相的异兽出现，就今日的细胞工程技术而言，培育诸般异兽并非是不可能的。动物基因转移便是将外源基因转入动物而使其表达出原来没有的某种新性状的技术。对于肉用动物，人们希望提高其生产效率，改变其脂肪和瘦肉的构成，提高其繁殖能力，增强其抗病性。因此，转基因动物的出现为实现高效益畜牧业和医药业带来了利益。此外，对于开发动物体作为活的生物反应器生产珍稀蛋白质及药物等方面均有很大的应用潜力。

2 动物细胞培养

近些年,哺乳动物细胞已经变成大规模生产系列化、有商业价值的生物化合物的首选细胞。开发应用的动物细胞生产技术与细菌和真菌的传统微生物发酵过程紧密相联,然而动物细胞培养的特征明显地不同于微生物的培养。一般来说,动物细胞生长更缓慢,生命力更脆弱,而且对营养的需求更复杂。

在实验室中动物细胞研究已经有了许多年的历史,而且已出版了一些相关的实用技术方面的书籍,因此在此章节中着重介绍有关动物细胞培养技术的开发背景和普遍应用的培养及操作技术。

2.1 动物细胞培养的发展

1907年,美国实验胚胎学家 R. 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,将蛙胚髓管部的小片组织在体外培养了数周之久,并观察到了蛙胚神经细胞突起从种植的神经组织块长出。Harrison 的这项工作第一次较为系统地观察了体外培养的活体组织,并建立了体外活体组织的培养体系,被公认为是体外培养技术的开始。Harrison 这个著名的体外培养实验标志着体外培养技术的创立。

在体外培养的无菌操作方面,Carrel 做出了卓越的贡献。如何避免培养物被细菌污染,是 19 世纪前后令生物学家甚为头疼的问题。Carrel 是一个外科医生,他把外科手术的无菌操作观念带到了体外培养实验之中,在进行实验时特别注意无菌操作。例如,从 1910 年开始他在没有抗生素的情况下,仅仅依靠小心细致的缓慢操作使 7 d 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 d,并将原代细胞进行了长期传代培养。Carrel 于 1939 年退休后,Ebeling 继续了这项工作,一直到 1964 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,有人认为它是从心脏细胞逆分化而来的,也有人认为它是从最初混入的成纤维细胞或血管内皮细胞而来的,还有人怀疑它们是经常加入新鲜胚胎浸出物时带入的新细胞。

Burrows 于 1910 年以血浆凝块代替前人的淋巴凝块来包埋要培养的组织,延长了组织在体外存活的时间。1912~1913 年,Burrows 以及 Carrel 等学者共同采用胚胎浸液作为刺激生长的营养物质,培养了多种动物组织。血浆包埋组织再辅以鸡胚浸液的体外培养方法,成为当时和以后一直沿用了数十年的标准技术。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,且污染减少。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,且传代方便,减少了污染机会。以 Carrel 和 Harrison 为首的科学家们用卡氏瓶培

养法培养各种组织细胞，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。

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。早期的细胞培养采用的是天然培养基（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对实验结果的分析。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，在使用绝大多数人工合成培养基时还需添加血清。随着单克隆抗体的制备及细胞生长因子和细胞分泌产物的进一步研究，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。离体细胞于体外培养，生存环境与条件的改变，使其在许多方面的特性与体内细胞不同。只有了解这些，才能更好地利用组织培养技术进行各种实验研究。

2.2 培养细胞的生物学特征

2.2.1 培养细胞的生命期 (Life span of cultured cells)

2.2.1.1 正常细胞

多数二倍体细胞在体外培养中均维持有限的生存期，最多生存一年左右，人成纤维细胞可传30~50代，相当于150~300个细胞周期。不同组织来源、取自不同年龄个体的成纤维细胞，其平均寿命是不同的。取自年轻个体成纤维细胞的寿命比年老者长；同年龄的个体健康差异又影响培养细胞的寿命；不同种族的动物细胞寿命亦不同。如人胚成纤维细胞能传50代，恒河猴皮肤成纤维细胞寿命为8代左右。培养的人皮肤成纤维细胞生命的全过程大致经历以下三个阶段，如图2-1所示。

第I阶段，原代培养期 (primary culture)。

从体内取出组织细胞接种，进行原代培养，原代细胞一般持续1~4周，是二倍体

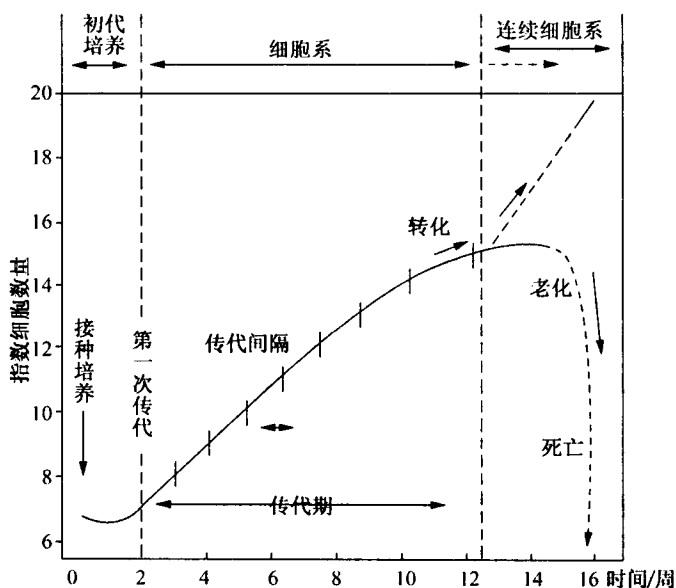


图 2-1 培养细胞的整个生命活动过程分期 (引自鄂征, 1995)

核型。此期细胞常活跃地移动，极少见细胞分裂相。原代细胞与体内原组织相似性大，细胞是异质的 (heterogeneous)，细胞间相互依存性强，细胞软琼脂集落形成率和克隆形成率很低。细胞转化可能性极小，适宜进行疫苗制备、药物测试、移植等实验研究。

第Ⅱ阶段，传代期。

原代细胞传代后称为传代细胞 (subculture cells)。

原代细胞传代后便成为一有限细胞系 (finite cell line)。在适宜的培养条件下，细胞增殖旺盛，并能维持二倍体核型，又称二倍体细胞系 (diploid cell line)。为保持二倍体细胞性质，细胞应在初代培养期或传代后早期冻存，其与原代细胞有同样的形态和使用价值。目前，常用细胞系均在 10 代内冻存。如不冻存，反复传代有可能失掉二倍体性质。原代细胞一般传到 10 代左右就不宜传下去，大部分细胞出现退化甚至死亡，仅极少数细胞度过危机，这些存活细胞再传代 40~50 代后，增殖缓慢以至完全停止，细胞进入第Ⅲ阶段。

第Ⅲ阶段，衰退期。

细胞仍然生存，但不增殖或增殖很慢，细胞衰退死亡。

2.2.1.2 转化细胞

在细胞生命阶段少数情况下，由于不明原因的影响，任何一个阶段都可能发生自发转化 (spontaneous transformation)。转化的标志之一是细胞获得不死性 (immortality)，即细胞获持久性增殖能力，这样的细胞群体称无限细胞系或连续细胞系 (continuous cell line)。培养细胞转化成一个细胞系的可能性，很大程度上取决于培养细胞的动物种属。小鸡是一个“稳定”的种，它的细胞培养物不能自发转化。小鼠细胞自发转化的可能性最高，几乎鼠胚成纤维细胞的每次大量培养都能得到连续细胞系。大鼠、金黄地鼠成纤

维细胞自发转化率也是相当高的。健康成人除淋巴细胞培养可获得淋巴样细胞系外，其他细胞培养成系株的可能性很小。无限细胞系的形成主要发生在Ⅱ期，Ⅲ期比较少见。细胞获不死性后，核型大多变成异倍体 (heteroploid)。转化后，细胞可能具有恶性性质，也可能仅有不死性而无恶性，需做动物致瘤试验、软琼脂培养、凝集试验等来确定。目前实验中常用的无限细胞系有 3T3 - Swiss albino、NIH3T3、BHK - 2 等，属异倍体核型，它们易在基质上铺开，在低血清培养基内不生长（常用 15% 血清），在半固体培养基内形成很少集落，但细胞保持接触抑制，而且同源动物无致瘤性，它们是良性无限细胞系。但这类细胞在性质上已接近恶变细胞，有可能发生恶性转化，在无恶性转化前提下才可做进一步实验。各种癌细胞株能在软琼脂低血清中生长（常用 10% 血清），它们可使裸鼠或去胸腺动物致瘤，是恶性无限细胞株。

2.2.2 培养细胞一代的生长过程

体外细胞培养常需传代。传代是将细胞从一个培养瓶皿转移到另一个培养瓶皿。从细胞接种到下一次传代再培养的一段时间叫一代。培养一代作为单个细胞可倍增 3 ~ 6 次，作为群体细胞要经过游离期、指数增殖期与停止期等三个阶段。细胞接种后呈悬浮状态，贴壁细胞很快会附着于培养瓶壁，各种细胞贴附速度不同，一般在 0.5 ~ 4 h。此期细胞需经过潜伏期 (G1 期) 才能进入生长期。潜伏期长短不同，原代细胞需 24 ~ 96 h，肿瘤细胞或无限传代细胞仅需 6 ~ 24 h。待细胞分裂相逐渐增多，标志着细胞进入指数增殖期。此期细胞分裂数量可作为判定细胞生长是否旺盛的一个重要指标，以细胞分裂指数 (mitotic index, *MI*) 来表示。*MI* 是指计数 100 个培养细胞中的分裂细胞数，一般细胞的 *MI* 为 0.2% ~ 0.5%，无限传代细胞系或肿瘤细胞的 *MI* 可高达 3% ~ 5%。如接种细胞数量适宜，此期持续 3 ~ 5 d，细胞数量增多，贴壁细胞可相互接触连成片，正常细胞团发生接触抑制而形成单层细胞，但肿瘤细胞的接触抑制消失，可导致细胞形成多层重叠。由于细胞密度增大，营养液中营养成分的大量消耗，代谢产物蓄积，细胞进入停止期，细胞虽有代谢活动，但不再增殖。此时应进行传代，否则随着培养环境的恶劣变化会发生细胞中毒、变性，重则死亡 (见图 2-2)。

2.2.3 培养细胞的遗传学特征

离体细胞体外培养过程中，有时会发生细胞遗传学改变，掌握其细胞遗传学动向，是了解细胞性状的一个重要方面。对于所建的细胞系 (株)，应用于细胞融合、细胞的基因工程等方面的研究时均应检测细胞核型，利用组织培养细胞很易做细胞遗传学研究。

2.2.3.1 核型变化

原代培养细胞多呈二倍体，经传代成细胞系后，细胞可持续保持二倍体状态。但经长期传代可能发生偏离二倍体现象，即染色体数多于或少于 46。当细胞发生转化成肿瘤细胞时，大多失去二倍体核型，成为多倍体或异倍体。在各类培养细胞中，有时会遇到异常的染色体，如双着丝点、环形染色体、长臂或短臂部分缺失等。

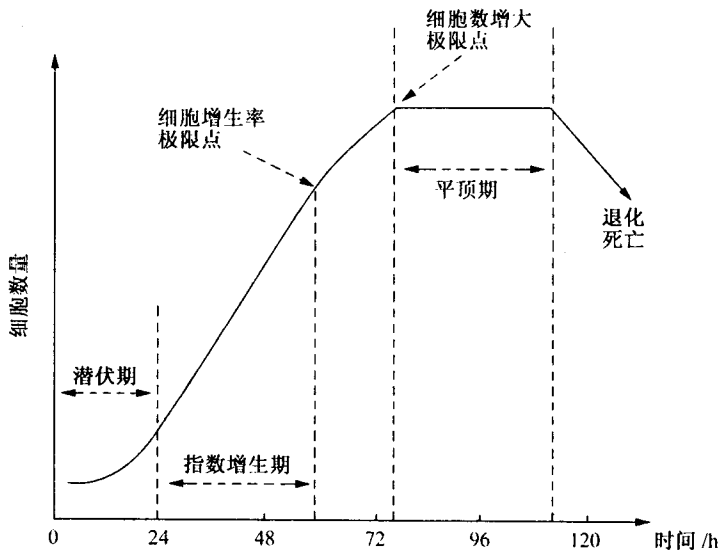


图 2-2 每代细胞生长过程示意图

2.2.3.2 细胞性别

雌性哺乳动物体细胞核内，两条 X 染色体之一在发育的早期随机发生异染色质化而失活。例如在人体细胞的 23 对染色体中有一对性染色体，女性的两个 X 染色体中有一个在细胞间期时呈明显的异固缩状态，呈半月形或三角形小体，称 Barr 体，紧贴在核膜内面。培养细胞的胞核超微结构与体内细胞无大差别，仍保持性别特征，尤其原代培养细胞易于显示，用特殊染色法均可观察到 Barr 体。

2.3 建立细胞系（株）

各种已被命名和经过细胞生物学鉴定的细胞系或细胞株都是一些形态比较均一、生长增殖比较稳定的和生物性状清楚的细胞群，因此凡符合上述情况的细胞群也可给以相应的名称，即文献中常称之为已鉴定的细胞（certified cells）。已鉴定的细胞可用于各种实验研究和生产生物制品。当前世界上已建的各种细胞系（株）举不胜数，我国也建有百种以上，并在不断增长中对已建成的各种细胞系或细胞株习惯上都给以名称；细胞的命名无严格统一规定，大多采用有一定意义的缩写或代号表示。但不论什么形式均不宜太长，以便记忆和了解，现列举以下几种具有代表性的细胞名称供参考：

HeLa: HeLa 供体患者的姓名缩写（来源于宫颈癌）。

CHO: 中国地鼠卵巢细胞（Chinese Hamster Ovary）。

宫一 743: 宫颈癌上皮细胞，1974 年 3 月建立。

NIH3T3: 美国国立卫生研究所（National Institute of Health）建立；每三天传代一次，每次接种 3×10^5 细胞/ml。

从机体取材的首次培养，只要供体均一，取材部位及组织种类等条件稳定，此原代

培养细胞可无须鉴定。进行传代培养的细胞则称细胞系；用选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培养物称细胞株。一般在原代或 2~3 代后即大量冻存，作为原种 (stock, cells)，取一支细胞进行传代繁殖，用毕再冻存，这样可保证长期使用和延缓衰老。当连续传 10 代左右时，可按建系、建株要求进行检测或鉴定。为防止丢失或污染，最好在两个以上实验室保管。已建系（或株）的细胞最好能与国际上知名的细胞库交流或接纳。如美国的 ATCC、IMR，英国的 ECACC，日本的 JCRB 等细胞库，均可接受来自世界各地的已鉴定细胞，但需符合其入库标准。美国 ATCC 入库检测项目如下，其他细胞库的要求与此相似。

ATCC 入库检测项目如下：

(1) 组织来源和已传代数：应说明细胞供体所属物种、来自人或动物、个体性别、年龄、取材的器官和组织，肿瘤组织应说明临床和病理诊断及病历号等，了解细胞培养的传代情况。

(2) 培养条件及方法：说明使用培养基、血清种类及用量、抗生素、适宜 pH 值等。

(3) 细胞活力、细胞生长曲线、分裂指数、倍增时间等。

(4) 冻存液。

(5) 溶解后细胞生长特性。

(6) 接种存活率。

(7) 细胞生物学检测：细胞形态、特异结构、细胞核型。

(8) 物种检测：检测同工酶谱，主要为 G6PD 和 LDH，以证明细胞是否有交叉污染。

(9) 无菌检测：包括细菌、真菌、支原体、病毒等。

(10) 反转录酶检测。

(11) 细胞建立者。

(12) 检测者。

(13) 鉴定组织。

【附】 可与国外联系的细胞库及其联系人。

(1) ATCC (American Type Culture Collection)

12301 Park Lawn Drive Rockville MD 20850. USA

ATCC 的网址：<http://www.atcc.org/>

(2) IMR (Institute for Medical Research)

The Human Genetic Mutant Cell Repository, Institute for Medical Research Cope wood and Davis Streets, Camden, NJ 08103 USA

(3) JCRB 细胞库 (Japanese Cancer Research Resources Bank—Cell Bank)

国立卫生试验所、变异原性部、细胞库 〒158 东京都世田谷区上用贺 1-18-1

电话：03-700-1141

(4) ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures)

ECACC, PHLS, Center of Applied Microbiology & Research, Proton Down, Salisbury, SP4

OJG, UK Telex: 47683 PHCAMR G

(5) 国家专利局委托武汉大学建立的中国典型培养物中心 (China Center Type Culture Collection, CCTCC), 现保存十几个国家的专利培养物 1000 多株, 非专利培养物 3000 多株, 其中包括各类菌种、动植物细胞系、病毒、单细胞藻类和质粒等。

通讯地址: 武汉大学生命科学院中国典型培养物中心

邮编: 430072 电话: 027 - 87682378/87682319

E-mail: yingtlu@whu.edu.cn 或 hyang@whu.edu.cn

(6) 中国科学院细胞库是中国科学院典型培养物保藏委员会的成员库之一, 由中国科学院上海细胞研究所主持。该细胞库收藏有人和其他动物的正常细胞、遗传突变细胞、肿瘤细胞和杂交瘤细胞。

通讯地址: 上海岳阳路 320 号中国科学院上海细胞研究所细胞库

邮政编码: 200031 电话: 021 - 64315030 - 2052

网址: <http://www.cell.ac.cn/cellbank/>

2.4 细胞培养室的设置、设备和准备工作

2.4.1 细胞培养实验室的设置

细胞培养实验室应保证无微生物污染和不受其他有害因素的影响, 具体工作包括无菌操作、无菌处理、洗刷、配液、制备细胞、孵育、传代、细胞冻存与复苏等。按其工作性质可将实验室分为无菌室、准备室和洗刷消毒室, 除后者需分隔开外, 无菌室和准备室可在同一室内, 但需划分出不同功能区。

2.4.1.1 无菌室

无菌室是为进行无菌操作而设计的空间, 尽量与外界隔离, 以防止微生物污染和有害物的影响。理想的无菌操作室应分为准备室、缓冲室和操作室, 操作室又可有一间或几间, 缓冲室能保护无菌室的无菌环境, 可兼有更换无菌衣帽和一些简单操作 (如放置恒温培养箱, 离心等必需的小型仪器)。无菌操作室则专用于无菌操作、细胞培养。大小要适当, 一般整个面积约 10 m^2 , 其顶部不宜过高, 以保证紫外线的有效灭菌效果。墙壁应光滑无死角, 以便清洗和消毒。最好安装空气过滤的恒温恒湿装置, 与周围实验室比较, 应保持正压。室内陈设应尽量减少。

实验室可使用无臭氧紫外线消毒器或电子消毒灭菌器。电子消毒灭菌器在高压电场作用下, 电子管的内外电极发生强烈电子轰击, 使空气电离而将空气中的氧转换成臭氧, 从而靠臭氧气体弥散达到杀菌的目的, 因而消毒时没有死角。消毒后空间内的残留臭氧只需 30~40 min 即能自行还原成氧气, 不留异味, 在消毒表面也不留残毒。专用培养实验室布局可参考图 2-3。

使用无菌室时应按以下次序: ①熟悉实验计划, 备齐必要的材料和器具, 杜绝实验中出无菌室取忘记的物品; ②穿戴无菌衣帽和口罩; ③关闭杀菌灯, 通过一定路线拿入必要的物品 (应尽量减少出入的次数); ④手部消毒进行实验; ⑤完成实验后将用完物