

動物細胞培養

高偉良 編著



金名圖書有限公司

動物細胞培養

高偉良 編著

北京大學生命科學學院副教授

金名圖書有限公司

1994

國立中央圖書館出版品預行編目資料

動物細胞培養/高偉良編著，——初版——臺北市
：金名圖書發行；淑馨總經銷，1994[民83]
面： 公分
含參考書目及索引
ISBN 957-8804-12-1 (平裝)

1. 生理學(動物) 2. 細胞

383.2

83006006

動物細胞培養

高偉良編著

發行所 金名圖書有限公司

發行人 邱延禧

局版台業字第2325號

台北市忠孝東路三段251巷11弄5號

TEL (02)7764699 FAX (02)7727156

總經銷 淑馨出版社

台北市安和路二段65號2樓

TEL (02)7080290 FAX (02)7084804

郵政劃撥帳號 05345775

定價 NT\$300

1994年8月初版

ISBN 957-8804-12-1

有著作權 不准翻印

前言

隨著遺傳學、細胞生物學、分子生物學等生物科學的發展，人們認識到細胞不僅是生物體結構與功能的最小單位，而且也是生物體儲存、複製與傳遞遺傳物質的最小單位，還是生物工程中能接受外來遺傳物質並進行基因持續表達的最小單位。因此生命科學的各個分支學科都從不同的角度匯集到細胞水平進行各自的研究，同時比較體外培養細胞與生物機體細胞之間結構與功能的異同，以求認識生物體生長與發育、遺傳與變異以及防治疾病的機理。

五十年代中期以後細胞培養技術迅速發展，近二十年來無血清培養在細胞培養中得到廣泛應用，特別是激素、細胞外基質等物質加入培養液中，使人們已能用不同的方法在體外培養多種特殊類型或具有特殊要求的細胞。這使人們對細胞生長與分化的本質有了進一步的認識。染癌技術的誕生又推動了細胞培養技術向生物工程領域的發展，使人們跨進了能按照自己的意圖改造細胞與生物體的新世紀。為適應細胞培養技術在生物學、醫學、農學等眾多學科中的廣泛應用，以及發展相應的研究工作，十分需要推廣與提高動物細胞培養技術，作者結合自己多年的教學與科研實踐經驗編寫該書。

本書是介紹動物細胞培養技術及有關基礎知識的專業書籍，為滿足大學生、研究生以及廣大科研工作者的需要和便於掌握，作者採用由淺入深，先易後難，由點到面的寫作方法。除緒論部分敘述了細胞培養簡史之外，全書共分三篇。第一篇內容是細胞培養基本技術及相應的準備工作。第二篇包括多種不同類型的細胞的體外培養技術以及無血清培養液、細胞外基質的應用。第三篇為適應基礎理論研究與發展生物工程研究工作的需要，在介紹與細胞培養有關技術的基礎上，

重點介紹細胞培養技術在生物學、醫學、農學等學科基礎上理論研究中的應用及其在生物工程領域內的研究進展。為造福人類，我們期待細胞培養技術在人們認識生物界、改造生物界的實踐中發揮更大的作用。

北京大學生物學系丁明教授審閱了全書，中國科學院動物研究所莊臨之研究員審閱了“無血清培養”一章，北京大學生物學系是吳鶴齡教授審閱了“體外培養細胞的遺傳與變異”，一章，他們都提出了許多寶貴的修改意見與建議，在此一並致以誠摯的謝意。中國科學院微生物研究所郭玉鳳先生編寫了“細胞培養的基本技術”一章，並進行了全書的整理和部分插圖的繪製工作。我謹向給予我支持和幫助的女士先生們致以深切的謝意。

由於作者水平有限，缺點錯誤在所難免，敬請讀者批評指正。

高偉良

一九九二年十月

於北京大學

目 錄

第一章 緒論	1
第一篇 細胞培養總論	9
第二章 細胞培養的基礎技術	11
一、實驗用品的清洗與包裝	11
二、實驗用品的滅菌	14
三、培養細胞用液體的配製	22
四、消化液的配製	42
五、pH 指示液與調節液	43
六、抗菌素溶液	44
七、消毒液	45
第三章 細胞培養的基本方法	47
一、無菌操作技術	48
二、雞胚成纖維細胞靜置單層培養	48
三、HeLa 細胞傳代培養	51
四、組織塊培養	53
五、瓊脂與軟瓊脂細胞培養	54
六、球體培養	55
七、克隆生長	57
八、細胞培養方法的分類	58
九、細胞系與細胞株	60
第四章 體外培養細胞的常規觀察與檢查	63
一、體外培養細胞的形態學觀察	63

二、體外培養細胞生長率的觀察	68
三、體外培養細胞的染色體測量技術	69
四、培養細胞中污染物的檢查和排除	79
第五章 體外培養細胞的遺傳與變異	91
一、體外培養細胞遺傳與變異的基本概念	91
二、體外培養細胞遺傳的相對穩定性	92
三、體外培養細胞的變異	93
四、培育體外培養細胞突變種的意義	101
第六章 體外培養細胞的保存與運輸	103
一、體外培養細胞的保存方法	103
二、凍存細胞的復甦	106
三、復甦細胞的檢測與克隆	107
四、細胞的運輸	107
第二篇 細胞培養各論	109
第七章 無血清培養	111
一、血清在體外培養細胞中的作用	111
二、無血清培養液的使用	126
三、無血清培養液的分類	147
第八章 細胞外基質	151
一、細胞外基質的分類及其生化特性	152
二、細胞外基質的生物學功能	157
三、人工基膜對體外培養細胞的影響	161
四、細胞外基質與激素、生長因子間的協調作用	163
五、生物基質的製備	169
六、用生物基質包裹培養容器表面的程序	169
七、將來發展趨勢	172

第九章 體外培養細胞的分化	177
一、影響體外培養細胞分化的作用因子	177
二、在無血清培養液中原脂肪細胞系的分化	180
三、人骨髓白血病細胞在無血清培養液中的分化	181
四、體外培養上皮細胞的分化——穹的形成	187
第十章 成纖維細胞與肌細胞培養	193
一、雞胚成纖維細胞培養	193
二、大鼠肌細胞培養	194
三、心肌細胞培養	198
四、肌細胞分化	199
第十一章 上皮細胞培養	201
一、機體內的上皮細胞及其特性	201
二、腎上皮細胞的原代培養	203
三、上皮細胞的無血清培養	208
四、體外培養上皮細胞的應用	209
第十二章 血細胞、巨噬細胞與骨髓細胞的培養	213
一、外周血白細胞培養	214
二、巨噬細胞培養	216
三、淋巴細胞培養	219
四、骨髓細胞培養	220
五、培養細胞間的相互影響	222
第十三章 神經膠質細胞、神經細胞與垂體細胞的培養	225
一、神經膠質細胞培養	225
二、雞胚大腦皮層神經細胞培養	228
三、垂體神經培養與組織塊培養	228
第十四章 肝細胞培養與肝細胞 DNA 合成的調控	235
一、肝細胞培養	235

二、體外培養成年大鼠肝細胞 DNA 合成的調控	237
第十五章 睪丸細胞培養及睪丸功能調節	243
一、足細胞培養	244
二、間質細胞培養	248
三、近小管肌細胞培養	248
四、生殖細胞培養	249
第十六章 分離細胞與細胞混合培養	251
一、分離細胞	251
二、細胞混合培養	254
三、組織塊混合培養	255
四、人表皮細胞培養	256
五、軟瓊脂細胞克隆化培養	257
第三篇 細胞培養研究進展及其有關的研究技術	261
第十七章 細胞周期與細胞同步	263
一、細胞周期	263
二、細胞周期調控及調控細胞周期的作用因子	264
三、細胞同步	266
第十八章 用 ^3H- 標記化合物研究細胞內生物大分子合成	273
一、放射性同位素及其基本性質	273
二、放射性測量細胞內 DNA 合成及其動態變化	277
三、放射自顯影及細胞內 RNA 合成的標記	279
四、體外培養細胞原位雜交	287
五、放射性同位素實驗室安全與防護	289
第十九章 細胞融合與細胞工程	293
一、細胞融合	293
二、單克隆抗體技術	298

三、細胞工程	306
第二十章 體外培養細胞基因工程	309
一、分離純化目的基因的基本要求與方法	309
二、在體外培養細胞中轉移外源基因的基本方法	312
三、轉染技術應用於癌基因的研究	315
四、共轉染技術應用於癌基因的研究	316
五、轉染技術應用於建立免疫細胞株	317
第二十一章 體外培養細胞應用於生命科學中的研究進展	319
一、細胞培養與生命科學基礎研究	319
二、細胞培養在醫學科學研究中的進展	324
三、培育生物新品種	330
索引	335

第一章 緒論^[1-7]

細胞培養 (Cell Culture)，是從生物機體取出組織分散成單個細胞或直接從機體取出單個細胞，也可把體外培養細胞分散成單個細胞在體外條件下培養，細胞能繼續存活與增殖。可以簡單概括為單個細胞或細胞羣體在體外的培養，培養過程中細胞不再形成組織。

組織培養 (Tissue Culture)，是指從生物機體取出一部分組織或器官在體外的培養。在體外培養條件下組織器官仍能存活、增殖以及具有組織或器官的分化能力和相應的結構與功能。

組織培養已經歷了約一百年的發展歷史，但開始發展比較緩慢，沒有引起更多科學工作者注意。直到本世紀 50 年代後期，細胞培養技術才廣泛用於生物學研究的各個領域，使這項技術得到迅速發展。現在它已成為細胞工程基因工程的重要組成部分。

早在 1885 年 Roux 用溫生理鹽水培養雞胚組織，觀察到它在鹽水中能存活數個月。1887 年 Arnad 將老樹的髓質浸於蛙的淋巴腔，觀察到腔內聚集了較多的淋巴細胞。同年 Loeb. L. 與 Bier, A. 培養皮膚及骨折片，觀察到凝血及瓊脂中存在游離細胞。上述工作使一些科學工作者從研究生物機體細胞轉向研究體外培養細胞。1903 年 Jolly 用蓋玻片懸滴培養法培養蝶螈白細胞存活近一個用。1906 年 Beebe 和 Ewing 以動物血清作培養基，用蓋玻片懸滴去培養狗淋巴瘤細胞，存活了 72 小時，並見到細胞生長的現象。這些初期的研究工作為建立組織培養技術奠定了基礎。

1907 年 Herrison 從蛙胚分離出一部分神經管，接種於淋巴懸液內，採取覆蓋凹玻璃懸滴培養法，經培養數個星期後，觀察到從神經細胞長出神經纖維的現象。這一發現不僅使當時有關神經纖維起源問

題的爭論得到解決，同時也發展了組織培養技術。

以後圍繞著防止污染、改進培養方法、設計新型培養容器和設計不同的培養液等四個方面的工作，不斷完善與發展了組織培養技術。1910年 Burrows, M. 將血漿用於組織培養，延長了組織塊在體外生長的時間。1912年外科醫生 Carrel 首先將雞胚汁作為生長刺激物用於組織培養。他用血漿包埋組織塊，用雞胚汁作為培養液，採用更新培養液和分離組織的傳代方法，曾將雞胚心肌組織培養了34年之久。該方法既能不斷地供給營養物質，又有利於減少和防止污染。1911年 Lewis, M. R. 與 Lewis, W. H. 兩人以鹽溶液培養組織塊，也取得了培養物能在體外培養的效果。

早期的組織培養採用單蓋片培養法，後來 Maximow (1925年) 改用蓋片培養法，推動了細胞分化的研究。Strangeweys (1926年) 建立了表玻璃培養法。Fell, H. B. (1928年) 應用此法研究軟骨及骨的發生及形成。但更有意義的是 Carrel (1923年) 創立了卡氏瓶培養法，用此法可根據需要隨時更換培養液，既有利於組織塊不斷生長，又可以運用不同種類的營養液培養不同的細胞，極大地推動了當時的組織培養研究。Earle 等加以改進，使大量細胞能直接生長於玻璃瓶壁上，培養了正常細胞與腫瘤細胞的細胞株。Sanford (1948年) 應用此法得到單個成纖維細胞，並將它培養成細胞羣落，獲得了克隆化的細胞株。至此大多數研究人員都採用培養瓶培養細胞。

新型培養液的產生，首先反映在設計不同種類的緩沖鹽溶液，以用來培養不同的細胞和洗滌細胞。Simms (1942年) 設計了 X6、X7 與 Z 液。X6、X7 用以培養哺乳動物組織、腫瘤與病毒。X6 含酚紅較多，適用於蓋片培養，X7 適於培養瓶培養。Earle (1948年) 設計了含有碳酸氫鈉等鹽類的 Earle 氏鹽溶液，適於培養哺乳動物組織。Hank's (1949年) 設計了適於培養所有哺乳動物組織的 Hank's 氏液，Dulbecco (1954年) 設計了適合懸浮培養腎細胞的 Dulbecco

磷酸鹽緩沖液。與此同時細胞培養中所用的培養基由動物血漿改爲合成培養基。如 Morgan、Morton 及 Parkar (1950 年) 設計了 199 培養基, Eagle (1955 年) 在 199 基礎上又設計了低限度 Eagle 培養基 (MEM), 1959 年 Eagle 又設計了改良 Eagle 培養基 (E-MEM)。其他學者還設計了多種綜合培養基, 適合於培養多種細胞。培養細胞時加入能促進細胞生長的物質也由雞胚汁改爲動物血清。

在大量實踐的基礎上, 培養方法也不斷地得到改進和完善, 1948 年 Sanford 建立了單細胞分離培養法, Dulbecco 等 (1952 年) 應用胰蛋白酶將組織塊消化成分散的細胞懸液, 使用液體培養液獲得了體外培養的單層細胞。Evans 等 (1951 年) 建立了定量培養法, 可正確地測定各種因素對培養細胞的影響, 從而建立起遺傳性狀相同的細胞株。Enders 與 Well (1948 年), Robbins (1949 年) 用體外培養細胞增殖脊髓灰質炎病毒。Parker (1954 年), Syverton (1954 年) 使用上述兩種方法, 將定量培養法應用於病毒學研究, 這些工作極大地推動了病毒學的發展。

由於組織培養技術越來越受到科學工作者的重視, 應用該技術的人日益增多, 在 1925 年 Rhoda Erdmann 創建了組織培養專業雜誌。1950 年又成立了組織培養的國際組織。這些都推動了組織培養與細胞培養的發展。

從 50 年代後期, 組織培養進入了迅速發展時期, 它廣泛地應用於醫學、農學、生物學各個領域。1958 年崗田^[8]用紫外線滅活的仙台病毒誘導腹水癌細胞融合, 建立了細胞融合技術。1964 年 Liffelfield^[9]利用 HAT 選擇性培養基, 殺死酶缺陷型的兩種親本細胞而留下融合細胞, 並能在體外不斷增殖, 從而使細胞融合技術得到進一步完善。從事免疫學研究的 Köhler 和 Milstein^[10] (1975) 利用仙台病毒誘導綿羊紅細胞免疫的小鼠脾細胞與小鼠骨髓瘤細胞融合, 獲得

了分泌單一抗體的雜種細胞。該雜種細胞具有在小鼠體內和體外培養條件下大量繁殖和長期地分泌單克隆抗體的能力，從而建立了小鼠淋巴細胞雜交瘤技術，使免疫學研究走向了新階段。單克隆抗體是具有高度特異性的新型生物試劑，它的出現推動了生物學中各種定性分析研究與臨床醫學的疾病診斷工作。

多種類型哺乳動物細胞外培養成功，有利於研究活細胞的生理、生化功能。使細胞學從以研究形態學為主，逐步進入到研究細胞周期及其調控、細胞的基因表達及其調控、核質關係與細胞癌變機理的細胞分子生物學新領域。

運用細胞遺傳學、生物化學、細胞培養的知識和技術，對體外培養的哺乳動物體細胞進行研究，建立起體細胞遺傳學的新學科。現在體細胞遺傳學不僅成為研究人類遺傳學的重要實驗手段，而且也是人類遺傳病診斷與治療的理論基礎。

植物細胞培養比動物細胞培養起步晚，早期發展緩慢。1970年 Coking 找到合適的酶破壞植物細胞壁形成原生質體，建立起原生質體培養技術。1974年 Kao^[11]用聚乙二醇（PEG）誘導植物原生質體融合獲得成功，上述兩種技術推動植物細胞培養進入迅速發展的階段。隨著多種激素在愈傷組織與胚狀體等植物細胞培養中的應用，在實踐中能使培養的體細胞或性細胞形成完整的植株，使人們在理論上認識到植物體細胞的全能性。並且逐步形成了植物細胞工程的新領域。至今已在本草植物、木本植物、蔬菜作物、糧油作物等眾多的植物中獲得優良的新品種。

細胞培養還極大地推動了發育生物學的研究，使卵細胞在體外受精獲得成功，培育出試管嬰兒，試管山羊等。並且還能把早期的卵裂球分割後植入假孕母體中，獲得一卵多胎的羊羔。初步顯示出動物細胞的全能性，由此建立起生殖工程的新領域。

體外培養哺乳動物細胞與植物原生質體不僅是研究核質關係、誘

發突變、篩選突變種的好材料，而且還是研究外原 DNA 表達系統的好材料。如果能更多地了解細胞質因子對 DNA 表達的調控作用，將會有力地推動以 DNA 重組，DNA 轉化為主要內容的基因工程的研究工作。

綜上所述，在了解了多種多樣的體外培養細胞的生活習性和營養需求的基礎上，不僅要解決怎樣把細胞培養好，而且還要明了為什麼能把細胞培養好，還要研究怎樣培育各種各樣的生物新品種。因此，細胞培養既是重要的先進技術，又是一門新型的邊緣學科。在細胞培養的發展過程中，其它學科為它提供了理論基礎與應用前景，同時還由於細胞培養在衆多學科中的廣泛應用，它推動了醫學、農學、畜牧學與生物學等多種學科的發展。現在它已成為人們認識生物界與改進生物界的重要武器。正是通過細胞培養這一途徑，把我們引進了按照人類意志創造生物的新天地。

體細胞不僅是多細胞生物結構與功能的基本單位，而且體外培養的體細胞也是縱向傳遞遺傳信息的基本單位，它還是體外處理外源遺傳信息的基本單位，這在生物科學的發展中是一個巨大的飛躍。體外培養細胞和體內細胞，一方面有著許多共性，因此可以通過了解體外培養細胞生物學特性的途徑來深入了解體內細胞的特性。另一方面更要注意它們之間的差異，如生物導彈治療一些腫瘤，某些遺傳病的診斷與治療，還有培育出地上部分結西紅柿地下部分長土豆的土豆西紅柿雜種等。許多奇跡的出現正是建立在這些差異的基礎上。

許多生物科學工作者已進入研究體外培養細胞的領域，他們在動物細胞、植物細胞、微生物細胞等方面進行著廣泛的研究。好像一部分物理學工作者進入原子核的研究領域後，建立了原子核物理學和原子核工業一樣，以體外培養細胞為基礎的生物技術必將在疾病的診斷與治療，特別是在腫瘤病與遺傳病的診斷與防治，培育有用生物新品種等方面將作出目前無法估計的成績。隨著生物科學與技術的發展，

在下世紀即將建立起新型的工業體系，如生物藥品工業、人工胚胎工業、人工生物種子工業以及生物能源工業，生物採礦工業、環境保護生物工業等。

我國組織培養與細胞培養工作的發展始於本世紀 30 年代，張鑒、鮑鑑清等分別在上海、北平開展了動物組織培養方面的工作。在植物方面李繼侗用組織培養方法銀杏，羅士葦培養生長錐，崔徵培養愈傷組織，這些是我國早期組織培養的主要工作。新中國成立後組織培養工作有較快的發展。鮑鑑清等在進行組織培養實驗的基礎上，於 1954 年出版了我國第一本有關細胞培養的專著《組織培養術》。高尚蔭、劉年翠進行了昆蟲組織培養，陳瑞銘建立了擦鏡紙培養等方法（1954、1963），以研究器官之間及組織與組織之間的相互關係。吳旻、何申、鄂征等進行了遺傳學和腫瘤學方面的研究工作，王潛淵、湯飛凡、章以浩、朱既明以及北京血清研究所、北京生物製品研究所等單位利用組織培養進行病毒學方面的研究。從 70 年代末起組織培養工作在我國發展較快，有較多的實驗室開展了此項工作。並取得不少成績。在動物細胞方面建立了一系列細胞系⁽¹²⁾，正在縮短與世界水平的差距。在植物細胞培養方面已取得了一系列世界水平的工作⁽¹³⁾。

參考文獻

- [1] 鮑鑑清、郭頌霞合編，1965，組織培養術，人民衛生出版社，北京。
- [2] 大章星一等著，1979，人癌細胞培養，吳政安等譯，科學出版社，北京。
- [3] 華斯萊編，何申等譯，1982，動物組織培養技術，科學出版社，北京。
- [4] 鄂征主編，1988，組織培養技術（第二版），人民衛生出版社，

北京。

- [5] Freshney, R.L., 1986, *Animal Cell Culture*, IRL Press, Oxford Washington D C.
- [6] Paul, F.Kruse, jR., and M.K. Patterson, jR., 1973, *Tussue culture methods and application*, Academic Press, New york and London.
- [7] Jennie, P.Mather, 1984, *Manimalin cell culture*, Plenum Press, New York and London.
- [8] Okada, J., 1962, Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from ascites twmor cells I. microscopic observation of giant polynuclear cell formation, *Exp. Cell Res.* 26: 98-107.
- [9] Lifflefield, J.W., 1964, Serection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science* 145: 709-710.
- [10] Köhler, G., and Milstein, C., 1975, Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature (london)* 256: 495-497.
- [11] Kao, K. N., F. Constabal, M.R. Michayluk, and D.G. Camborg, 1974, Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells, *Planta* 120(3), 215-229.
- [12] 何申, 1983, 建國以來我國自建的一些細胞株系, *細胞生物學雜誌*, 4, 35-41。
- [13] 陳正華主編, 1986, *木本植物組織培養及其應用*, 高等教育出版社, 北京。
- [14] 翁延年, 1992, 我國生物技術發展的回顧與展望, *生命科學*, 4(2), 19-21。