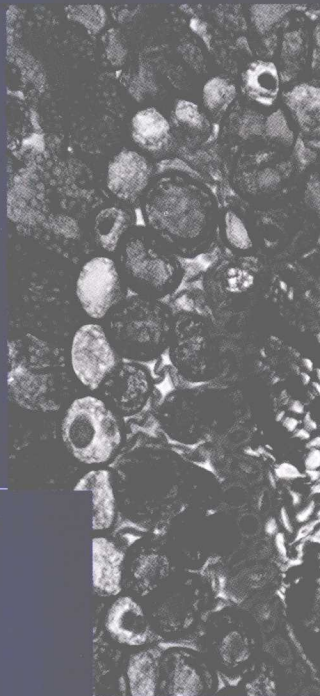
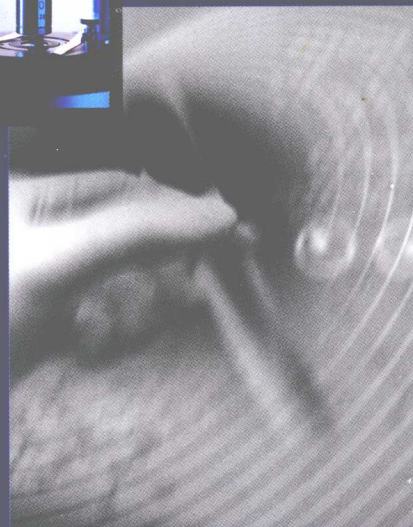
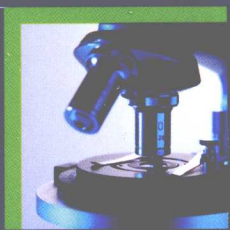


■ 全国高等医学院校研究生教材

主编 谷鸿喜 张凤民 凌虹

细胞培养技术

Techniques of
Cellular Culture



北京大学医学出版社

第 1 章 细胞培养技术概述

1.1 细胞培养技术概述

细胞培养技术



科学出版社

高等医学院校研究生教材

细胞培养技术

Techniques of Cellular Culture

主 编 谷鸿喜 张凤民 凌 虹

副主编 钟照华 刘建宇 李 迪

编 委 (按姓氏拼音排序)

房 勇	付英梅	谷鸿喜	李 迪	李 妍
凌 虹	刘建宇	钱 钧	商庆龙	宋武琦
滕 旭	佟 雷	王 燕	魏兰兰	徐维祯
翟爱霞	张凤民	张庆猛	张文莉	张晓丽
赵吉子	钟照华	庄 敏		

北京大学医学出版社

XIBAO PEIYANG JISHU

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞培养技术/谷鸿喜, 张凤民, 凌虹主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2012. 1
ISBN 978-7-5659-0262-8

I. ①细… II. ①谷…②张…③凌… III. ①细胞培养—医学院校—教材 IV. ①Q813.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 187482 号

细胞培养技术

主 编: 谷鸿喜 张凤民 凌 虹

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京朝阳新艺印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 许 立 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 21.25 字数: 539 千字

版 次: 2012 年 1 月第 1 版 2012 年 1 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5659-0262-8

定 价: 49.80 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

当今，医学科学研究飞速发展，医学研究的手段相互交叉、跨越和渗透，促进了医学各学科的进步。细胞培养技术在医学研究领域中的许多学科间交叉和系统研究的重要手段之一，在病毒学、免疫学、细胞生物学、分子生物学、遗传学、毒理学和药理学等学科中得到了广泛的应用。细胞培养技术为深入探讨疾病发生、发展机制，为寻找疾病有效地治疗途径提供了重要的研究技术平台。因此，细胞培养技术是高等医学院校许多基础和临床等专业的研究生在进行课题研究时希望掌握和应用的技术。为了适应研究生在实验研究中的需要，我们学校从1998年就开设了“组织与细胞培养技术”课程，因此，在多年教学的基础上，我们编写了这本《细胞培养技术》。该教材适用于包括基础医学、临床医学、预防医学和药学等医学各类专业研究生的需要。

本教材以细胞培养基本理论和基本技术为主要内容，多以实验的形式叙述，具有实用性。全书共分四篇十五章。第一篇基本理论知识，主要介绍体外培养细胞的特征；第二篇细胞培养技术，主要介绍细胞培养的基本条件、细胞培养的基本实验技术、动物脏器来源细胞培养、人来源细胞培养、干细胞培养方法；第三篇细胞培养检测技术，主要是细胞培养形态学检查法、细胞增殖检测法、细胞培养分析技术等方法的介绍；第四篇细胞培养技术的应用，主要内容是细胞培养在病毒学研究、免疫学研究、药学研究中常用的实验以及在细胞遗传毒性检测、生物工程和肿瘤学研究中的应用。书后附有附录，包括中英文对照、常用细胞株、常用培养基及常用缓冲液的配制方法等内容。

在教材编写过程中得到哈尔滨医科大学研究生学院和北京大学医学出版社的大力支持。各位编委也付出了辛勤劳动，特别是张向光副教授为本书绘制了多幅插图，在此一并表示衷心感谢。

由于时间仓促，水平有限，难免有不足之处，请使用者多提修改意见，以便今后改进。

谷鸿喜
2011年7月

目 录

绪 论	1
第一节 细胞培养技术发展简史	1
第二节 组织培养技术的应用	4

第一篇 基本理论知识

第一章 体外培养细胞的特征	12
第一节 培养细胞生物学特征	12
第二节 培养细胞生存条件和代谢	18
第三节 体外培养细胞成功率分析	26
第四节 细胞系或细胞株的建立	27

第二篇 细胞培养技术

第二章 细胞培养的基本条件	32
第一节 细胞培养的实验设施及器材	32
第二节 实验器材的处理	37
第三节 细胞培养常用培养液及试剂	41
第三章 细胞培养的基本实验技术	49
第一节 无菌技术	49
第二节 标本采集的选择与处理	50
第三节 单细胞的制备	52
第四节 初代细胞培养法	55
第五节 传代细胞培养法	58
第六节 悬浮细胞培养法	59
第七节 玻片培养法	59
第八节 细胞计数法	60
第九节 细胞冻存、复苏与运输	62
第十节 细胞污染的检测与排除	63
第四章 动物组织细胞培养技术	66
第一节 大鼠肝细胞培养	66
第二节 新生兔肾细胞培养	68
第三节 大鼠胰岛细胞培养	69
第四节 动物心肌细胞培养	72
第五节 兔软骨细胞培养	75
第六节 新生大鼠骨骼肌细胞培养	77
第七节 兔主动脉平滑肌细胞培养	79

第八节	兔主动脉内皮细胞培养	82
第九节	大鼠神经组织细胞培养	86
第十节	小鼠骨髓细胞培养	89
第十一节	鸡胚成纤维细胞培养	89
第五章	人源组织细胞培养技术	92
第一节	人胚肾细胞培养	92
第二节	人胚肺二倍体细胞培养	93
第三节	人表皮角质形成细胞的培养	94
第四节	人脐带血管内皮细胞培养	95
第五节	肿瘤细胞的培养	96
第六节	羊水细胞的培养	99
第七节	淋巴细胞分离培养	100
第六章	干细胞培养技术	103
第一节	饲养层细胞制备	103
第二节	胚胎干细胞的分离培养	105
第三节	成体干细胞的分离培养	108
第四节	肿瘤干细胞的分离培养	112
第五节	干细胞生物学性状鉴定	114

第三篇 细胞培养检测技术

第七章	细胞培养形态学检查	117
第一节	生长状态及一般形态检查	117
第二节	倒置光学显微镜检测法	120
第三节	荧光显微镜检测法	126
第四节	电子显微镜检测法	131
第八章	细胞活性和增殖的检测	137
第一节	细胞计数	137
第二节	细胞活性的检查	138
第三节	细胞生长曲线法	142
第四节	细胞克隆形成试验	143
第五节	软琼脂集落形成试验	145
第九章	细胞培养分析技术	147
第一节	细胞遗传学检测技术	147
第二节	细胞 DNA 的检测	156
第三节	细胞 RNA 的检测	160
第四节	细胞基因表达产物的检测	166
第五节	细胞酶活性的检定	176
第六节	细胞凋亡的检测	178

第四篇 细胞培养技术的应用

第十章 细胞培养在病毒学研究中常用的实验	184
第一节 细胞培养分离鉴定病毒	184
第二节 中和试验(微量培养法)检测抗病毒抗体	189
第三节 体外抗病毒药效实验(微量细胞培养法)	191
第四节 受体蛋白免疫血清对细胞保护性实验	192
第十一章 细胞培养在免疫学研究常用的实验	194
第一节 杂交瘤细胞株及单克隆抗体制备	194
第二节 免疫细胞的分离与培养	198
第三节 淋巴细胞增殖的测定	204
第四节 免疫细胞功能的体外检测技术	207
第五节 免疫效应细胞毒实验	212
第六节 HLA 检测	215
第七节 常用细胞因子活性的检测技术	217
第十二章 细胞培养在药学研究中常用的实验	229
第一节 体外细胞培养检测药效主要注意事项	229
第二节 药物对细胞增殖影响的实验	230
第三节 血糖药物研究实验	233
第四节 抗肿瘤药物敏感性检测实验	237
第五节 血管平滑肌增殖的抑制实验	243
第十三章 细胞遗传毒性检测实验	246
第一节 染色体标本制备	246
第二节 染色体畸变实验	249
第三节 淋巴细胞微核实验	250
第四节 非程序性 DNA 合成实验	251
第五节 姐妹染色单体交换实验	254
第六节 突变实验	256
第七节 试管内致癌实验(彗星试验)	257
第十四章 细胞培养技术在生物工程技术中的应用	260
第一节 细胞培养技术在细胞工程技术中的应用	260
第二节 基因的细胞内转导技术	270
第十五章 细胞培养技术在肿瘤学研究中的应用	286
第一节 培养细胞转化实验	286
第二节 肿瘤细胞浸润实验	289
第三节 肿瘤细胞癌基因及抑癌基因检测	292
第四节 肿瘤多药耐药基因及表达产物的检测	297
参考文献	301

附 录

1. 中英文词汇对照索引	303
2. 实验室常用的细胞系	308
3. 实验室常用人工合成的细胞培养基	324
4. 细胞培养相关实验用缓冲液	326

绪 论

第一节 细胞培养技术发展简史

一、基本概念

细胞培养技术泛指将人或动物活体的细胞或组织器官离体进行体外培养，因此该技术可笼统地称之为体外培养技术 (in vitro culture)。可将体外培养技术分为器官培养、组织培养和细胞培养三类 (图 0-1)，其中细胞培养技术是目前最常用的方法。

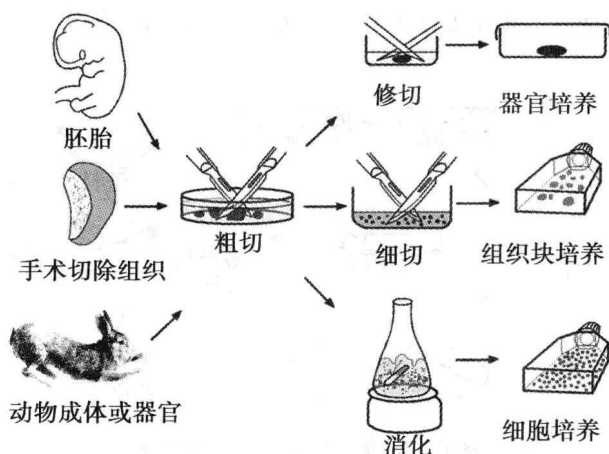


图 0-1 体外培养的三类方法

(一) 组织培养

组织培养 (tissue culture) 是从人或动物体内取出组织，模拟体内生理环境，在保证无菌、适宜温度和营养条件下，使之生存和生长并保持其结构和功能的方法。一般将组织处理为 $0.5 \sim 1\text{mm}^3$ 大小或切成 0.2mm 厚的组织片进行培养。

(二) 器官培养

器官培养 (organ culture) 指的是应用和组织培养相似的条件，培养的是器官的原基或器官的一部分或整个器官，使之在体外生存、生长和保持一定功能的方法。所用的材料是器官或器官的一部分。

(三) 细胞培养

细胞培养 (cell culture) 是以相似的培养方法体外培养单个细胞或单一细胞群，使其在适宜条件下生长并保持细胞特性。包括原代 (初代) 细胞培养、二倍体细胞株和传代细胞系培养。这是目前体外培养中最常用的方法。

三种体外培养来源较广，可以是人或动物的胚胎组织和器官，也可以是动物成体的组织

或器官，或人体活检组织或手术取下的器官、组织或肿瘤组织。大体过程均为先去除筋膜、脂肪组织后，将组织或器官粗切，粗切的器官经修切后可直接培养，即为器官培养；粗切的组织再细切为 1mm^3 大小进行培养，即为组织块培养；将细切的组织经过酶消化成单个细胞进行培养，即为细胞培养。

二、细胞培养技术发展史

19 世纪末开始就有组织培养技术。最早提出组织培养概念的是德国学者 W. Roux。他于 1885 年用温生理盐水体外培养鸡胚髓板组织，结果存活了数日。这被认为是组织培养的萌芽试验。1897 年 B. Loeb 首次将兔肝、肾、甲状腺及卵巢组织块放入含有少量血浆凝块的试管中培养，结果 3d 内这些组织仍能保持其组织结构。这被认为是器官培养的最早实验。J. Jolly 于 1903 年用悬滴法将蝾螈白细胞在体外培养存活了一个月左右。1906 年 SP. Beele 和 Ewing 用盖玻片悬滴培养法，以动物血清做培养基，培养的狗淋巴细胞存活了 72h，并曾见到了细胞生长的现象。这些实验不仅证明组织细胞可体外培养，更为体外培养技术奠定了实验基础。

现代组织培养法的建立一般认为是从 1907 年 R. Harrison 开始的，大体发展过程见图 0-2。

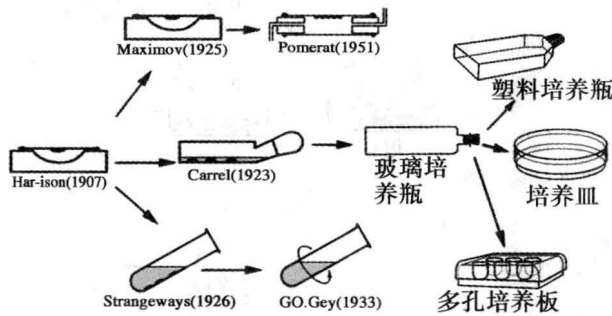


图 0-2 体外培养技术发展过程

Harrison 创建了覆盖凹玻片悬滴培养法，此法的基本技术是在无菌条件下，采用蛙淋巴液做培养基，培养蛙胚脊髓髓管。在一定时间更换培养用的淋巴液，结果神经组织存活了数周，并观察到神经细胞突起的生长过程。由此建立了体外培养组织的基本模式系统。Carrel 也用这种方法于 1912 年成功地用鸡胚浸液培养了多种动物组织。1923 年 A. Carrel 又设计了卡氏培养瓶培养法，扩大了组织生存空间。为此 Harrison 和 Carrel 等科学家的研究为组织培养的进一步发展奠定了基础，也使现代体外培养技术被创建。1925 年 A. Maximov 采用双盖玻片悬滴培养法，既方便更换培养液，又降低污染机会。1951 年 CML Pomerat 发明灌流小室培养法更方便培养液的更换，使玻片悬滴培养法更完善。1926 年 TSP. Strangeways 建立了试管培养法，1933 年 GO. Gey 又创立了旋转试管培养法，能使培养的组织 and 细胞充分接触培养液，利于组织生长。后来卡氏培养瓶培养法得到改进和充分应用，直至分化到目前用的培养瓶、培养皿、培养板等。

体外培养技术创立后，迅速得以发展。发展主要集中在营养条件、组织细胞来源、培养方法、培养器皿和对培养细胞检测技术等方面。①在营养条件方面，从天然营养物质如淋巴液、血清、血浆及胚胎浸液的使用，逐渐向成分明确的人工合成培养基发展。从 1910 年

Trrode 盐溶液的合成, 到 1949 年 JH. Hank 的 Hanks 缓冲液及 1954 年 Dulbecco 磷酸盐缓冲液的发明; 从 1933 年 JPM. Vogelaar 及 1936 年 LE. Baker 的人工培养液的发明, 到 1950 年 JF. Morgan 的 199 培养基及 1955 年 H. Eagle 人工合成培养基的合成, 直至现在常用的 MEM (H. Eagle, 1959) 和 RPMI1640 (Moore 等, 1967) 等人工合成培养基, 使细胞培养的营养条件得到完善并向商品化发展; ②在培养技术方面, 在悬滴培养法的基础上, 从 20 世纪 50 年代起, 培养技术得到很大的改进。1957 年 Dulbecco 等采用胰蛋白酶消化处理和应用液体培养基的方法, 获得了单层细胞培养。单层细胞培养法的出现, 对组织培养的发展起了很大的推动作用。此后单层细胞培养便成了组织培养中普遍应用的技术, 并用单层细胞培养法建立了很多细胞系 (cell line), 使细胞培养技术成了体外培养的主导技术。1959 年 Lovelock 等人发现了二甲基亚砷具有细胞冷冻保护作用, 使细胞得以冻存复苏而长期保存和使用, 并建立了细胞库; ③组织细胞来源从无脊椎动物细胞到哺乳动物细胞, 从动物研究到植物研究, 该项技术逐渐广泛应用到对各类生物组织细胞的培养; ④培养细胞检测技术。从 20 世纪 50 年代末, 组织培养技术的应用进入了一个繁盛阶段。生物科学与技术科学相互渗透、遗传学和生物化学相互结合, 出现了分子遗传学、分子生物学、细胞工程等新兴科学。这些新科学的形成和发展从不同角度应用于细胞培养技术中, 使细胞培养检测技术有了飞跃发展, 促进了细胞培养技术的进步, 使其广泛用于生物学和医学研究各个领域, 出现了用各种理化措施诱发出遗传缺欠的细胞株, 应用细胞杂交瘤技术制备的单克隆抗体、用培养细胞检测环境中可疑致癌物、癌基因转染和细胞转化等各种新技术。当前的组织培养技术不仅是用于研究生命科学理论的重要技术方法, 也日益成为生物工程和基因工程的生产手段; ⑤培养器皿方面, 近年随着科技工业的发展, 供细胞培养用的各种条件, 如培养器皿、培养基和血清等都已商品化和系列化, 使细胞培养工作已成为轻而易举的事情。培养器皿, 从唯一玻璃制品到聚苯乙烯质材的各种规格培养瓶、培养皿及各种孔径的培养板, 从反复使用到一次性均体现了培养技术辅助设备的发展, 方便了使用者与操作者, 促进了培养技术的发展。应用冻存技术可把细胞株长期冻存。在一些发达的国家已建立了统一冻存细胞的细胞库或中心, 如美国的 ATCC (American Tissue Culture Collection); HGMR (Human Genetic Mutant Repository), CAR (Cell Aging Repository) 等。这些设施为组织培养的研究和发展提供了方便。

早在 20 世纪 30 年代体外培养技术就传入我国, 当时最早开展的是对植物胚芽的培养。但动物组织体外培养技术基本上是从 50 年代开始的, 并被应用到生物制品的制备及医学研究, 如用组织培养技术进行病毒分离制备病毒疫苗等。从 70 年代起, 我国组织培养技术发展迅速。特别是近 30 年来在我国生物学和医学各领域得到广泛应用, 已建立了多种人组织和不同类生物细胞及肿瘤的细胞系。我国人及动物细胞库已经建立, 细胞培养用品、培养基、血清、各种试剂等均已商品化, 细胞培养技术得到更大发展。在应用细胞培养技术的研究中, 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 转染和细胞转化、分子杂交等各种新技术的使用已非常普遍。实验研究已从细胞水平深入到分子水平。对很多现代课题如细胞转化、癌变机制、细胞的基因表达及干细胞培养分化和应用等进行着广泛的研究, 并取得了可喜的成果, 有的已经达到国际水平。

三、细胞培养的优缺点

细胞培养技术在现代医学和生物科学研究中应用极为广泛，具有以下几个优点：

1. 能长时间直接观察活细胞的形态结构和生命活动；可用于细胞学、遗传学、免疫学、实验医学、肿瘤学及临床治疗等多种学科的研究工作。
2. 便于使用光学显微镜、电子显微镜以及荧光显微镜进行直接观察。
3. 可用摄像及微机系统等方法进行记录，能直接记录细胞变化和状态。
4. 可供研究的细胞种类极其广泛，从低等生物到哺乳动物及人类；从胚胎到成体；从正常组织到肿瘤细胞，皆可用于培养。
5. 可以采用组织化学、同位素标记基因标识和检测等技术对组织细胞进行遗传学和生物学性状研究等方法观察和研究细胞。
6. 易于施用物理、化学和生物因素等进行实验研究。
7. 可进行培养，作为制备生物制品、单克隆抗体生产和基因工程制品等的生产手段。

组织培养作为一种技术，主要不足是由于组织和细胞离体以后，人工培养的生长环境与体内环境相比，仍有很大差异，故体外实验结果不能轻易作出与体内等同的结论。

(谷鸿喜)

第二节 组织培养技术的应用

随着组织培养技术的发展，在许多领域均得到应用，如在病毒学、免疫学、药学、遗传学、分子生物学及基因工程等方面。无论是对各领域的基础理论研究，还是对许多生产领域的发展均起到重大的推进作用。

一、病毒学研究方面的应用

自组织培养方法建立以后，就为病毒学的研究提供了可靠的研究手段。这与病毒增殖的性质有关。病毒必须在活的细胞内才能增殖，为此利用组织培养得以了解到病毒的生物学性状、致病机制等规律，促进了病毒学的飞快发展。主要应用有以下几方面：

(一) 检测病毒

对病毒感染性疾病的微生物学诊断即从标本中分离鉴定病毒，对新分离病毒鉴定及制备疫苗等均需要增殖病毒或检测病毒。

1. 增殖病毒 利用组织培养细胞来增殖病毒。最早是由 Maitland 于 1928 年创立的组织片培养法来增殖病毒。不同种类的病毒一般均有敏感的细胞株，在敏感细胞株上病毒增殖快且增殖的指标明显。最主要的增殖指标是通过观察细胞病变来判定。观察细胞病变，是由 Enders 等确立的。如果有病毒增殖，在光学显微镜下就能观察到细胞变圆、坏死并从瓶壁脱落等现象，故称为细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)。CPE 往往随病毒种类和所用细胞种类不同而异，这些变化在一定条件下比较稳定，因此可根据有特征的 CPE 对某些病毒进行初步的识别。有些病毒可在培养细胞内形成包涵体、融合细胞以及代谢后培养液 pH 变化，这些变化均可作为鉴定病毒增殖和病毒种类的指标。

2. 病毒定量研究 利用组织培养技术增殖病毒，测定病毒含量，也是对病毒感染性的测定。对病毒感染性的研究，也是以组织培养法为基础。常用的方法有两种，一是蚀斑形成

试验，二是 50% 组织细胞感染量的测定。

(1) 蚀斑测定：该方法是 Dulbecco 和 Vogt 于 1954 年创建的。其原理是将一定稀释的病毒悬液加入到单层细胞培养瓶中，吸附一定时间后再覆盖一层半固体营养琼脂，使病毒在单层细胞培养层中不易扩散。结果每一个有感染性的病毒在单层细胞中可产生一个局限性的感染灶，用中性红染色，活细胞着色，形成灶的死细胞不着色，形成肉眼可见的蚀斑。每个蚀斑是由一个感染性病毒颗粒复制而形成的，故称为蚀斑形成单位 (plaque forming unit, PFU)，该试验是一种检查和准确滴定病毒量的方法，用 PFU/ml 来表示。

(2) 50% 组织细胞感染量 (TCID₅₀) 测定法：该方法是测定病毒感染组织培养细胞后，引起 50% 发生感染的最小量。一般是将病毒 10 倍系列稀释后，分别接种细胞，经一定时间后观察细胞病变、血球吸附等指标，以最高稀释度能感染 50% 细胞的量为终点，计算出 50% 组织细胞感染量 (50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀)。该方法是半数感染量估计病毒感染性的强弱及含量，但不能准确测定感染性病毒颗粒的数量。

3. 病毒和细胞间关系的研究 病毒感染细胞在细胞内复制，能使细胞发生各种病理变化，这是研究病毒在细胞水平上致病机制的良好手段。例如病毒在细胞中增殖时，能在显微镜下观察到细胞病变死亡脱落等明显细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)，这样的病毒，其致病机制主要是通过直接杀伤效应来实现的，致使被感染细胞死亡，如无包膜病毒便是如此。如果病毒感染细胞在显微镜下观察到细胞融合，出现多核巨细胞时，说明这些病毒不具有杀细胞效应，而是有包膜病毒引起细胞膜发生变化，导致感染细胞与邻近细胞的融合，借此方式病毒进行扩散。也可通过研究病毒与细胞受体相互作用、细胞凋亡机制、抗原变化及基因整合等情况从分子水平上来研究病毒的致病机制。

(二) 病毒性感染的血清学诊断

对病毒性感染血清学诊断最常用的方法是中和试验、补体结合试验、血凝抑制试验等。其中中和试验多采用细胞培养方法进行测定。其原理是将系列稀释的病毒液与血清混合后，再分别感染细胞，测定病毒的感染性，观察血清对细胞的保护作用。如果细胞不出现病变，则证明血清中有病毒特异性抗体存在。中和效价是以能完全保护细胞不产生 CPE 的血清最高稀释倍数来表示。用此试验可检测患者血清中抗体的消长情况，常用于病毒感染的流行病学调查，也可用来鉴定未知病毒或研究病毒的抗原结构。

(三) 肿瘤病毒致癌机制的研究

肿瘤病毒有使细胞发生转化、癌变的作用，利用细胞培养技术可以探讨肿瘤病毒对细胞的转化以至于致癌的机制。其原理将肿瘤病毒感染培养细胞，观察细胞的形态、增殖能力、永生性及遗传性等生物学性状的变化。

(四) 制备病毒性疫苗

病毒疫苗有多种，包括减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、多肽疫苗及基因工程疫苗等。这些疫苗的制备和生产过程均必须采用组织培养技术来大量增殖病毒，特别是减毒活疫苗的研制必须经过反复传代诱变培养，筛选出对人毒力弱或无毒的病毒变异株，才能制备出减毒活疫苗。制备基因工程疫苗时，将病毒基因重组体导入原核细胞或哺乳动物细胞中进行表达的过程，亦需要细胞培养技术。

二、免疫学研究方面的应用

免疫学是研究免疫器官、免疫细胞及免疫分子结构及其免疫生物功能的科学。20 世纪

60年代以后，由于免疫系统概念的确立使免疫学有着突飞猛进的发展。在对免疫学研究的实验中，组织培养技术也作出了应有的贡献。

(一) 免疫细胞的分离与检测

1. 各种免疫细胞分离培养技术 将人或实验动物的外周抗凝血用淋巴细胞分层液密度梯度离心、分离出淋巴细胞层，其中含有大量淋巴细胞。胎儿或动物的脾细胞制备主要采用研碎、钢网滤过后溶掉红细胞，即能制备成脾淋巴细胞悬液，用不同方法可以分离到 T 细胞、B 细胞或 NK 细胞。按不同实验目的（加待测物）进行培养，例如，T 细胞转化试验、B 细胞抗体产生测定试验或 NK 细胞杀伤试验等。

2. 淋巴细胞转化试验 (lymphocyte blastogenesis test, LBT) 其原理是 T 细胞在体外培养时，受到特异抗原或 PHA、conA 等非特异有丝分裂原刺激后，能转化成体积大、代谢旺盛的淋巴细胞。方法是将淋巴细胞分离后，加入 PHA 或特异抗原，在营养液中培养 3d，显微镜下观察，计算出转化细胞的百分率。也可以在培养时加入³H 标记胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR)，用闪烁计数器测定淋巴细胞 DNA 参入³H-TdR 量计算转化率。

3. 混合淋巴细胞培养 (mixed lymphocyte culture, MLC) 原理是两个无关个体的淋巴细胞混合在一起培养时，由于 HLA-D、HLA-DR 抗原不同，可互相刺激对方的淋巴细胞发生转化，根据淋巴细胞转化的程度判定组织相容性及抗原差异程度。单卵双生子间淋巴细胞混合培养后不发生转化；有直接亲缘关系的淋巴细胞混合培养后转化较弱；而两个无关个体的淋巴细胞混合培养后转化强烈。器官移植前可利用此法将供、受体淋巴细胞混合培养，来选择转化最弱者做供体，尽量减弱排斥反应，但目前多以检测供、受两体 HLA 的一致性的程度来选择器官供体。

4. 抗体产生细胞检测 B 淋巴细胞是抗体产生细胞，其测定方法是于 1963 年由 Jerne 等人首先报道，自他们对小鼠产生抗体的 B 淋巴细胞检测后，得到广泛应用。其原理是用异种动物（如绵羊）的红细胞免疫小鼠，4 日后取脾制备淋巴细胞悬液，并将一定数量淋巴细胞、抗原红细胞和豚鼠补体及琼脂一起混合培养，产生抗体的 B 淋巴细胞周围由于存在红细胞及相应的抗体和补体即可产生空斑，观察和计空斑数，就可计算出抗体产生细胞的百分率。

检查对其他特异抗原的抗体形成细胞时，同样预先 4~8 周前用待检抗原免疫小鼠，再取脾细胞培养 4 日后，再加入特异抗原致敏的羊红细胞及补体，能检测出对该抗原产生抗体的淋巴细胞数。

(二) 杂交瘤技术

1975 年 Milstein 和 Kohler 首先在细胞融合技术的基础上创建了 B 淋巴细胞杂交瘤技术。他们用体外培养的小鼠骨髓瘤细胞和经绵羊红细胞免疫的同系小鼠脾细胞进行融合，建立产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。所建立的杂交瘤细胞既具有脾细胞分泌绵羊红细胞抗体的能力，又具有骨髓瘤细胞在体外培养传代的生物特性，在根据人类意愿制备和应用抗体方面开创了新纪元。此法已被广泛用来针对蛋白质、多糖、细菌、病毒、寄生虫和细胞表面抗原制备单克隆抗体，即针对某一抗原决定簇的抗体。一旦杂交瘤细胞系建立之后，它将永远存活而且可无限的获得单克隆抗体，具有广泛的应用价值。自该技术建立后，国内、外已建立成千上万种单克隆抗体产生细胞株，研制出试剂盒被用于研究和临床诊断，这对医学是一个很大的贡献。为此两位学者于 1984 年获得诺贝尔奖。

在杂交瘤细胞建立过程中，需要对骨髓瘤细胞、淋巴细胞和融合细胞的反复培养和细胞株的筛选，对各种细胞培养条件和培养液均有不同要求，在实验过程中需要较高的培养技术。

(三) 细胞因子检测技术

机体的免疫细胞及非免疫细胞能产生不同种类的细胞因子，它们在免疫应答中起着调控作用。细胞因子检测是判断机体免疫功能的重要指标，对某些疾病诊断、病程及预后判断均十分必要。在检测细胞因子的实验中，细胞培养技术得到应用。检测某些细胞因子时，需要体外培养和增殖细胞因子依赖的细胞株。利用这些依赖性细胞株，可以检测相应的细胞因子。因为某些肿瘤细胞株必须依赖于某种细胞因子才能在体外增殖，增殖程度与细胞因子量呈正相关，如 HT-2 或 CTL L-2 细胞株依赖 IL-2，KD₈₂₃ 细胞株依赖 IL-6 等。另外干扰素 (interferon, IFN) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 的活性测定均需有靶细胞，才能进行实验。细胞增殖程度可用³H-TdR 掺入法及 MTT 法检测。

(四) 免疫酶技术

该技术用酶 (常用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶) 标记已知抗体或抗免疫球蛋白，检测相应的抗原，也可标记抗原检查相应的抗体。液相物检测时是抗原抗体及酶标抗体反应后再加入底物显色，用酶标仪测定待测物质的含量。免疫组化法是将组织 (或肿瘤) 的切片或组织培养的细胞片 (或病毒感染片) 用特异抗体，酶标记免疫球蛋白先反应，再加底物显色，显微镜下可观察显色位置，即是被检测的抗原存在的位置。

三、分子生物学研究方面的应用

组织培养技术在体外培养细胞的转化和 DNA 转导等技术中得到应用。人工诱发体外培养细胞的转化，是研究癌变机制的重要方法。其优点是可用于研究各种致癌因素的转化细胞的作用，且能够直接进行观察和分析。在细胞培养条件下，可以用人工方法诱发癌变，而且重复性好，从而构建体外癌变模型，同时亦可用于检测环境中致癌物，是国内外研究癌变机制中普遍应用的技术。

DNA 转导或导入技术是把外源 DNA 或目的基因导入细胞内的技术，已成为当今研究基因的重要方法。在体外培养细胞基因导入的基础上，已有向体内细胞导入基因的研究，则可能成为基因治疗的重要手段之一。

(一) 细胞转化

细胞转化是细胞发生遗传性改变的一种变化，涉及基因的改变。细胞发生转化后的性状可以代代相传，能够长期维持和存在。但细胞转化或基因突变不一定是癌变。因此细胞转化分为一般转化和恶性转化两种。转化分自发转化和人工诱发转化。

1. 细胞自发转化 是在未用任何诱变剂处理的情况下，细胞自发出现的转化现象，实质上它是一种原因不明的转化现象。初代培养细胞在良好的培养条件下呈二倍体核型，如冻存或传代次数不多的情况下，细胞仍能继续维持二倍体性状。但若长期反复传代，在某些难以控制的因素如营养液或血清质量不佳、微生物污染、温度和 pH 不稳等影响下，有可能发生自发转化。自发转化的表现为：细胞核型异倍化、获得永生性、接触抑制消失等。

2. 人工诱发细胞恶性转化 在细胞培养条件下，用化学、物理和生物等各种致癌因素，均可人为地诱发细胞发生转化。从细胞直接受到致癌物的作用到细胞发生恶性转化，一般需 0.5~3 个月。体外人工诱发细胞转化，对研究癌变机制和检测环境中可疑致癌因素等有很

大的实用价值。

常用于细胞转化的细胞有原代细胞和传代细胞。原代细胞多用动物或人成纤维细胞；C3H10T1/2、3T3-swiss、BALB/3T3、BHK-21、NIH3T3、Rat-1、PC-12等为传代细胞。

凡能改变DNA(基因)结构的因素都可能成为诱发细胞转化因素。包括：①化学因素：常用有MNNG等。②物理因素：射线，包括阴极射线、放射性核素等。③病毒：SV40、逆转录病毒等。④癌基因：大多癌基因均有使细胞发生转化的能力，但癌基因的转化必须借助载体向细胞中转导技术，来诱导细胞发生转化。

检测细胞是否发生转化常从以下几方面观察：①细胞生物学性状：包括细胞形态、生长速度、倍增时间等。②细胞遗传学特征：包括核型分析、染色体组型、畸变和标记染色体等。③恶性转化测试：浸润性试验、细胞永久性增生试验、异体动物接种成瘤实验等。

(二) 细胞凋亡的研究

细胞在体内外因素促发下激活细胞预存的死亡程序而导致死亡，称为凋亡(apoptosis)。细胞凋亡在维持生理稳定以及免疫防御起到重要作用。不同内外因素可通过不同途径，激活细胞凋亡相关蛋白和酶合成释放，使染色体被切割成180~200bp倍数大小片段，细胞膜内陷包裹DNA片段形成凋亡特征性的凋亡小体。从光镜下、电镜下形态特征及DNA梯形电泳图等都具有凋亡特征性改变，与正常细胞、坏死细胞不同，对研究肿瘤、自身免疫病等疾病发生机制及筛选药物很有研究意义。

(三) DNA转导技术

把基因导入细胞中的技术称为基因转导(gene transfer)。通过基因导入细胞，可使外源基因整合入受体细胞基因组中，是研究基因表达、结构和功能的技术方法。培养细胞是基因转导最适宜的对象。基因转导，尤其是检测癌基因，更为常用。

基因转导技术的种类很多。基因转导可在染色体和DNA大分子(基因)两个水平上进行。①染色体基因转导是利用细胞融合或显微注射法把携有目的基因的染色体或染色体片段，整合入受体细胞内的技术。②基因转导是把已克隆的基因、含有目的基因的DNA片段或基因序列等，转入受体细胞基因组中的技术。根据受体细胞的不同，基因转导分成两大类：一类是把基因转入体外培养细胞中，观察目的基因在体外细胞中的表达，这一技术亦称基因转染(gene transfection)。以体细胞为基因导入对象时，一般用培养细胞，但也可用体内二倍体细胞。如用体内细胞，需先从体内取出细胞，导入基因后，再输回体内；体内细胞基因导入已成为基因治疗技术之一。另一类受体细胞是受精卵，向受精卵内导入目的基因后，再把受精卵置入宿主动物子宫、发育成个体；可在胚胎期检测目的基因表达，也可于生后再进一步观察目的基因在整体内的表达，此技术称为转基因技术(transgenic technique)。基因转导的具体技术方法当前有：磷酸钙法、脂质体介导法、电击法、显微注入法、病毒载体介导法和DEAE葡糖法等多种。

(四) 基因诊断和基因治疗技术中的应用

基因诊断技术随着生物技术的发展而逐步完善起来，已广泛应用于临床研究和诊断。这一技术的关键首先需要从细胞中分离足够量的DNA和目的基因，再进行标记制备特异基因探针，进而利用核酸杂交(nucleotide hybridization)及聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction, PCR)来检测致病基因。在基因诊断实验过程中也有细胞培养技术的应用。

当今一些同遗传因素密切相关的人类遗传性疾病也是严重威胁人类健康的因素。随着生