

组织培养技术

(修订本)

5-33

鄂征 主编
人民卫生出版社

责任编辑 张之生

组织培养技术

(第二版)

鄂征 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京密云卫新综合印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 10 $\frac{5}{8}$ 印张 4插页 277千字

1984年3月第1版 1988年5月第2版第3次印刷

印数: 11,101—16,950

ISBN 7-117-00317-0/R·318 定价: 2.80元

[科技新书目 157—87]

谨借此书以表对两位老师：白求恩医科大学陈淇园老校长和我国组织培养开拓者鲍鉴清教授的崇敬与怀念。

第二版前言

《组织培养技术》自1982年出版以来，这一技术在医学中的应用日趋广泛，并获得了更新的发展。另一方面，随着我国科技事业的发展，研究生及青年科学工作者对组织培养技术的兴趣与日俱增，对该技术内容的要求也不断提高。为适应读者的需要，本书第二版内容做了较大的修改和充实。

这次修订保留了第一版的大部分内容，删除了个别章节、增加了一些培养技术和研究方法、增添改绘了部分插图。修订的基本原则仍然遵循：(1) 全书内容力求重点突出；(2) 以指导实践操作为主，又适当联系基本理论；(3) 深入浅出，简明易懂；(4) 插图实用明了。

经过一年多的修改，本书终于要和读者见面了，它究竟如何，请批评指正。

在本书修订中，路桂荣、武纯净和安捷等同志曾协助整理和誊写，特此感谢。

鄂 征

一九八六年十二月廿二日

目 录

第一部分 绪论和基本理论知识	1
1 绪论.....	1
组织培养基本概念.....	1
对组织培养的评价.....	2
组织培养发展简史.....	3
早期组织培养.....	3
组织培养的建立.....	3
组织培养的发展.....	4
现代组织培养.....	4
我国组织培养的发展.....	6
对组织培养工作者的要求和工作方法.....	7
2 组织培养细胞生物学.....	8
体内、外细胞的差异和分化.....	8
差异.....	8
分化.....	9
体外培养细胞的分型.....	10
贴附型.....	10
悬浮型.....	13
细胞形态结构.....	13
大体形态.....	13
超微结构.....	15
组织培养细胞的生长和增殖过程.....	16
组织培养细胞生命期.....	16
组织培养细胞一代生长过程.....	18
细胞周期.....	21
细胞相互关系.....	24
组织培养细胞遗传学特征.....	25

细胞生存环境和代谢	27
人工培养基	33
合成培养基	33
天然培养基	33
无血清培养基	34
附着底物	34
抑制细胞生长因素	35
细胞代谢	35
3 建立细胞系或细胞株	39
体外培养细胞的种类和命名	39
建立细胞系(或株)的要求	41
已建立细胞的鉴定、管理和使用	42
第二部分 实验室设施条件、培养用液	43
实验室设计和设备	43
实验室设计	43
无菌操作设施	43
实验室设备	46
大型装置和仪器	47
器械	51
培养器皿	51
杂用品	53
5 培养用液	55
水和平衡盐溶液	56
水	56
平衡盐溶液	56
天然培养基	58
鸡血浆的制备	58
鸡胚浸出液的制备	58
小牛血清	60
水解乳蛋白	62
鼠尾胶原	63
合成培养液	64

合成培养液的种类	64
合成培养液的主要成分	74
合成培养液的配制	75
培养液的种类	82
无血清培养基	83
基础培养液	84
附加成分	84
其它常用液	88
消化液	88
pH 调整液	90
抗生素液	90
6 清洗与消毒	91
清洗	91
玻璃器皿	92
胶塞	93
塑料器皿	94
包装	94
消毒	94
紫外线	95
干热消毒	95
湿热消毒	95
滤过消毒	96
射线消毒	97
消毒剂的使用	98
第三部分 基本培养技术	100
7 细胞和组织培养基本技术方法	100
基本要领和要求	100
无菌操作	100
取材	102
取鸡胚组织	102
取鼠胚组织	103
取皮肤	104
取血	104

取骨髓组织、羊水、胸水和腹水·····	104
组织分离·····	105
离心分离法·····	105
切割分离组织法·····	105
机械分散组织法·····	105
消化分离法·····	107
细胞计数法·····	112
细胞冻存·····	114
原理·····	114
要点·····	115
冻存方法·····	115
复苏方法·····	117
细胞运输·····	119
8 天然培养基组织培养法·····	119
双盖片悬滴培养法·····	119
初代培养·····	119
换液和传代·····	121
柯氏瓶培养法·····	122
9 人工合成限定培养基组织培养法·····	123
初代培养·····	124
消化培养法·····	124
组织块培养法·····	127
传代培养·····	128
加支持物培养法·····	130
悬浮培养·····	131
10 单细胞分离培养·····	131
要点·····	131
要求·····	131
原理·····	131
提高克隆形成率的措施·····	132
技术方法·····	135
低密度细胞悬液的制备·····	136
接种·····	138
11 微载体细胞培养·····	142

原理.....	143
微载体及其性质.....	143
微载体细胞培养方法.....	145
12 球体细胞培养	146
原理.....	146
培养方法.....	146
球体细胞培养.....	146
球体细胞和单层细胞混合培养.....	148
13 培养细胞生物学检测和建立细胞株(或系)	149
细胞培养常规检查.....	149
细胞生物学检测.....	151
形态学方面.....	151
细胞生长方面.....	153
活细胞直接观察.....	156
细胞遗传学方面.....	156
细胞转化及恶性程度检查.....	156
其它方面观察.....	160
14 培养细胞同工酶的测定	160
原理.....	160
方法.....	161
15 二倍体细胞培养	162
要点.....	162
方法.....	163
16 建立突变细胞系	163
原理.....	163
突变.....	164
HGPRT基因.....	164
方法.....	165
细胞选择.....	165
诱发 HGPRT ⁻ 缺欠型.....	166
17 肿瘤细胞培养	168
肿瘤细胞培养基本知识.....	168
肿瘤细胞生物学特性.....	168
肿瘤细胞培养技术要点.....	169

	体外培养肿瘤细胞生物学检测·····	175
	对肿瘤细胞株或细胞系的评价·····	175
18	各别器官组织细胞的培养·····	176
	上皮细胞培养·····	176
	表皮细胞培养·····	177
	乳腺组织培养·····	178
	内皮细胞培养·····	180
	肝细胞培养·····	182
	初代组织块培养·····	182
	消化法培养·····	182
	传代培养·····	182
	神经胶质细胞培养·····	183
	肌组织培养·····	184
	骨骼肌细胞培养·····	184
	心肌细胞培养·····	185
	巨噬细胞培养·····	185
	培养技术要点·····	185
	培养方法·····	187
19	组织培养的污染、检测和排除·····	189
	污染途径·····	189
	空气·····	189
	清洗消毒·····	190
	操作·····	190
	血清·····	190
	组织·····	190
	污染对细胞的影响·····	190
	霉菌污染·····	191
	细菌污染·····	191
	支原体污染和检测·····	191
	支原体种类·····	191
	支原体生物学特性和对细胞的影响·····	192
	支原体的检测·····	194
	微生物污染的排除·····	197
	抗生素·····	197

加温处理·····	197
动物体内接种·····	198
巨噬细胞吞噬法·····	198
第四部分 观察法和研究技术 ·····	200
20 细胞形态学和细胞化学观察法·····	200
细胞和固定·····	200
细胞培养·····	200
常用固定液·····	200
一般染色法·····	201
苏木精-伊红染色·····	201
Giemsa染色法·····	202
May-Grünwald-Giemsa 染色·····	203
火棉胶揭膜法·····	203
细胞化学法·····	204
Fuelgen反应显示DNA 方法·····	204
甲绿-派郎宁显示DNA和RNA·····	206
吖啶橙荧光染色法显示DNA和RNA·····	207
2,2-二羟基-6,6-二萘基二硫化物 (DDD) 法	
显示硫氢基·····	208
过碘酸Schiff反应显示糖原和其它多糖·····	209
苏丹黑B显示脂类(McManus改良法)·····	210
碱性磷酸酶的显示·····	211
酸性磷酸酶的显示·····	213
三磷酸腺苷酶显示法·····	214
葡萄糖-6-磷酸酶显示法·····	216
细胞色素氧化酶·····	217
琥珀酸脱氢酶显示法(简称SDH)·····	218
乳酸脱氢酶(LDH)·····	219
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶·····	219
电子显微镜观察法·····	220
原理·····	220
原位包埋法·····	221
脱钙卵壳膜包埋法·····	223
聚苯乙烯盖片培养·····	225

	离心分离包埋法·····	225
21	活细胞观察法·····	226
	培养瓶细胞直接摄影·····	226
	活细胞相差显微摄影·····	227
	缩时显微摄影术·····	229
	显微摄影装置·····	230
	暗室设施·····	230
	拍摄用培养细胞的准备·····	230
	缩时间隔确定·····	232
	拍摄程序·····	233
22	细胞遗传学方法·····	234
	性染色质检查法·····	234
	原理·····	234
	碳酸复红显示法·····	235
	硫堇染色法·····	235
	Y·染色质显示法·····	236
	染色体显示法·····	236
	原理·····	236
	常用显示染色体方法·····	234
	染色体显带·····	242
	显Q带法·····	244
	胰酶-Giemsa显G带法·····	244
	显G带法之二·····	245
	姐妹染色单体分化染色·····	245
	染色体脆性位点检测·····	248
	微核试验·····	248
	原理·····	248
	微核试验用细胞·····	248
	微核试验方法·····	249
	微核的标准·····	249
23	细胞融合法·····	250
	原理·····	250
	方法·····	251
	仙台病毒诱导细胞融合法·····	251

	聚乙二醇 (PEG) 诱导细胞融合法	252
	杂种细胞的选择	253
	细胞行为特性的选择	256
	染色体的分离	256
24	非程序DNA 合成	257
	原理	257
	UDS 用细胞	258
	UDS 的测定	258
	放射自显影法	258
	液闪计数法	259
	影响UDS 因素	259
	本底	259
	药物特性	259
	细胞	259
25	细胞脱核法	260
	原理	260
	脱核程序	262
26	同位素标记自显影术	263
	原理	263
	技术方法(脉冲式标记)	265
27	细胞同步化法	266
	细胞分裂相脱离法	267
	秋水仙素阻抑法	268
	离心分离同型细胞法	268
	胸腺嘧啶核苷双阻断法	269
28	细胞分离技术	269
	梯度沉降法	270
	原理	270
	方法	271
	束流荧光分离细胞法	274
第五部分 组织培养技术的应用		276
29	体外培养细胞的转化	276
	基本概念和原理	276

细胞转化与恶变·····	276
细胞自发转化·····	276
人工诱发细胞恶性转化·····	277
细胞转化基本过程·····	277
诱发·····	277
DNA 的损伤与修复·····	277
发展和表现·····	278
转化实验方法·····	278
细胞·····	278
人工诱发转化实验程序·····	280
转化细胞的检测·····	283
30 细胞培养在癌基因研究中的应用·····	284
基本原理·····	285
关于癌基因·····	285
技术方法·····	285
总DNA 的提取·····	285
转染·····	287
共转染·····	289
受体细胞的选择·····	290
31 组织培养药物测试·····	291
细胞选择·····	291
药物剂量·····	292
测试程序·····	293
观测指标·····	294
32 在杂交瘤技术中的应用·····	295
原理·····	296
杂交瘤细胞的制备·····	298
克隆化培养·····	303
抗体的检测·····	305
单克隆抗体的大量制备·····	307
第六部分 附录·····	308
缩写名词·····	308
常用名词译名和释义·····	310

国内已建人和动物的一些主要细胞系(或株).....	313
国际常用细胞系(或株).....	317
常用人工合成培养基.....	319
常用液体配制技术和参考资料.....	320
实验常用度量衡.....	323
酒精稀释表.....	324
缓冲液.....	325
离心速度和离心力换算表.....	326
参考资料.....	326

第一部分 绪论和基本理论知识

1 绪 论

组织培养基本概念

组织培养 (tissue culture) 一词在当前国内外书中的含意常不甚一致。就其本意来讲，它指的是从体内取出组织，模拟体内生理环境，在无菌、适当温度和一定营养条件下，使之生存和生长，并维持其结构和功能的方法。习惯上，人们又常用做泛指所有体外培养的统一称。实际用广义的体外培养概念来包括所有结构层次的培养更为恰当，即：器官培养、组织培养和细胞培养 (图1-1)。

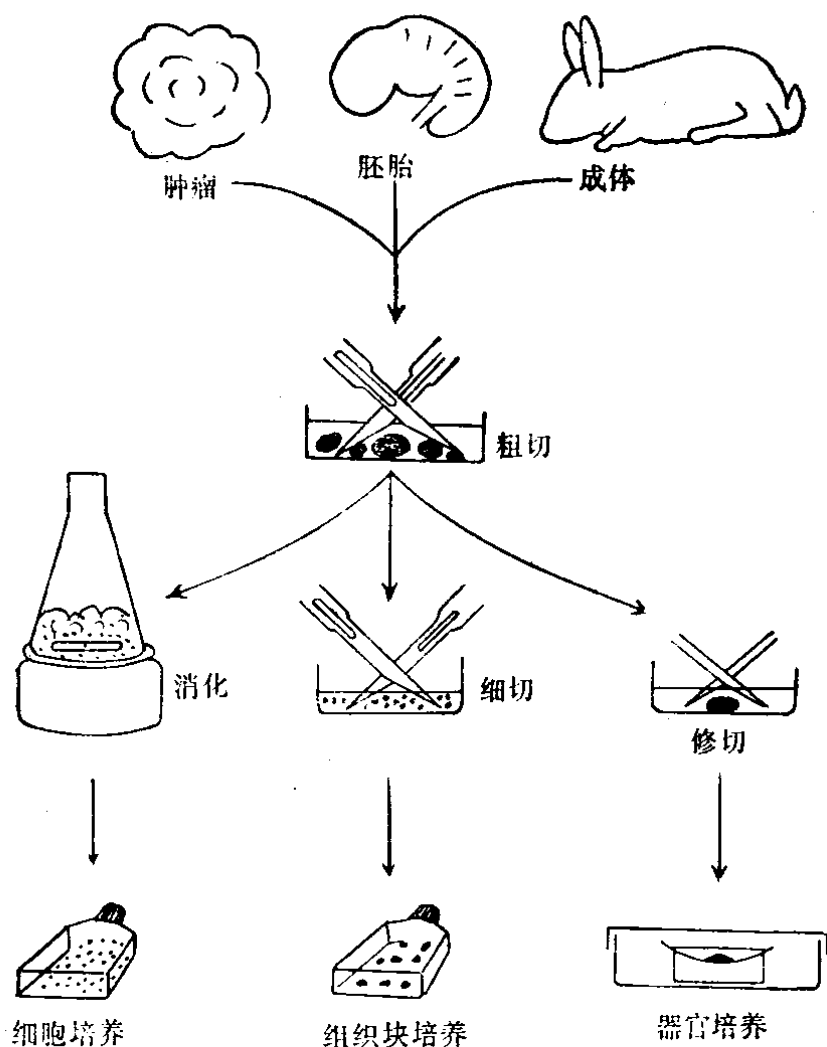


图1-1 体外培养种类

体外培养 { 器官培养
组织培养
细胞培养

所谓器官培养是指用和组织培养相似的条件，培养器官的原基、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。细胞培养是用类似条件在体外培养单个细胞或单一型细胞群，使之在体外生存、生长和繁殖的方法。这里需要说明的是，当我们做组织培养时，不论用什么方法和条件，组织培养中的主要成份仍然是细胞；细胞在生长过程中总有移动(运动)和其它的变动，这样就使得被培养的组织难以长期维持其原有的结构和功能。培养时间越长，发生变动的可能性越大，结果常使单一类型的细胞易保存下来，最终也成了细胞培养。另外，所谓细胞培养，并不意味着细胞彼此是独立的。细胞在培养中的生命活动，和体内细胞一样，仍然是相互依存的，呈现一定组织的特性。所以组织培养和细胞培养并无严格区别，故在本书以后的叙述中，这两词将做为同意语用。

对组织培养的评价

组织培养不仅是一种技术，也是一门科学；被培养的组织或细胞是非常好的实验对象，在现代医学和生物科学研究中广泛应用组织培养，这与其有一系列优点是分不开的：

1. 能长时间直接观察活细胞的形态结构和生命活动。可用以进行细胞学、遗传学、免疫学、实验医学和肿瘤学等的研究工作。
2. 可供研究的细胞种类极其广泛，从低等动物到高等动物以至人类；从胚胎到成体；从正常组织到肿瘤组织，皆可用于培养。
3. 便于使用各种不同的技术方法，如相差显微镜、荧光显微镜、电子显微镜、同位素标记、组织化学等观察和研究细胞。
4. 易于施用物理、化学和生物因素等实验条件。
5. 可同时提供大量生物性状相似的实验对象，耗资少，比较经济。
6. 便于使用摄影、电影和电视等各种方法进行记录。

组织培养也有不足之处,主要是:组织和细胞离体以后,独立生存在培养环境中,即使当前模拟体内技术发展很快,但与真正的体内条件相比,仍存在着一定的差异。因此在利用培养细胞做研究对象时,不要与体内细胞等同起来,切勿对实验结果做出轻易判断。

组织培养还在不断进展中,很多培养技术日臻完善,特别是随着遗传工程、分子生物学等的出现,体内外细胞间的差异和分化调控等问题将逐渐获得解决。关于细胞的差异和分化问题,将在组织培养细胞生物学节进一步讨论。

组织培养发展简史

一切事物都有一个由简单到复杂的发展过程。人们对组织和细胞的研究也曾经历了近四个世纪,其中组织培养的发展也经过了近百年时间。回顾这一技术的发展过程,有助于对它更好的理解,并使我们从中得到启示,以推动它向更高水平发展。组织培养大致经历了以下三个阶段:

早期组织培养 据文献记载,最早是德人Roux (1885)曾用温生理盐水培育鸡胚组织活了数月之久,被认为是组织培养的萌芽试验。1903年Jolly用盖片悬滴培养法培养蝶蛭白细胞活了近一个月。1906年Beebe和Ewing用同样方法,以动物血清做培养基,培养狗淋巴瘤细胞,存活了72小时,并曾见到细胞生长现象。上述实验说明,组织或细胞离体以后,在人工培养条件下仍能生存。这些初期的培养方法,今天看来虽十分简陋,但却为以后组织培养的建立和发展提供了依据。

组织培养的建立 一般认为,组织培养是从Harrison和Carrel(1907, 1910)两人开始的。Harrison参考前人经验,创建了盖片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法。此法的基本技术是:在无菌条件下,采用淋巴液做培养基,培养蛙胚神经组织生活了数周,并曾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和细胞的基本模式系统。

要维持细胞在体外长期生存和生长,还必须克服污染和解决