

鄂征 主编

组织培养技术

4.6-33

组织培养技术

组织培养技术

鄂 征 编

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

四川新华印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 7 $\frac{1}{2}$ 印张 158千字

1982年3月第1版第1次印刷

印数：1—6,800

统一书号：14048·4156 定价：0.78元

前 言

组织培养技术自 Harrison 创建近 80 年来，已发展为一门技术科学，在医学和生物学各领域，应用极为广泛。近几年来，我国组织培养也获得迅速发展。目前，许多从事组织培养的工作者，特别是青年初学者，迫切需要一些组织培养参考书。我们结合自己的工作，试承担了这一任务。

当前，国内外有关组织培养技术的报导很多。组织培养不仅有着丰富的技术内容，也包括很多理论知识，写出一本具有广泛参考价值、内容新颖的组织培养参考书，确非少数人所能胜任。本书主要介绍组织培养的常用基本技术方法，包括一些新近发展的细胞学技术，也适当涉及一些有关的理论知识，以供读者参考。

由于时间仓促，未能广泛征求有关专家的意见，加上水平所限，错误和缺点一定很多，希望读者批评指出。

在编写过程中，承蒙田竞生同志提供部分资料；中医研究院中心实验室绘图室协助完成大部分插图；胡庆和、刘平同志和北京市肿瘤研究所细胞遗传室其它同志承担抄写和复制照片等工作，在此一并致谢。

编者

1981. 7

目 录

第一章 绪论	1
一、简史.....	2
二、组织培养工作方法.....	5
第二章 体外培养细胞	7
一、细胞类型.....	7
(一) 贴附型.....	7
1. 成纤维细胞型.....	8
2. 上皮细胞型.....	8
3. 游走细胞型.....	9
4. 多形性细胞型.....	9
(二) 悬浮型.....	9
二、细胞形态结构.....	9
三、细胞周期.....	13
(一) 细胞周期和细胞分裂指数.....	14
(二) 细胞周期和DNA合成.....	16
(三) 有丝分裂.....	18
1. 前期.....	18
2. 中期.....	19
3. 后期.....	20
4. 末期.....	20
四、细胞遗传学特征.....	20
(一) 染色体.....	20
(二) 细胞性别.....	22

五、细胞生存条件和代谢·····	23
(一) 生存条件·····	24
(二) 细胞代谢·····	25
六、细胞死亡·····	31
第三章 设备和装置·····	32
一、实验室·····	32
(一) 准备室·····	33
(二) 无菌室·····	34
1. 无菌操作室·····	34
2. 洁净工作台·····	35
3. 无菌操作箱·····	35
(三) 研究室·····	35
二、常备装置·····	36
(一) 电热恒温培养箱·····	36
(二) 电热干燥箱·····	37
(三) 高压蒸汽消毒器·····	37
(四) 冰箱·····	37
(五) 离心机·····	37
(六) 真空泵·····	37
(七) 蒸馏器·····	37
(八) 滤器·····	39
(九) 洗涤器·····	39
(十) CO ₂ 恒温培养箱·····	39
(十一) 旋转培养装置·····	40
(十二) 液氮容器·····	40
(十三) 显微镜·····	40
(十四) 天平·····	41

(十五) 其它·····	41
三、器械和器皿·····	41
(一) 器械·····	41
(二) 玻璃器皿·····	41
1. 玻璃瓶·····	41
2. 培养瓶·····	41
3. 卡氏瓶·····	43
4. 培养管·····	43
5. 培养皿·····	43
6. 三角瓶·····	43
7. 吸管·····	43
8. 抽滤瓶·····	43
9. 消毒筒·····	44
10. 匀浆器·····	44
(三) 其它杂品·····	44
1. 酒精灯·····	44
2. 煮沸锅·····	44
3. 铝饭盒·····	44
4. 胶塞·····	44
5. 胶帽·····	45
6. 金属架·····	45
第四章 清洗与消毒·····	46
一、清洗·····	46
(一) 玻璃器皿的清洗·····	46
1. 清洗要领·····	46
2. 清洗步骤·····	48
(二) 塑料器皿的清洗·····	48

(三) 滤器的清洗·····	48
1. 玻璃滤器·····	49
2. 蔡司滤器·····	49
(四) 胶塞的清洗·····	49
(五) 金属器械的清洗·····	49
二、消毒·····	49
(一) 紫外线·····	50
(二) 干热消毒·····	50
(三) 湿热消毒·····	50
(四) 滤过消毒·····	51
(五) 消毒剂·····	51
(六) 煮沸消毒·····	51
(七) 包装·····	51
第五章 培养用液·····	53
一、水和平衡盐溶液·····	54
(一) 水·····	54
(二) 平衡盐溶液·····	54
1. 主要成分·····	54
2. BSS 配制方法·····	55
3. 注意事项·····	56
二、天然培养基·····	57
(一) 血浆的制备·····	57
(二) 鼠尾胶原的制备·····	58
(三) 鸡胚浸出液的制备·····	60
(四) 血清的制备·····	62
(五) 血清代用品·····	64
三、合成培养液·····	65

(一) 合成培养液种类·····	65
(二) 合成培养液的主要成分·····	77
1. 氨基酸·····	77
2. 维生素·····	78
3. 碳水化合物·····	78
4. 无机盐·····	78
5. 其它成分·····	78
(三) 合成培养液的配制·····	78
1. 199 培养液·····	79
2. Eagle 培养液·····	84
3. RPMI 1640 培养液·····	85
4. 粉剂型培养基·····	87
四、其它常用液·····	87
(一) 消化液·····	87
1. 胰蛋白酶溶液·····	87
2. EDTA 溶液·····	88
(二) pH 调整液·····	89
1. NaHCO ₃ 溶液·····	89
2. HEPES 的使用·····	89
(三) 抗菌素液·····	89
1. 青、链霉素(双抗)·····	89
2. 卡那霉素·····	90
3. 制霉菌素·····	90
(四) 细菌培养基·····	90
1. 肉浸液琼脂·····	90
2. 血液琼脂·····	91
3. 支原体培养基·····	91

(五) 肝素抗凝剂·····	92
第六章 细胞和组织培养技术方法 ·····	93
一、培养分类·····	93
二、要领和操作要求·····	94
(一) 无菌操作·····	94
(二) 取材·····	96
1. 鸡胚组织·····	97
2. 鼠肾或鼠胚组织·····	97
3. 外科手术取材·····	98
4. 取皮肤·····	98
5. 取血·····	99
6. 取骨髓、羊水和胸腹水·····	99
(三) 组织分离·····	99
1. 离心分离·····	99
2. 切割分离·····	99
3. 消化分离·····	100
4. 计数分装法·····	102
(四) 预防污染·····	104
三、常用培养法·····	104
(一) 血浆加胎汁培养·····	104
1. 悬滴培养法·····	105
2. 卡氏瓶培养法·····	107
(二) 合成培养基培养·····	108
1. 单层细胞培养法·····	109
2. 组织块培养法·····	112
3. 血液培养法·····	114
4. 旋转管培养法·····	115

5. 悬液细胞培养法·····	116
(三) 肿瘤细胞培养·····	117
1. 肿瘤细胞培养法·····	119
2. 肿瘤细胞的生物学特性·····	121
四、特殊培养法·····	122
(一) 支持物培养法·····	122
(二) 单细胞分离培养法·····	123
1. 毛细管分离法·····	124
2. 集落形成分离法·····	126
3. 琼脂分离法·····	127
4. 盖片分离法·····	127
5. 多孔塑料板分离法·····	127
(三) 灌流小室培养法·····	128
1. 设计要求·····	128
2. 常用灌流小室·····	128
五、细胞常规检查·····	130
六、细胞生物学检查和鉴定·····	134
(一) 解剖学方面·····	134
(二) 细胞生物学方面·····	135
第七章 细胞形态学和细胞化学观察法 ·····	140
一、细胞和固定·····	140
(一) 细胞培养·····	140
(二) 常用固定液·····	140
1. 中性缓冲福尔马林·····	140
2. Bouin 氏固定液·····	141
3. FAA 固定液·····	141
4. Carnoy 固定液·····	141

二、一般染色法·····	141
(一) 苏木精-伊红 (H. E.) 染色·····	141
(二) Giemsa 染色·····	142
(三) May-Grünwald-Giemsa 染色·····	143
(四) 火棉胶揭膜法·····	144
三、细胞化学法·····	145
(一) 孚尔根反应显示DNA方法·····	145
1. 原理·····	145
2. 方法·····	146
3. 结果·····	147
(二) 甲绿-派郎宁显示DNA和RNA·····	147
1. 原理·····	147
2. 方法·····	147
3. 结果·····	149
(三) 吖啶橙荧光染色法显示DNA和RNA·····	149
1. 原理·····	149
2. 方法·····	149
3. 结果·····	150
(四) 2,2'-二羟基-6,6'-二萘基二硫化物(DDD) 法显示巯氢基·····	150
1. 原理·····	150
2. 方法·····	150
3. 结果·····	151
(五) 多糖类的显示·····	151
1. 原理·····	151
2. 方法·····	152
3. 结果·····	153

(六) 苏丹黑 B 显示脂类·····	153
1. 原理·····	153
2. 方法·····	153
3. 结果·····	154
(七) 碱性磷酸酶的显示·····	154
1. 原理·····	154
2. 方法·····	155
3. 结果·····	156
(八) 酸性磷酸酶的显示·····	156
1. 原理·····	156
2. 方法·····	156
3. 结果·····	157
(九) 三磷酸腺苷酶 (ATPase) 显示法 ·····	157
1. 原理·····	157
2. 酸性 ATP 酶显示法·····	157
3. 中性 ATP 酶显示法·····	158
4. 碱性 ATP 酶显示法·····	159
四、活细胞观察法·····	160
(一) 活细胞显微摄影·····	160
1. 培养瓶细胞直接摄影·····	160
2. 活细胞相差显微摄影·····	162
(二) 显微摄电影术·····	164
1. 显微摄电影装置·····	165
2. 暗室设施·····	165
3. 拍摄用培养细胞准备·····	166
(三) 缩时间隔时间·····	167
五、电子显微镜观察法·····	169

(一) 原理·····	169
(二) 技术方法·····	169
1. 原位包埋法·····	170
2. 脱钙卵壳膜包埋法·····	171
3. 离心分离包埋法·····	174
第八章 细胞生物学方法·····	175
一、性染色质检查法·····	175
(一) 原理·····	175
(二) 显示方法·····	175
1. X 染色质显示法·····	175
2. Y 染色质显示法·····	176
二、染色体显示法·····	177
(一) 原理·····	177
1. 刺激细胞增殖和获取中期分裂相·····	177
2. 低张处理·····	178
3. 固定·····	178
(二) 常用显示染色体方法·····	178
1. 传代细胞培养·····	178
2. 微量周围全血白细胞培养法·····	180
3. 羊水细胞培养·····	182
4. 皮肤培养·····	183
(三) 染色体显带·····	184
1. 原理和要领·····	184
2. 显 Q 带法·····	186
3. 胰酶-Giemsa 显 G 带法·····	186
4. 显 G 带法之二·····	187
(四) 姐妹染色单体分化染色·····	188

1. 原理	188
2. 方法	188
3. 注意事项	191
三、细胞融合法	191
(一) 原理	191
(二) 方法	192
1. 仙台病毒诱导细胞融合法	192
2. 聚乙二醇诱导细胞融合法	194
(三) 杂种细胞的选择	195
1. HAT 系统	197
2. 亚硝基羟基丙氨酸-腺嘌呤系统及其它	199
3. 细胞行为特性的选择	199
(四) 染色体的分离	199
四、细胞脱核法	201
(一) 原理	201
1. 松胞菌素 B	201
2. 培养细胞用玻璃片或塑料片	202
3. 垫圈	202
(二) 脱核程序	203
1. 细胞培养	203
2. 离心脱核	203
3. 分离	203
五、同位素标记自显影术	204
(一) 原理	204
1. 同位素标记物	204
2. 标记	204
3. 乳胶	205

(二) 技术方法(脉冲式标记).....	206
六、细胞同步化法.....	207
(一) 分裂细胞脱离法.....	208
(二) 秋水仙素阻抑法.....	209
1. 准备细胞.....	209
2. 阻抑分裂.....	209
3. 分离细胞.....	209
(三) 离心分离同型细胞法.....	209
1. 准备细胞.....	209
2. 悬浮细胞.....	209
3. 分离培养.....	210
(四) 胸腺嘧啶核苷双阻断法.....	210
1. TdR 处理.....	210
2. 离心.....	210
3. TdR 处理.....	210
4. 培养.....	210
附录.....	211
一、ATCC 登记的人组织来源的细胞株.....	211
二、ATCC 登记的哺乳动物组织来源的细胞株.....	213
三、国内已建立的人细胞株或细胞系.....	216
四、McIlvein (200 毫升) 缓冲液	217
五、Sørensen (100 毫升) 缓冲液.....	217
六、酒精稀释表.....	218
七、常用人工合成培养基.....	219
八、离心速度和离心力换算表.....	221
九、常用缩写名词.....	222
十、参考文献.....	223

第一章 绪 论

从机体中取出组织或细胞，模拟机体内生理条件在体外进行培养，使之生存和生长，称为组织培养。一般说的体外培养，是一个更为广义的概念，它包括器官培养、组织培养和细胞培养。器官培养，是用某些措施使器官的原基、器官的一部分或整个器官在体外存活、生长，并保持其原有结构和功能。组织培养时，从组织块生长出来的仍然是细胞；细胞在生长的同时也发生移动，致使培养中的组织难以长时间维持其原有结构，结果也成了细胞培养。因此组织培养和细胞培养实际上并无严格区别。本书的主要目的是扼要介绍有关组织和细胞培养的基本知识和常用方法。

组织培养的突出优点是：便于应用各种物理、化学和生物等外界因素探索和揭示细胞生命活动的规律；便于应用各种不同的技术方法研究和观察细胞结构和功能的变化；可长期研究和观察细胞遗传行为的改变；可同时提供大量生物性状相同的细胞作为研究对象，耗费少，比较经济。

上述优点是其它实验对象或方法不能与之相比的，也是组织培养法在生物学和医学研究中得到广泛应用的原因。

组织培养作为一种实验对象或方法，也有其局限性，主要是：组织和细胞离体以后，独立生存在培养环境中，其细胞生物学性质必然会发生某些改变。因此在利用培养细胞做研究对象时，应力戒与体内细胞等同起来，或作出轻率的判断。

一、简 史

对细胞和组织的研究历时近四个世纪，组织培养的发展过程也经历了近百年时间。

据可查记载，最早是德国人 Roux (1885) 用温生理盐水培育鸡胚胎组织，活了数月之久，被认为是组织培养的萌芽实验。两年后，Arnold 把一小块木片置入青蛙腹腔，过一些时间取出木片放入温盐水中，发现白细胞从木片中游出来，生存了数小时。1898年 Ljunggren 的实验前进了一步，他把取自人体的皮肤小块先在腹水液中贮存多日，再移植到人体，结果活了很长时间。这就证明，细胞或组织离体以后仍能存活。1903年 Jolly 改用盖片悬滴法培养蝶螈白细胞活了近一个月。稍后，Beebe 和 Ewing (1906) 也用盖片悬滴法，采用动物血清做培养基，培养狗淋巴肉瘤存活了 72 小时，并见有生长现象。今天看来，这些早期培养都较简陋，但是却为以后组织培养方法的建立和发展提供了依据。

现代的组织培养应该说是从 Harrison 和 Carrel 两人开始的（图 1）。Harrison (1907) 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生长的过程，创立了在体外观察和研究活组织的方法。

要使细胞在体外长期生存，必须克服污染问题。美籍法国学者 Carrel 在实验中特别注意无菌操作，并发现了鸡胚胎汁有促进细胞生长作用。他改用血浆包埋组织加胎汁的培养法，创建了经典的悬滴培养法。Carrel 用这一方法曾维持一鸡胚心肌组织培养生存达 34 年之久。Carrel 的创造性工作揭示，离体的动物组织在培养条件下具有近于无限的生长和