

张卓然 主编

实用细胞培养技术

人民卫生出版社



1029/444

实用细胞培养技术

张卓然 主编

编者(以姓氏笔画为序)

王世仪(大连医科大学)

江 芳(大连医科大学)

张卓然(大连医科大学)

周正任(中国医科大学)

周慧敏(大连医科大学)

范晓磊(大连医科大学)

赵 越(大连医科大学)

赵玉坤(中国医科大学)

郑丛龙(大连医科大学)

黄 敏(大连医科大学)

ISBN 7-117-00000-1

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

实用细胞培养技术/张卓然主编. -北京: 人民卫生出版社, 1999

ISBN 7-117-03421-1

I. 实… II. 张… III. 细胞培养 IV. Q343

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 45795 号

实用细胞培养技术

张卓然 主编

人民卫生出版社出版发行
(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

北京人卫印刷厂印刷

新华书店经销

787 × 1092 16 开本 8.5 印张 188 千字
1999 年 10 月第 1 版 1999 年 10 月第 1 版第 1 次印刷
印数: 00 001—3 000

ISBN 7-117-03421-1/R · 3422 定价: 11.50 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

本书由

中共大连市委、大连市人民政府资助出版

The published book is sponsored
by the Dalian Municipal Government

摘 要

实用细胞培养技术是一本讲述从细胞培养实验室的设备、用具开始，到培养试剂及培养基的制备，原代细胞及传代细胞培养、传代、冻存、复苏等基本技术，以及用细胞培养技术进行生命科学研究和临床医学应用的工具书。全书共分 12 章，其特点为①所述培养技术为作者们多年来的经验总结，是成熟与可行的方法；②本书较详尽地介绍了各种细胞的制备与培养；③反映了研究与开发应用的最新进展，如肿瘤细胞与凋亡、端粒酶活性的关系与检测等。本书可供广大医务人员、医学生、研究生及医药院校的教师与研究人员的参考与应用。

大连市学术专著资助出版评审委员会

名誉主任 楼南泉 林纪方
主 任 司玉琢
副 主 任 高春武 吴厚福 何 杰
委 员 梁宗巨 王子臣 李寿山 王逢寿 汪榕培
夏德仁 罗均炎

医学专家评审组

组 长 裴德恺 (大连医科大学 硕导、教授)
副 组 长 刘业俭 (大连市中心医院 主任医师、教授)
成 员 仲来福 (大连医科大学 硕导、教授)
吴永安 (大连市友谊医院 教授)
苏成业 (大连医科大学 硕导、教授)
李淑华 (大连市儿童医院 主任医师)
闻立荣 (大连医科大学附属第二医院 硕导、教授)
赵兰儒 (大连市妇产医院 主任医师)
敖定椿 (大连医科大学附属第一医院 教授)

序

细胞培养技术是随着病毒学及移植外科的发展而建立起来的一种方法和技术，如今已成为生命科学研究与开发不可缺少的手段，尤其在医学领域中，对医学基础研究及临床医学应用等起着重要作用。由于机体细胞可以在体外环境下培养，便发现了一些新的研究范围。单细胞的培养及细胞克隆技术，将来源于一个细胞遗传特性均一的细胞群克隆出来，对研究细胞生物学基础并了解整个机体许多未知的问题提供了可能。在医学上，针对人体的许多研究受到各种制约与限制，由于利用了体外培养的细胞进行试验，则具有广泛的应用前景，如研究细胞转化，肿瘤的发生与逆转机制，肿瘤的诊断与防治等，对细胞分子生物学的理论与应用研究，也倍受人们的关注。另外，细胞培养也为移植外科提供了组织器官的一种来源。总之，组织细胞培养技术对生命科学与临床医学的研究与应用来说，不失为一种重要的手段。

《实用细胞培养技术》是作者们多年来实验室研究工作的经验与成绩，也是给研究生开组织培养课所使用的一本实验指导。近年来随着临床医学的进步，细胞培养技术也成为医师们迫切需要了解和掌握的方法。为满足教学与临床医学的需要，在原实验指导的基础上，我们增加了体外培养细胞的种类和许多新的实验方法，如细胞凋亡及端粒酶的检测等，决定正式出版。

本书得到大连市委、大连市人民政府的资助，促成了本书的出版，在此向大连市政府及学术专著资助出版评审委员会表示衷心的感谢。同时本书也得到大连医科大学各级领导的支持与帮助，在此一并表示谢意。书中的图是由大连医科大学教务处绘图室彭琦同志绘制，对其辛勤劳作表示谢意。由于本书作者的学术水平和编写能力有限，工作经验不足，难免出现文学和内容上的缺点和错误，恳请广大读者批评指正。

大连医科大学 张卓然

1999.2.16.

目 录

第一章 组织细胞培养的基本概念	1
第一节 组织培养的发展史	1
第二节 组织培养细胞生物学	2
第三节 建立细胞系(株)的要求	5
第四节 细胞培养的应用研究	6
第五节 细胞培养的常用术语及解释	8
第二章 细胞培养的准备工作的准备工作	11
第一节 实验室设计	11
第二节 建立细胞培养实验室的设备器材	11
第三节 实验器材的处理	12
第三章 培养用液	17
第一节 细胞培养对水的要求	17
第二节 平衡盐溶液	18
第三节 细胞培养常用试剂	20
第四节 常用培养液	23
第四章 基本技术	28
第一节 取材	28
第二节 细胞分散法	28
第三节 细胞分离法	29
第四节 细胞计数	30
第五节 细胞的分装、培养及传代	30
第六节 染色体标本制作	30
第七节 细胞的冻存、复苏与运输	33
第五章 组织培养污染的检测与排除	36
第一节 细菌与霉菌的污染	36
第二节 支原体污染和检测	36
第三节 潜伏病毒的污染与检查	38
第四节 微生物污染的排除	39
第六章 原代细胞培养	41
第一节 鸡胚成纤维细胞的制备	41
第二节 兔肾细胞的制备	42
第三节 人胚肾细胞的制备	42

第七章 二倍体细胞株的培养	44
第一节 人胚肺二倍体细胞的制备	44
第二节 人二倍体皮肤成纤维细胞的培养	46
第八章 传代细胞的培养	48
第一节 贴壁细胞的传代培养	48
第二节 悬浮细胞的传代培养	49
第九章 细胞克隆	51
第一节 细胞克隆的要点	51
第二节 克隆技术	51
第十章 人及动物各种器官组织的细胞培养	56
第一节 人表皮角化细胞的培养	56
第二节 气管上皮细胞的培养	57
第三节 乳腺上皮细胞的培养	59
第四节 鸡胚心脏块的培养	61
第五节 血管内皮细胞的培养	61
第六节 动脉平滑肌细胞培养法	63
第七节 肝细胞培养法	64
第八节 胰岛细胞培养法	66
第九节 神经细胞培养法	69
第十节 软骨细胞培养法	70
第十一节 骨髓细胞培养法	72
第十二节 蚊虫细胞的培养	73
第十一章 肿瘤细胞培养	75
第一节 肿瘤细胞培养的技术要点	75
第二节 体外培养肿瘤细胞的生物学检测	76
第三节 体外培养细胞的转化	78
第四节 肿瘤细胞与细胞凋亡	82
第五节 肿瘤细胞浸润与转移的检测	88
第六节 肿瘤细胞端粒酶活性检测	93
第七节 肿瘤细胞体外药物敏感性检测	96
第八节 肿瘤过继免疫治疗的效应细胞制备	99
第十二章 细胞培养技术的应用	102
第一节 细胞培养用于病毒学实验	102
第二节 细胞癌基因转染技术	108
第三节 毒性及遗传性检查法	110
第四节 杂交瘤技术——细胞融合与细胞克隆	114
第五节 细胞因子活性检测	117

第一章

组织细胞培养的基本概念

组织培养 (tissue culture) 习惯上泛指所有的体外培养, 即器官培养、组织培养和细胞培养的总称。其本意是指从活体取出的组织和细胞, 模拟体内生理环境, 在体外建立无菌、适温和一定营养的条件, 使之生存和生长, 并维持其结构与功能的方法称为组织培养。从其结构与功能的意义上讲, 器官培养是指培养某种器官的原基, 器官的全部或部分, 使之生存、生长和保持该器官的一定功能的方法; 而细胞培养是用类似的方法在体外培养单个细胞或单一型细胞群, 并呈现一定组织的特性, 所以组织培养与细胞培养并无严格区别。

组织培养是在试管内, 从器官、组织和细胞水平来研究生命现象的一种极好的实验手段, 组织培养所制备的细胞应具有纯一性, 由于物种、个体遗传背景, 器官种类和所处发育阶段等的不同, 给组织培养的研究应用带来很大困难, 为获取大量生物学性状相同的细胞, 必须进行细胞克隆; 另外凡制备的细胞必须具有活力, 在体外营养环境中能生长增殖, 而且细胞系统均会受到营养系统及环境系统的影响与制约。这些都是细胞培养技术所涉及的各种方法和措施的基本依据, 无菌技术则是组织培养成功的基础。

第一节 组织培养的发展史

人们对组织和细胞的研究经历了四个世纪, 其中组织培养是伴随着移植医学及病毒学的发展而开展起来的, 经过了以下三个阶段。

一、早期培养

1885年德国人 Roux 首先尝试了用温生理盐水培育鸡胚神经板组织数月, 而且首次采用了“Tissue culture”这个名词, 这是组织培养的萌芽试验。1898年 Ljunggren 将人体皮肤保存在腹水中几天至几周后再作移植手术获得成功。1903年 Jolly 用玻片悬滴法培养蝶螈白细胞存活近一个月, 1906年 Beebe 等用动物血清培养狗的传染性淋巴瘤细胞达 72 小时。这些工作为以后组织培养方法的建立和发展提供了依据。

二、组织培养的建立与发展

Harrison (1906) 和 Carrel (1910) 用淋巴液培养蛙胚神经组织数周, 从此标志着体外培养组织细胞的基本模式的建立。Carrel 特别注意无菌术, 建立用血浆包埋组织块的培养法, 采用更新的培养基和传代措施, 将一鸡胚心肌组织培养长达 34 年, 这些创造性的工作揭示离体动物组织在合适条件下, 具有近于无限生长繁殖的能力, 同时证明了组织培养确系研究活组织和细胞的极好方法。

Carrel (1923) 又设计了卡氏培养瓶, 使人们有可能进一步研究细胞的营养问题。Maximow (1924) 又改良了 Harrison 的悬滴培养法, 采用双盖片法。Strengeway (1926) 设计了表玻璃培养法, 为研究动物器官在体外的发育与功能作出贡献。此后到 50 年代初期, Maitland、Enders 等人将组织培养用于病毒学检测, Earle 等建立了小鼠纤维母细胞 L 株, 并进行了克隆化。Evans 等建立了复制式细胞培养 (replicate cell culture)。而 Dulbecco 和 Moscona 等采用胰蛋白酶消化和液体培养基获得了单层细胞培养, 确定了细胞培养法, 这对组织培养的发展起了推动作用。Puck 等又成功地进行了细胞克隆培养法, Eagle 等相继在培养基的开发利用方面也有力地推动了组织培养的发展。

三、现代组织培养

在上述先驱者的努力下, 从 50 年代末组织培养技术进入繁盛阶段。1950 年, 在美国遇到大规模开发脊髓灰质炎疫苗的机会, 利用组织培养法, 并加以改良简化, 使研究培养更加普遍广泛。随后, 在诸如培养器皿、培养基的商品化、CO₂ 孵箱、超净台、滤器滤膜、培养用机器、检测仪器等技术的开发方面, 确系得到长足进展。我国应用组织培养进行微生物学研究的也比较早, 鲍鉴清 (1952)、唐仲玮 (1953)、陈瑞铭 (1954)、汤非凡 (1957) 等学者均获得成功。今天, 组织培养技术已成为日常的工作手段, 在生物学、医药学、农业、环境等方面, 以及与细胞学研究相关的领域内, 应用极广, 是一种利用价值极高的技术。如用理化因素诱变出具有遗传特点的细胞株, 用细胞融合技术制备单克隆抗体, 检测致癌物的各种培养技术等。组织培养已日益成为生物工程的生产手段。

第二节 组织培养细胞生物学

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。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。

一、体内外细胞的差异与分化

体内细胞通过不断的生长繁殖, 不仅数量增加, 而且形态与功能会发生由一般向特殊的分化过程, 最后会导致各种组织的形成与器官的发生。但在人工培养条件下的细胞, 尽管目前模拟体内环境的技术已很高, 但毕竟尚未洞悉人体一切生命活动的内在联系, 所以模拟的培养条件与体内的情况存有很大差异。细胞被置于体外培养环境, 失去了神经、激素等体液的调节和细胞间相互影响, 生长在缺乏动态平衡的相对稳定环境中, 经多次传代增殖, 久之则发生如下变化, 即分化现象逐渐减弱或不显, 形态与功能趋于单一化, 或传一定代数后衰老死亡, 或发生转化, 获不死性而成为能无限传代的连续细胞系或恶性细胞系。离体细胞置体外环境, 必有一个适应过程, 至此其形态与功能也随之改变, 如肌纤维的形态会细胞化, 腺细胞的分泌功能会逐渐丧失等。故细胞体外培养状态, 难以反映体内情况, 两者会出现较大差异。但事实上细胞离体后其遗传基因未变, 所表现出形态与功能的变化可能系基因表达的改变, 如导致很多基因关闭, 致使细胞分化停止或特殊功能丧失。当然在某些条件培养基作用下也会使细胞染色体发生变化, 尤其单细胞培养下易受培养环境的影响, 这种变化正好为研究该基因的表达和调控

提供了线索和条件。

事实上体外培养细胞的分化能力并非完全丧失，只是因为所处环境的改变，细胞分化的表现与在原体内不同。如正常细胞从接种到长满培养瓶皿底面，会出现接触抑制。当细胞达到一定密度后也不再增殖，称为密度抑制等。由此可看出培养细胞和体内组织一样，仍视为整体而相互作用与依存，调控着细胞的分化过程。但随环境改变，体内外细胞分化的具体表现常不同。如二倍体成纤维细胞于体外可传代 50 代左右，相当于 150~300 个细胞周期，呈现着生命发展分化过程。若取材于胚胎细胞，上述过程可明显，若取材于成体或老年个体，体外生存时间缩短，呈衰老分化过程。离体细胞培养若不能呈二倍体化，即使取材于胚胎细胞，原代细胞培养也只能传 2~3 代便呈老化而死亡；若能转化成传代细胞系，反而获得了不死性，能进行无限传代，以上均与体内的分化过程完全两样。

二、体外培养细胞的分型

根据离体细胞在瓶皿中生长时是否贴壁的性质，将其分为贴壁型与悬浮型两类。

(一) **贴壁型细胞** 培养细胞需贴附在支持物上生长，大多数细胞属此型，也称锚着依存性细胞 (anchorage-dependent cells)。细胞贴壁后，分化现象常变得不显著，易失去原有组织特征，形态上表现单一化。而且提供组织的原机体年龄越幼稚，这种现象就越明显，并能反映其胚层起源，如源于内、外胚层的细胞多呈上皮样细胞，源于中胚层的多呈成纤维细胞，由于细胞形态趋于单一化，因此在判定细胞类型时很难按体内细胞标准确定，仅大致分成如下几类，不能生搬硬套。

1. **上皮细胞型**：细胞呈扁平不规则多角形，中间有胞核，彼此紧密相连成单层膜。多见于消化道上皮、肝、胰和肺泡上皮等细胞。上皮细胞生长时，尤其是外胚层起源细胞常出现“拉网”(netting)现象，可能与某些细胞分泌透明质酸酶有关。

2. **成纤维细胞型**：胞体呈梭型或不规则三角形，胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起，起源于中胚层的细胞，如心肌、平滑肌、血管内皮细胞等常呈成纤维细胞型。

3. **游走细胞型**：细胞质常伸出伪足或突起呈活跃的游走或变形运动，贴附于支持物上散在生长，一般不连接成片。但其形状很不稳定，有时与上皮样细胞或成纤维细胞难以区别。另外像神经细胞有时呈多角形，并伸出较长的神经纤维。可认为是多形细胞型。

(二) **悬浮型细胞** 某些细胞呈悬浮状态生长，在瓶皿内不贴壁，其生存空间大，能繁殖大量细胞，容易进行传代培养，但在观察细胞病变时不如贴壁细胞。血液中的淋巴细胞、白细胞以及某些肿瘤细胞属于悬浮型细胞。

三、组织培养细胞的生长和增殖过程

在培养体系中，单个细胞表现有很大独立性。一个有活力的细胞须通过细胞周期进行倍增，繁殖成群体，群体细胞才是培养细胞的基本存在形式，而且在形态和机能上相互依存。当群体细胞在培养瓶皿中达到一定密度时需进行传代，在细胞一代中，即从细胞接种到分离再培养的一段时间，此间细胞能倍增 3~6 次。在传代培养中，视其不同细胞来源及性状，其生存期也不同。如原代细胞培养仅能传 1~3 次，相当于 6~15 个

细胞周期，历时 2~4 周。二倍体细胞能维持有限生存期，可传 30~50 代，相当于 150~300 个细胞周期，可历时 1 年左右。某些细胞经自发转化或诱发转化而获得了不死性 (immortality)，成为能进行无限传代培养的无限细胞系。

(一) **细胞周期** 是细胞的增殖过程。细胞经过一个间期来完成生成过程，主要是遗传物质 DNA 的复制合成，然后进入分裂期完成其增殖，这就叫一个细胞周期。细胞分裂期称 M 期，是细胞周期的终结期，主要完成细胞遗传物质的分配。M 期之后是细胞分裂后期，因子代细胞主要发生 DNA 合成前的有关生化变化，如 DAN 聚合酶及 mRNA 的合成等，称 DNA 合成前期 (G₁ 期)，细胞接种后的潜伏期细胞皆为 G₁ 期细胞。接着进入 DNA 合成期 (S 期)，此期可在显微镜下见到细胞核的某些变化，但最好用放射性同位素标记法证明。S 期 DNA 最易受损，易受致突变或致癌物作用。S 期之后为 G₂ 期，因在本次 M 期之前也称细胞分裂前期，此时 DNA 含量加倍，以及 RNA 的合成和染色质的螺旋化。综上，细胞周期包括间期和分裂期这个连续过程中的两个不同阶段，而间期是由 G₁ 期、S 期与 G₂ 期组成。表 1-1 示不同来源的细胞周期中各阶段持续时间。

表 1-1 不同细胞在各细胞周期阶段中的持续时间

细 胞	来 源	细胞周期阶段(h)				增倍时间
		G ₁	S	G ₂	M	
T-细胞	人	10.5	7.6	3.2	0.8	21.1
WI-38	人胚肺	8.0	8.0	4.0	0.8	20.8
HeLa	人宫颈癌	10.5	10.0	4.0	0.5	24.5
CHO	中国仓鼠	4.7	4.1	2.8	0.8	12.4
艾氏腹水癌	小 鼠	5.7	8.5	3.8	1.0	19.0

(二) **细胞培养一代的生长过程** 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培养瓶皿内生长。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 0.5~4h 左右。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，原代细胞约需 24~96h，肿瘤细胞或无限传代细胞仅需 6~24h。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，此期约持续 3~5 天后，细胞数量增多，贴壁细胞可相互接触连成片，正常细胞因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，代谢末产物蓄积，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，重则脱壁死亡。

(三) **培养细胞的生命期** 体内组织细胞的生存期应与完整机体衰老死亡相一致，

但离体细胞的培养，其生命期则有很大变化。培养细胞的生存过程一般要经历原代培养期，传代期和衰退期。从体内取出组织制备细胞接种培养瓶皿到第一次传代叫原代培养，因细胞刚刚离体，与体内原组织很相似，具异质性，相互依存性强，细胞克隆形成率低。此期一般持续 1~4 周。原代细胞一经传代后便称为细胞系。传代期在全生命期中持续时间最长，其特点是细胞增殖旺盛，并能维持二倍体核型。原代细胞一般只能传 1~3 代，如果呈二倍体核型并获得有限传代的细胞系称二倍体细胞系，一般可传 30~50 代，当传代接近生存期限时，细胞增殖缓慢以至完全停止，进入衰退期，最后死亡。这种主动结束自身生命的过程叫程序性细胞死亡，也称为凋亡 (Apoptosis)。在传代期培养时应注意两个问题，一是为保持二倍体细胞性质，细胞应在传代后早期冻存（不出 10 代内冻存）。二是少数细胞系在此期可能发生自发或诱发转化，获得不死性而成为无限细胞系，此时细胞核型多变成异倍体。

四、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），应用于人体的细胞制剂等均应检测细胞核型，利用组织培养细胞很易做细胞遗传学研究。

（一）染色质 (chromatin) 与染色体 (chromosomes) 真核生物的遗传物质主要存在于细胞核，称染色质。当细胞进行有丝分裂时，染色质首先要进行复制加倍，然后组装成一条条在光学显微镜下可辨认的染色体，最后随细胞分裂而极其准确地平均分配到两个子细胞中，形成两个新核，重新散开成为染色质。只有在散开的染色质状态下，遗传信息方能被转录，细胞方能生长和行使功能。由此可见，染色质和染色体是细胞中同一遗传物质的不同表现形式。间期细胞核中的染色质在进入细胞分裂时变成染色体。应用特殊药物如秋水仙素能阻抑细胞停止在细胞分裂中期，此时染色体呈标准形态，是研究染色体形态结构最好的阶段。人体体细胞具有二倍体核型，染色体数目为 46 (2n)。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。当细胞发生转化或肿瘤细胞，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，有时会见到异常的染色体，如双着丝点、环形染色体，长臂或短臂上部分缺失等。

（二）细胞性别 在 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。男性 Y 染色体在间期形成颗粒状 Y 小体，位于胞核近中央位。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 体和 Y 小体。

第三节 建立细胞系（株）的要求

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。一旦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。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 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. 融解后细胞生长特性。

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, 以证明细胞有否交叉污染。

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 ParkLawn Drive Rockville MD 20850. USA

2. IMR (Institute for Medical Research)

The Human Genetic Mutant Cell Repository, Institute for Medical Research Copewood 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, Centre for Applied microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, UK Telex: 47683 PHCAMR G

第四节 细胞培养的应用研究

细胞培养技术可从细胞水平上帮助人类揭开生、老、病、死的规律, 探索优生、抗衰老、防治疾病的手段或途径, 人为地诱导细胞遗传性状的改变, 使其向更有利于人类和自然界的方向发展。尤其随着细胞生物学和分子生物学的相互渗透, 分子克隆技术与细胞培养技术相结合, 在阐明基因的结构与功能, 基因在细胞生长和分化中的作用, 以

及细胞癌变机制等方面起了重要作用。因此，对活细胞的研究仍是当前生命科学的中心问题之一。

1. 细胞培养在病毒学中的应用：培养细胞为病毒的增殖提供了场所，细胞是分离病毒的最好和最方便的基质，体外培养细胞无抗体及非特异拮抗物质的影响，而且对病毒的敏感性较体内细胞为高，采用离心感染法或提取病毒核酸进行感染，并以细胞打孔器协助感染可扩大病毒感染的宿主范围；病毒感染指标容易观察，光学显微镜下就可见到 CPE、包涵体、细胞融合、血细胞吸附等现象，同时也便于用分子病毒学技术进行检测。利用细胞培养可准确进行病毒定性和定量的研究，测定 TCID₅₀并用于病毒感染及防治方面的研究。在制备减毒活疫苗和诊断用抗原时，也离不开细胞这一病毒增殖的场所，所以在一定程度上可以说，组织培养技术是伴随着病毒学的发展而发展起来。

2. 细胞生物学的基础研究：单个细胞克隆便于对细胞生物学的基础理论进行研究，如细胞形态、结构，细胞器及其功能，遗传物质、核型、变异、细胞转化、生长周期等，离体培养细胞便于进行环境因素、药物等单因素及多因素的影响作用，探索其作用机制等研究。

3. 淋巴细胞培养技术的应用：淋巴细胞在培养环境中含有某些生长因子的刺激下，出现旺盛的分裂增殖。淋巴细胞培养的成功对反映机体免疫功能状况起很大作用，如研究细胞标记，检测 T、B 细胞数量及功能，检测 T 细胞亚群的变化（CD3、CD8、CD4 等细胞），研究 T、B 细胞与细胞因子及体液因子的信息传递等，检测细胞因子产生能力（如 IL-2、TNF、IFN 等）、检测 CTL 细胞、NK 细胞等细胞毒作用，制备 LAK 细胞、TIL 细胞等用于临床肿瘤治疗等。

4. 细胞作为毒性实验及安全性实验的工具：很多化学物质、放射线等对机体的毒性实验及其产生不良影响的安全性调查等，不能用人体试验，用动物试验成本也很高，而细胞培养技术为其提供了最简易而又可靠的方法，并对研究毒性机制提供了良好的实验对象。

5. 细胞工程学研究手段已基本建立：利用细胞融合及杂交技术，进行细胞工程的研究与开发。如生物反应器的开发研究，将生物活性物质的基因导入动物受精卵，随后从动物组织、体液分泌物中获得外源基因的表达产物如获取人生长激素，先制备人生长激素的 mRNA，互补成 cDNA 后再合成 dsDNA，插入 SV₄₀病毒中感染猴肾细胞中，经大量扩增培养，以 10⁷/ml 细胞浓度计算，每日从培养液中可收获近 1mg 生长激素，而用化学提取法产生生长激素时，用羊脑为材料，从 50 万只羊脑中仅能提取 5mg，而且不是纯生长激素。

6. 遗传疾病的产前检查：用羊膜穿刺术获得的羊水中胎儿细胞进行培养，便可在妊娠早期，诊断胎儿是否患有先天性遗传病，少量胎儿脱落细胞是能分裂的，经 2~4 周生长，形成显著单层上皮样细胞，可按常规制备染色体。另可检测 AFP 等，可于产前检测出几十种代谢病与遗传病，较准确地指导优生优育。

7. 体外培养细胞的转化：利用一种获不死性的传代细胞 NIH3T3 细胞，培养时具有接触抑制，当用致转化剂或病毒（如人乳头状瘤病毒等）作用该细胞使其转化，转化 NIH3T3 细胞则可失去接触抑制，或接种裸鼠时可引发肿瘤，正常 NIH3T3 细胞培养时

仍呈单层细胞，接种裸鼠也不会诱发肿瘤。

8. 细胞培养药物测试：利用一种可观察与检测的指标来测试某药物作用体外培养细胞的变化，如某细胞生长因子对细胞的促分裂作用；某激素促体外培养胰岛细胞分泌胰岛素的作用；某药物杀伤细胞的细胞毒作用等。临床常做肿瘤细胞对抗癌药物的药敏测试，以指导临床抗癌药物的使用及配伍。

9. 在杂交瘤技术中的应用：利用骨髓瘤细胞系与产生多克隆抗体的 B 细胞进行融合，用单细胞克隆技术筛选出产生所需单克隆抗体的融合细胞，大量增殖培养，以生产单克隆抗体用于诊断，经改进也可用于导向治疗。

10. 细胞培养在现代生物技术中应用很广，如基因分离，基因测序与表达、基因转移与重组，癌基因研究等。在转基因动物的研究中也广泛应用，如将生长激素的基因导入小鼠受精卵中，获得生长快，个体大的转基因巨型小鼠。在培育优良品种时，研制抗病基因、抗病毒基因等转基因动、植物，展示良好前景。在器官移植寻找器官供体上，有人将人的基因转给猪受精卵，培育出带有人类基因的猪，用猪肾供病人进行肾移植，这种作法正在试验中，如成功将会给移植外科带来突破性进展。

第五节 细胞培养的常用术语及解释

体外培养 (in vitro)：原意为在试管中，现常与组织培养一词通用，译为体外培养。

组织培养 (tissue culture)：维持组织在体外生长，也泛指体外培养。

器官培养 (organ culture)：在体外维持器官、器官的部分或器官的原基生存和生长的方法。

* 细胞培养 (cell culture)：细胞 (包括单个细胞) 在体外条件下的生长称为细胞培养，在细胞培养中，细胞不再形成组织。

细胞融合 (cell fusion)：两个独立的细胞融合成一个细胞。可用聚乙二醇 (PEG) 或仙台病毒诱发。

* 细胞杂交 (cell hybridization)：两个或多个不同的细胞融合。导致一个含核体 (aynkaryon) 的形成。

体外培养转化 (in vitro transformation)：细胞在体外培养中发生与原细胞遗传性状不同的变化，但不一定具有致癌性。

单倍体 (haploid)：正常细胞染色体基本数 (每一染色体只有一种)。

整倍体 (euploid)：具有两个以上单倍体数目的细胞。

非整倍体 (aneuploid)：细胞核内染色体数为单倍染色体数的非整倍数时，称非整倍体。

二倍体 (diploid)：具有两套染色单体数目的细胞 (2n)

* 原代培养 (primary culture)：从体内取出细胞或组织的第一次培养。

再培养 (subculture)：同传代。

* 传代 (passage)：无论是否稀释，将细胞从一个培养瓶转移或移植到另一个培养瓶即称为传代或传代培养。也称再培养。

单层培养 (monolayer culture)：培养细胞在底物上长成单层。

悬浮培养 (suspension culture)：细胞在培养液中呈悬浮状态生长。