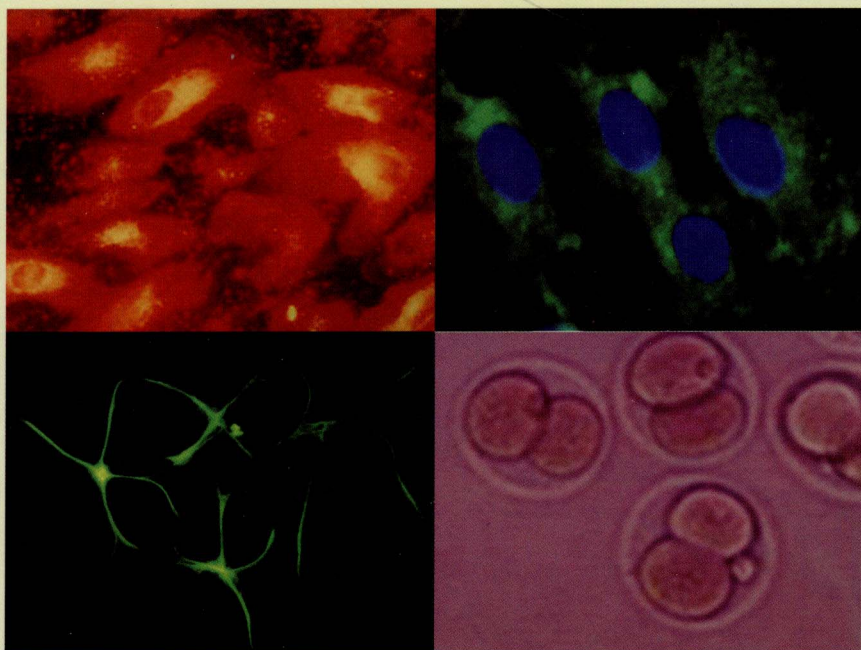


全国高等医药院校研究生教材

实用细胞培养技术

Practical Techniques of Cell Culture

主编 谭玉珍



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高等医药院校研究生教材

实用细胞培养技术

Practical Techniques of Cell Culture

主 编 谭玉珍
主 审 章静波(中国医学科学院 北京协和医学院)
编 者 (以姓氏笔画为序)
马文丽(南方医科大学)
王力民(北京大学临床肿瘤学院)
王海杰(复旦大学上海医学院)
白增亮(山东大学生命科学学院)
张志谦(北京大学临床肿瘤学院)
张钦宪(郑州大学基础医学院)
周广东(上海交通大学医学院)
周德山(首都医科大学)
徐存拴(河南师范大学生命科学学院)
韩 钦(中国医学科学院 北京协和医学院)
曾园山(中山大学医学院)
谭玉珍(复旦大学上海医学院)



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

本书共十二章,包括细胞培养的基本条件、基本原理和技术,上皮细胞、结缔组织细胞、肌细胞、神经组织细胞及其相应的组织干细胞的培养,骨髓间充质干细胞和胚胎干细胞的培养及其诱导分化,肿瘤细胞和肿瘤干细胞的培养,培养细胞的相关生物学和分子生物学检测技术,以及细胞培养技术的应用。从研究生掌握基本技术和实际应用出发,流程规范,文字简练,通俗易懂。

本书适用于医学、生命科学、药学、预防医学等专业研究生使用,也可供从事细胞培养实验的科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

实用细胞培养技术/谭玉珍主编. —北京:高等教育出版社,2010.11
ISBN 978-7-04-029971-7

I. ①实… II. ①谭… III. ①细胞培养-研究生-教材 IV. ①Q813.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第201056号

策划编辑 安琪 责任编辑 安琪 封面设计 张楠 责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 河市春园印刷有限公司

购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16
印 张 21.5
字 数 520 000
插 页 8

版 次 2010年11月第1版
印 次 2010年11月第1次印刷
价 47.20元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 29971-00

前 言

随着医学科学研究的迅速进展,细胞培养技术已成为细胞生物学和分子生物学等研究的重要技术和方法。利用体外细胞培养模型模拟在体实验,可以排除体内多种因素的干扰,对于明确各种细胞在正常或病理状态下的功能、基因和蛋白表达的变化及其机理具有重要意义。为了深入探讨细胞生物学现象和疾病的发生机制,寻找治疗某些疾病的有效措施,掌握不同细胞的培养方法及其相关实验技术是必不可少的。近年来,大多数研究生的课题研究涉及细胞分离和培养,他们对学习细胞培养技术的需求很迫切。细胞培养技术已成为研究生的主要课程之一。因此,我们在多年来开设研究生课程“实用细胞培养技术”的基础上,邀请全国 10 所高等医药院校有着丰富细胞培养技术经验的专家共同编写了这本教材《实用细胞培养技术》。本教材适用于医学、生命科学、药学、预防医学等各专业研究生使用,也可供从事细胞培养实验的科研工作者参考。

本教材主要针对研究生需要掌握的细胞培养技术,评价实验结果和解决实验中出现的的问题,重点叙述细胞培养操作步骤、结果分析和注意事项等,并介绍常用的细胞培养相关实验技术。本书共十二章,包括细胞培养的基本条件、细胞培养的基本原理和技术、上皮细胞的培养、结缔组织细胞的培养、肌细胞的培养、神经元和神经胶质细胞的培养、成体和胚胎干细胞的培养及其诱导分化、肿瘤细胞及肿瘤干细胞的培养、细胞系的建立、鉴定和应用、培养细胞的相关检测技术、常用细胞培养实验技术与应用。本书内容新颖,涵盖了目前先进的细胞培养技术和方法。全书内容充分体现可读性和实用性。方法介绍采用流程式叙述,文字简练,通俗易懂,可操作性强。主要方法后附参考文献,书末附英文缩写和中文索引。

在本教材编写和出版过程中,复旦大学研究生院、复旦大学上海医学院和高等教育出版社给予了大力支持。参加本教材编写的各位专家、教授付出了大量辛勤劳动,提出了许多宝贵的编写建议。章静波教授在繁忙工作中抽出时间为本教材作了全面而细致的审阅。在此,表示衷心的感谢。

由于水平所限,本书编写可能存在错误和不足之处,诚挚期待广大读者的批评和指正,以便在再版修订时改进和完善。

谭玉珍
2010 年 10 月

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

反盗版举报传真：(010) 82086060

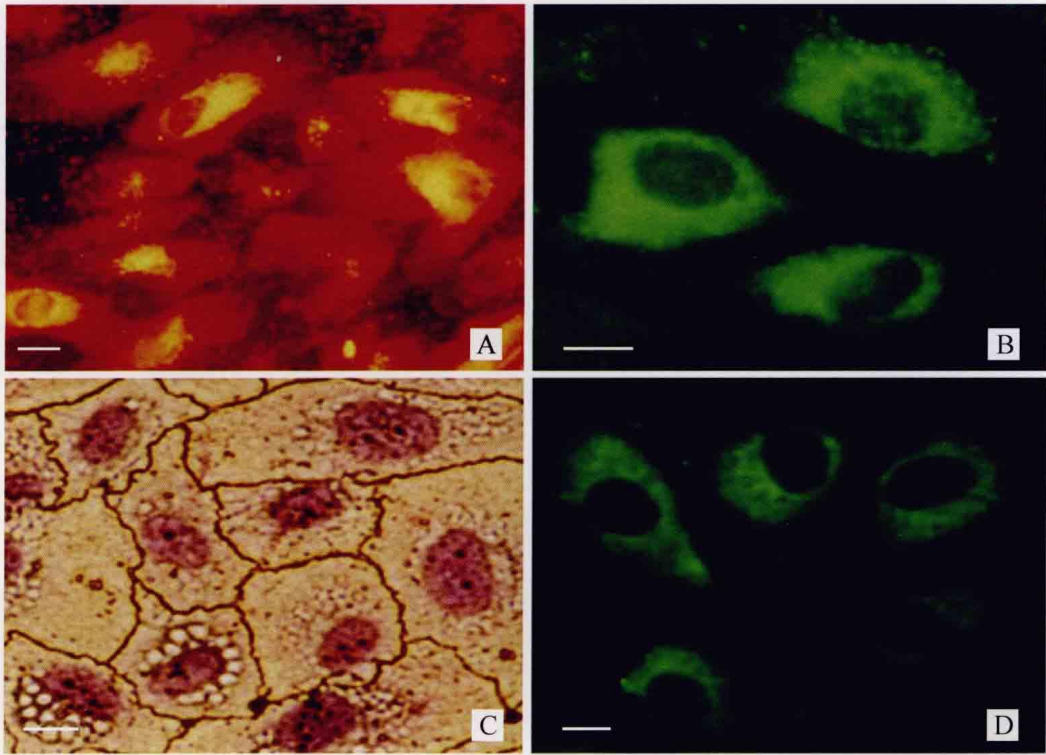
E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

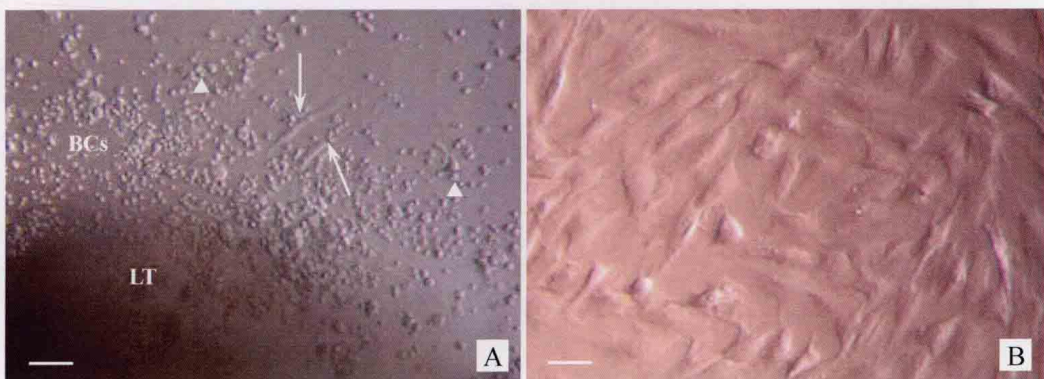
邮 编：100120

购书请拨打电话：(010)58581118



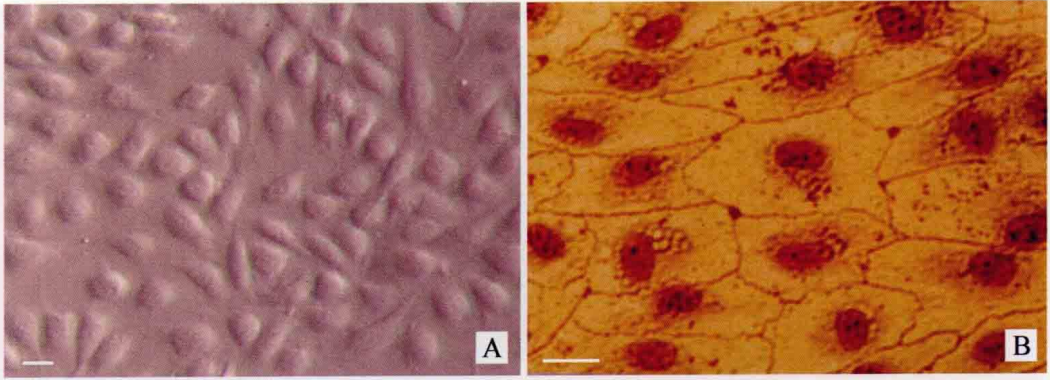
彩图3-2 血管内皮细胞的鉴定

A. 内皮细胞吞噬乙酰化低密度脂蛋白，胞质内呈现红色荧光颗粒；B. 内皮细胞表达第Ⅷ因子相关抗原，阳性颗粒主要分布于核周区；C. 硝酸银染色，可见硝酸银颗粒沉积于内皮细胞间隙中；D. 血管内皮细胞呈CD31表达阳性。标尺示10 μ m



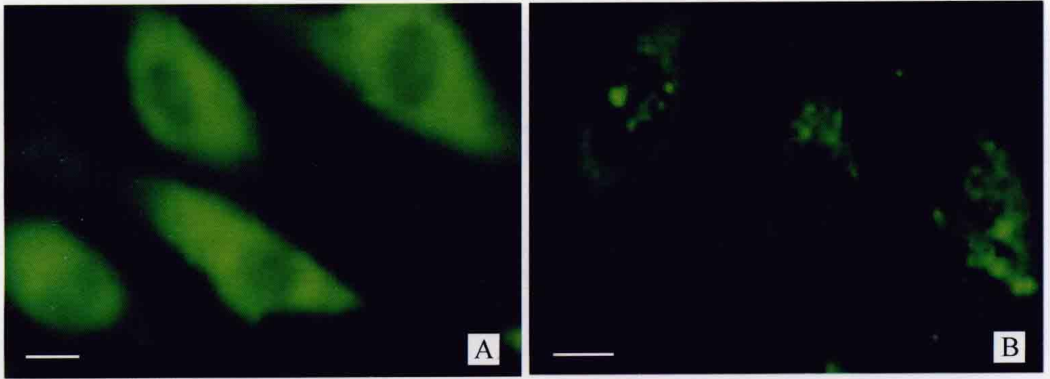
彩图3-3 肺微血管内皮细胞

A. 培养3 d，内皮细胞自组织块边缘迁出（ \uparrow ），（ \blacktriangle ）示迁出的巨噬细胞，LT为肺组织块，BCs为血细胞，标尺示100 μ m；
B. 培养2周，内皮细胞生长形成单层，呈卵石状排列，标尺示25 μ m



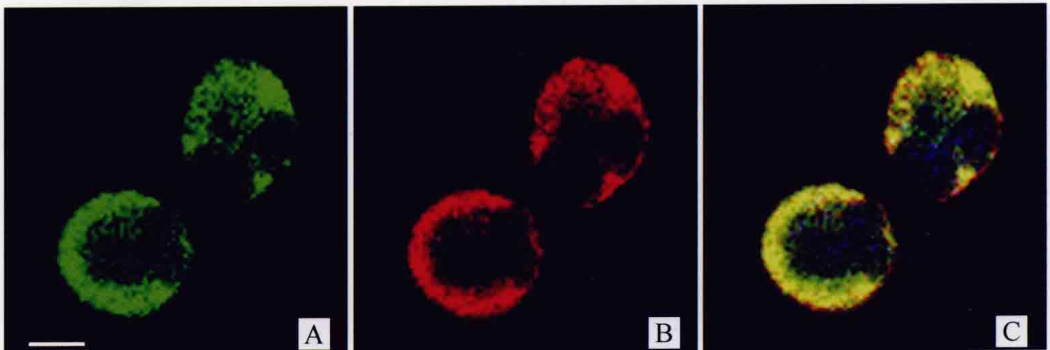
彩图3-5 胸导管内皮细胞

A. 胸导管内皮细胞单层呈典型的特征性卵石状排列, 标尺示20 μm ; B. 硝酸银染色后可见硝酸银颗粒沉积于细胞间隙中, 从而显示内皮细胞呈锯齿状的边缘, 标尺示10 μm



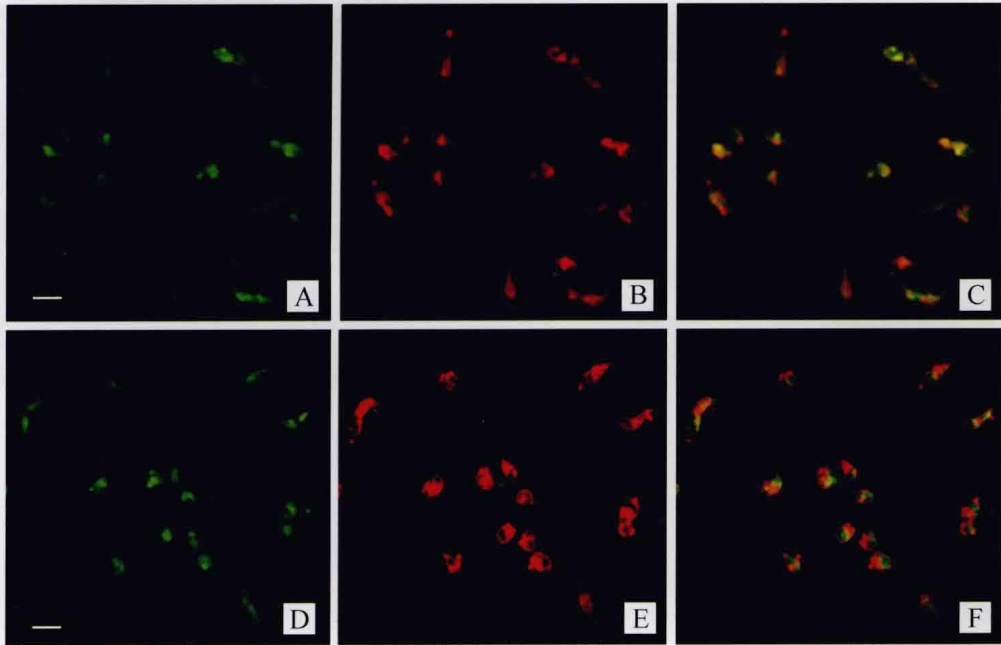
彩图3-6 胸导管内皮细胞UEA-1和LYVE-1的表达

A. 胸导管内皮细胞呈UEA-1免疫染色阳性; B. LYVE-1表达阳性。标尺示10 μm



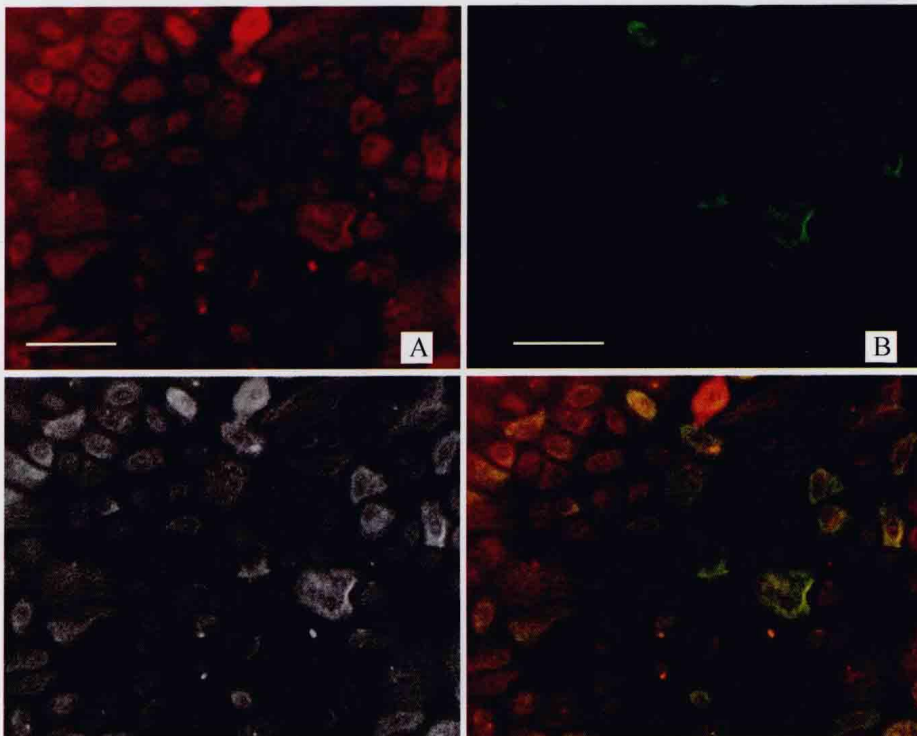
彩图3-9 血管内皮祖细胞CD133和VEGFR-2的表达

A. 血管内皮祖细胞CD133表达阳性 (绿色); B. VEGFR-2表达阳性 (红色); C. A和B重叠后的图像, DAPI复染细胞核。标尺示5 μm



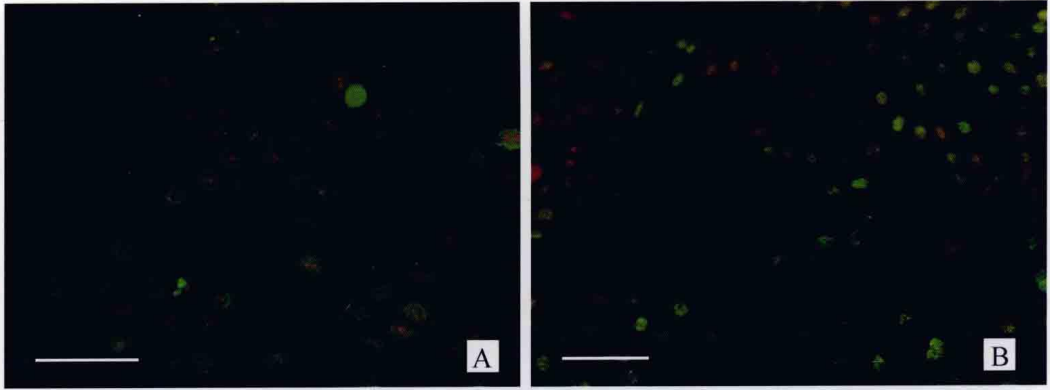
彩图3-10 淋巴管内皮祖细胞VEGFR-3、CD133和CD34的表达

A. 淋巴管内皮祖细胞CD133表达阳性（绿色）；B. VEGFR-3表达阳性（红色）；C. A和B重叠后的图像；D. 淋巴管内皮祖细胞CD34表达阳性（绿色）；E. VEGFR-3表达阳性（红色）；F. D和E重叠后的图像。标尺示10 μ m



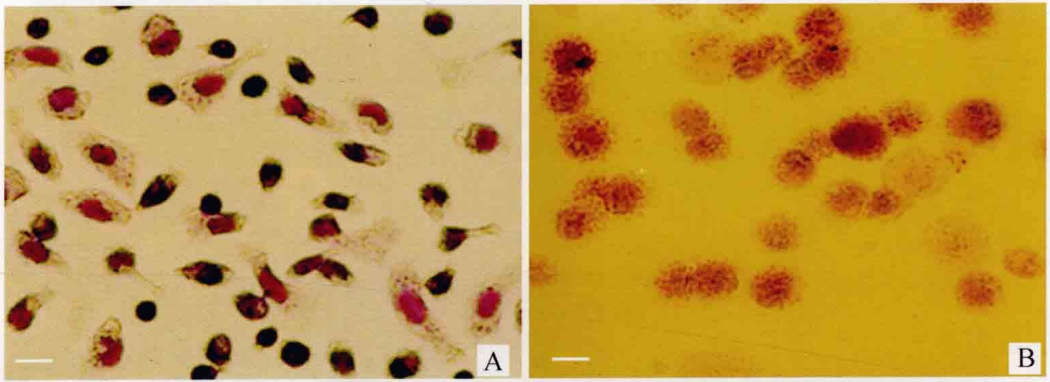
彩图3-13 整合素 β 1和CK-19在表皮角质形成细胞中的表达

A. 整合素 β 1免疫荧光染色，细胞呈阳性反应（红色）；B. CK-19免疫荧光染色，大部分细胞呈阳性反应（绿色）；
C. 未使用激发光时的图像；D. A和B重叠后的图像。标尺示100 μ m



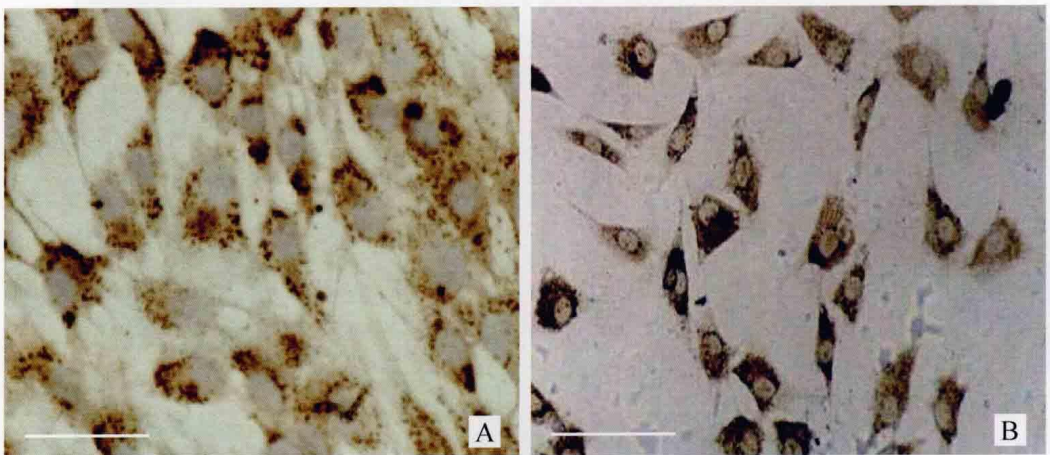
彩图3-15 表皮干细胞的免疫荧光染色

A. 表皮干细胞表达CK-19; B. 大部分细胞呈p63表达阳性。PI染色显示细胞核(红色)。标尺示100 μm



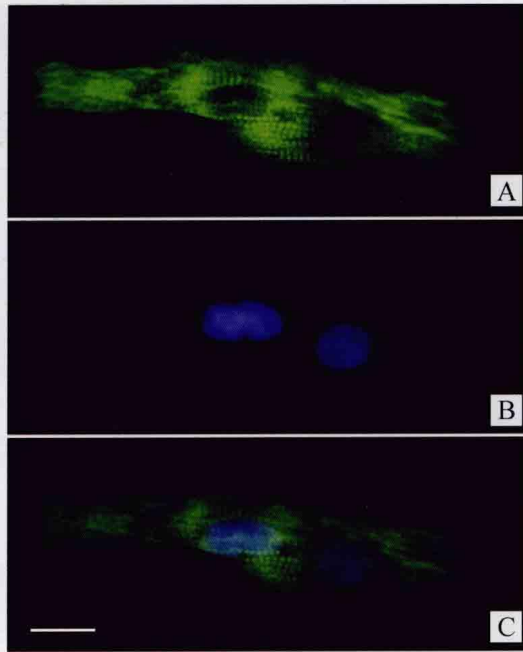
彩图4-3 巨噬细胞的鉴定

A. Giemsa染色, 培养1 d, 巨噬细胞伸出伪足; B. 巨噬细胞非特异性脂酶染色阳性。标尺示10 μm



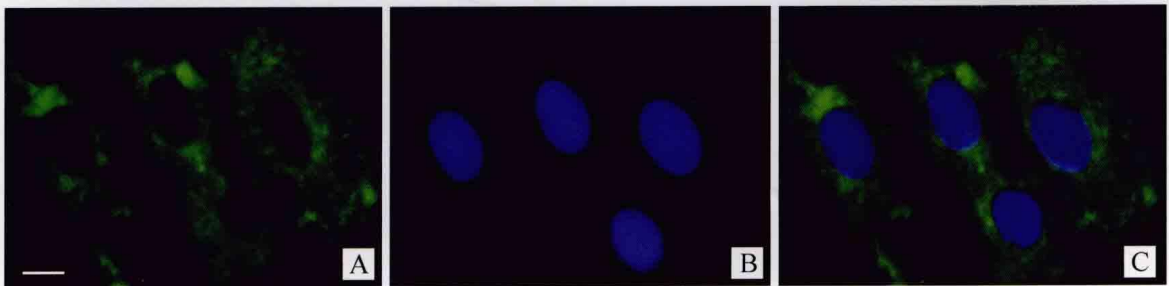
彩图4-5 软骨细胞的II型胶原蛋白免疫细胞化学染色

A. 关节透明软骨细胞; B. 半月板纤维软骨细胞。标尺示100 μm



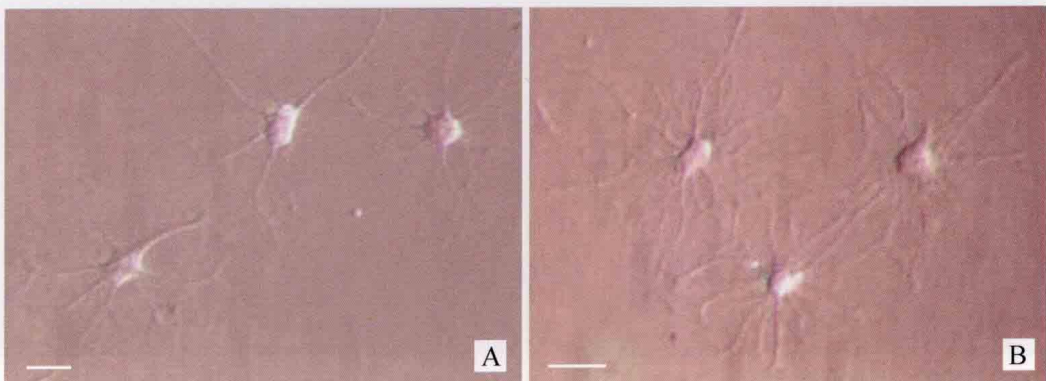
彩图5-3 培养乳鼠心肌细胞的cTnT表达

A. 乳鼠心肌细胞表达cTnT; B. DAPI染色的细胞核; C. A和B的重叠图像。标尺示10 μm



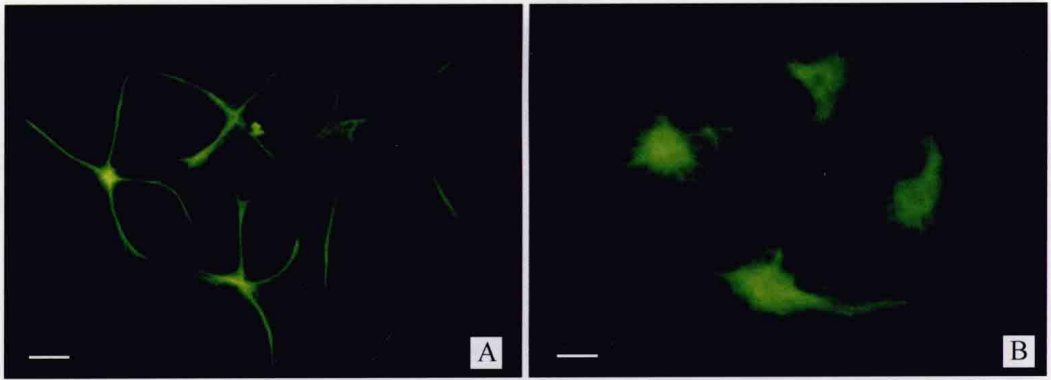
彩图5-6 MSC的c-kit表达

A. MSC表达c-kit; B. DAPI染色的细胞核; C. A和B的重叠图像。标尺示10 μm



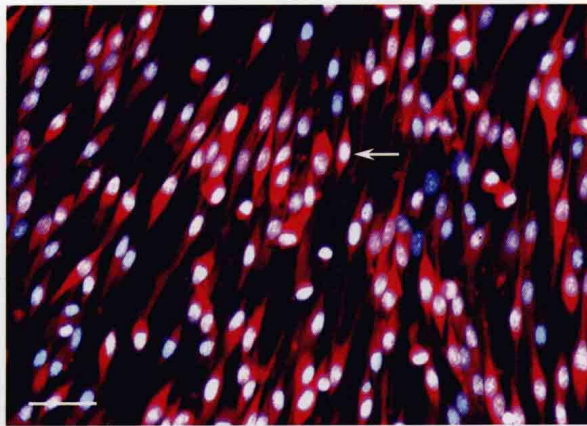
彩图6-2 大鼠星形胶质细胞

A. 纤维星形胶质细胞; B. 原浆星形胶质细胞。标尺示10 μm



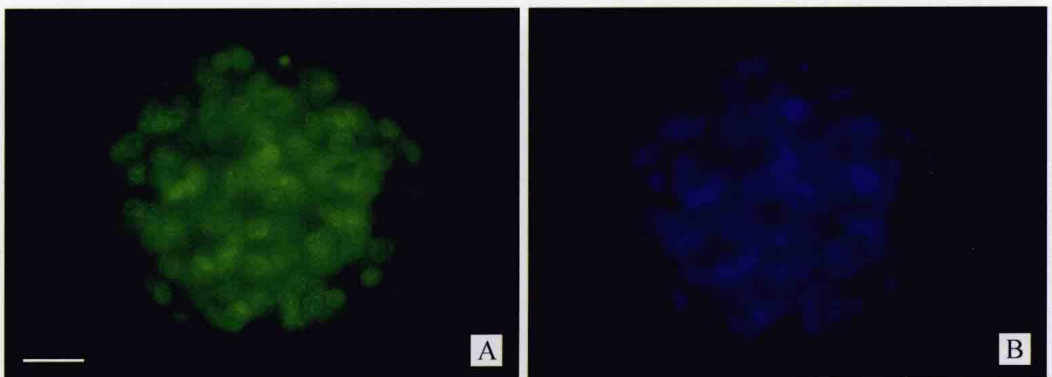
彩图6-3 星形胶质细胞表达GFAP

A. 纤维星形胶质细胞; B. 原浆星形胶质细胞。标尺示10 μ m



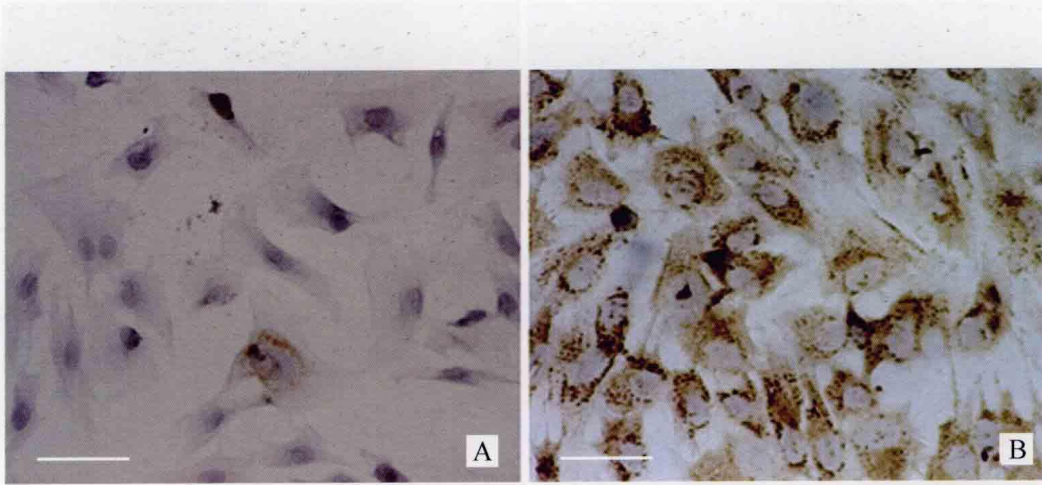
彩图6-6 施万细胞S-100免疫荧光染色

↑示施万细胞, 表达S-100, 呈现红色荧光, Hoechst33342染色显示细胞核。Hoechst33342染色, 核呈阳性而S-100为阴性的细胞是成纤维细胞。标尺示40 μ m



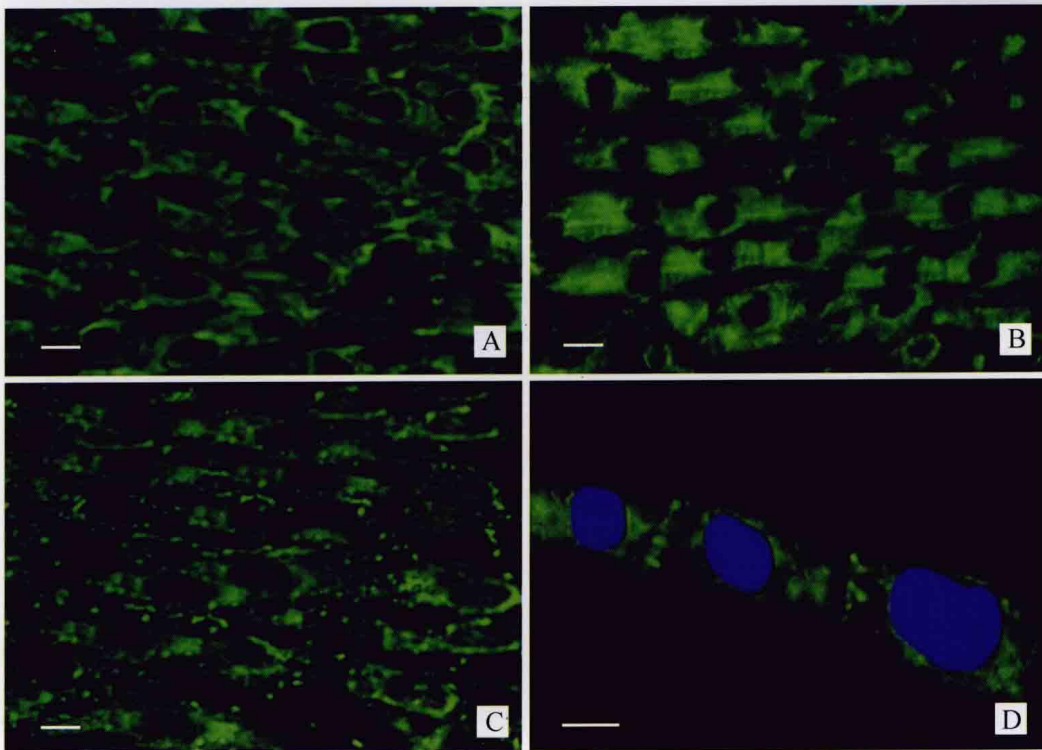
彩图6-8 神经干细胞表达巢蛋白

神经干细胞生长形成神经球。A. 神经干细胞表达巢蛋白; B. Hoechst 33342染色, 神经干细胞核被标记。标尺示20 μ m



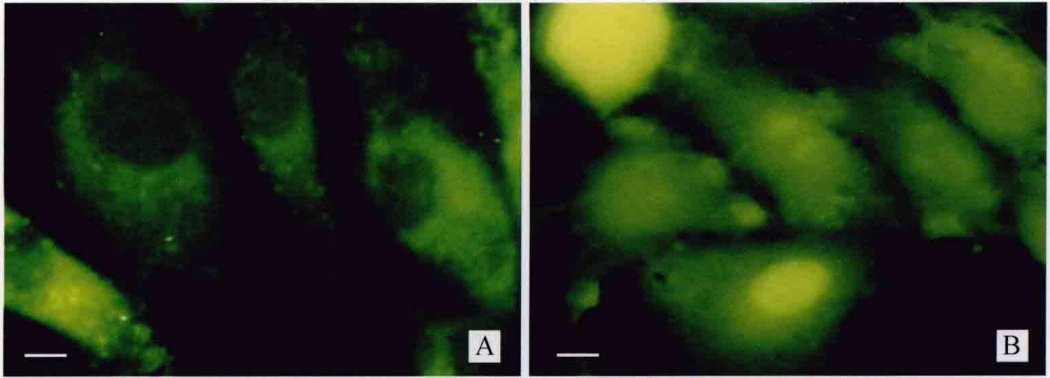
彩图7-3 诱导MMSC向软骨细胞分化后Ⅱ型胶原蛋白的表达

A. 对照组细胞, 可见少数细胞内有棕黄色颗粒; B. 诱导后21 d细胞, 胞质内有大量棕黄色颗粒。标尺示50 μm

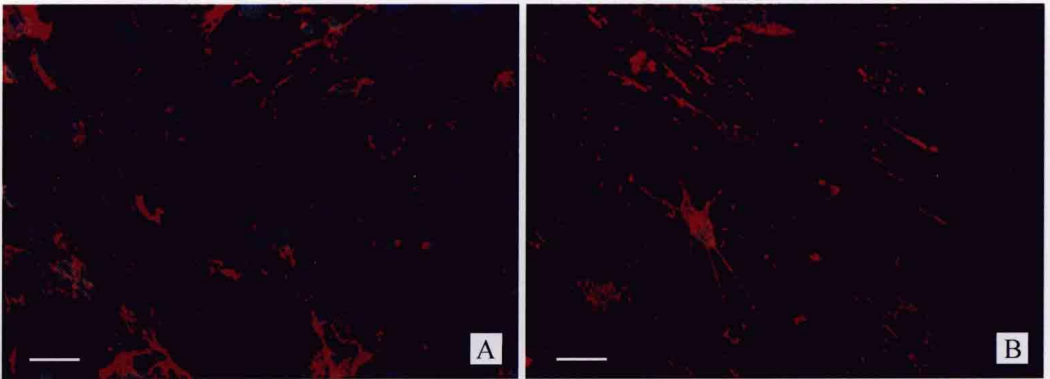


彩图7-8 诱导MSC向心肌细胞分化后cTnT和Cx43的表达

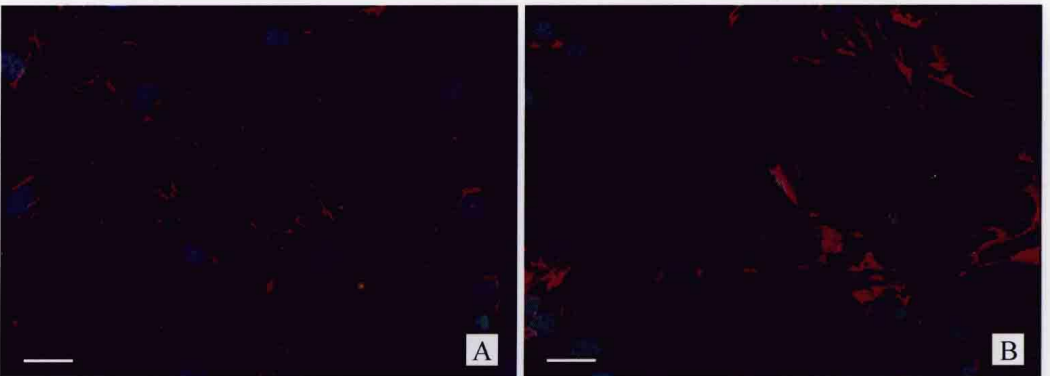
A. 诱导后2周, 细胞表达cTnT。B. 诱导后3周, cTnT表达增强, 出现横纹样结构。C. 诱导后2周, 细胞表达Cx-43, 阳性产物主要分布于细胞膜内侧和细胞之间。D. 诱导后4周, Cx-43主要位于相邻细胞连接处。标尺示10 μm



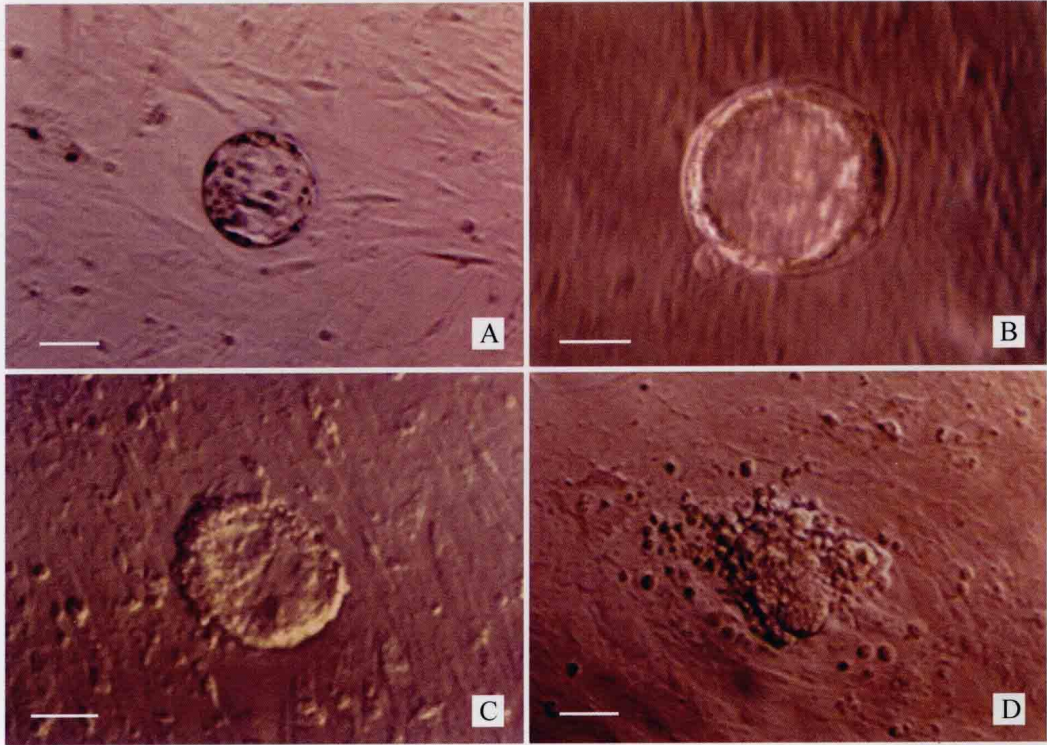
彩图7-10 诱导MSC向内皮细胞分化后3周第Ⅷ因子相关抗原和UEA-1的表达
A. 细胞表达第Ⅷ因子相关抗原；B. 细胞表达UEA-1。标尺示10 μm



彩图7-11 RA预诱导和NT-3基因重组腺病毒转染后细胞NF和MAP-2的表达
A. 诱导后细胞表达NF。B. 诱导后细胞表达MAP-2。用Hoechst 33342复染细胞核。标尺示10 μm

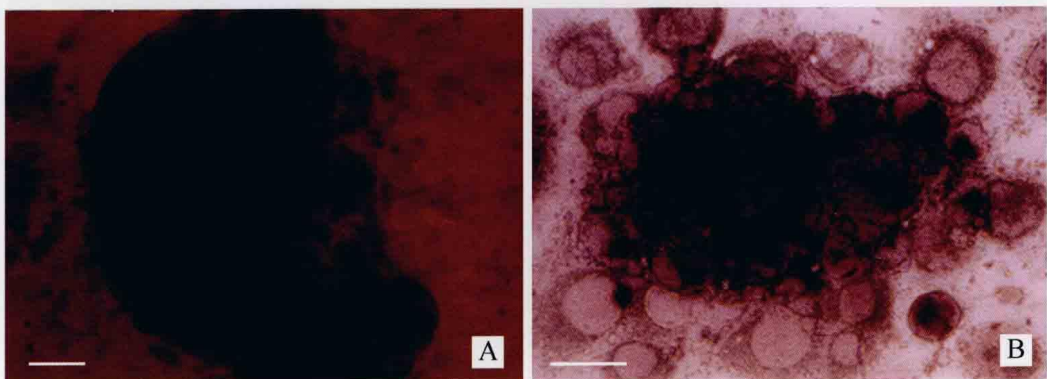


彩图7-12 诱导MMSC向神经元分化后PSD95的表达
A. RA诱导组，细胞表达PSD95。B. RA预诱导和NT-3基因重组腺病毒转染组，细胞表达PSD95明显增强。用Hoechst 33342复染细胞核。标尺示10 μm



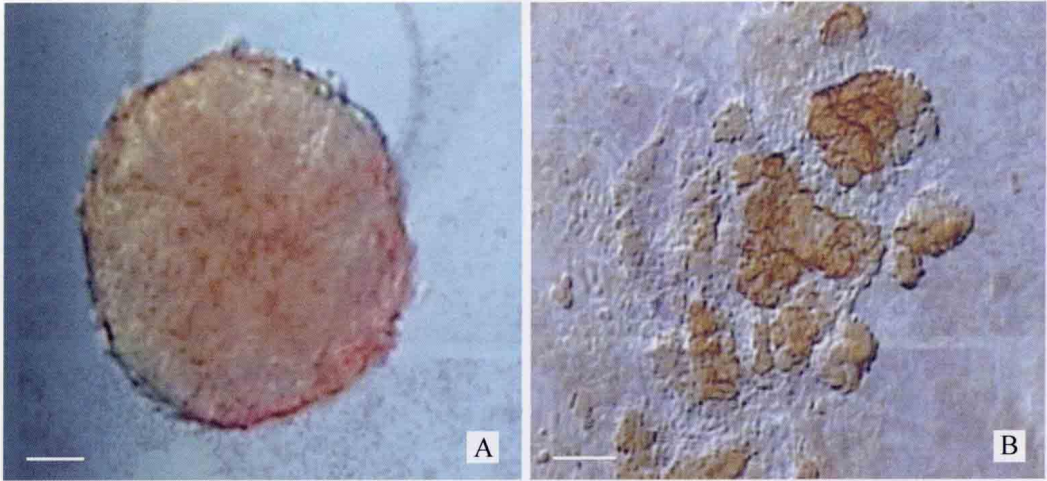
彩图8-2 小鼠囊胚的发育及其ESC集落的形成

A. 种植到MEF饲养层上的囊胚；B. 在饲养层上生长1 d，囊胚正在孵出透明带；C. 在饲养层上生长至3 d的ICM，透明带包膜已破，将周围饲养层推开；D. 在饲养层上原代生长5 d的ESC集落，呈“鸟巢”状。标尺示50 μm



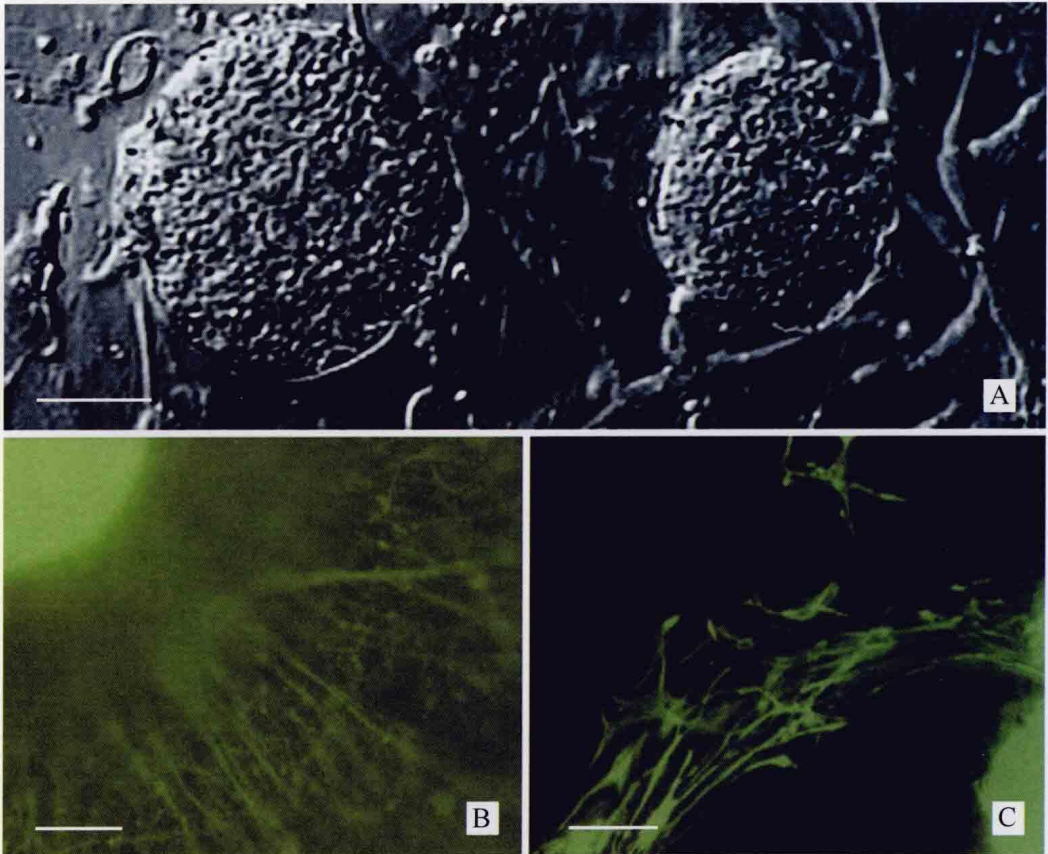
彩图 8-4 ESC集落的*Oct-4*基因mRNA表达和AKP活性

A. ESC集落呈*Oct-4*基因mRNA表达阳性，标尺示50 μm ；B. ESC集落呈AKP染色阳性，标尺示10 μm



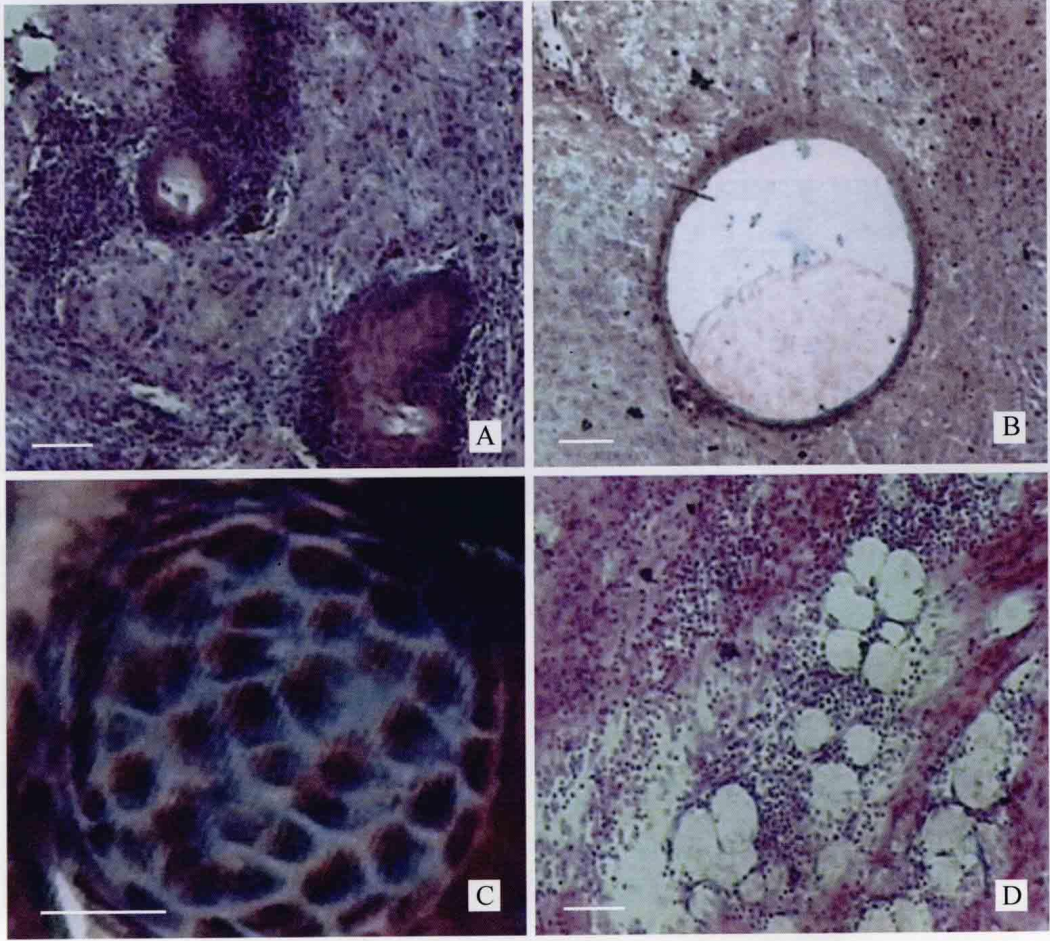
彩图8-5 小鼠ESC的体外分化

A. 球状简单EB; B. 心肌肌动蛋白免疫细胞化学染色, EB分化来的部分细胞呈肌动蛋白染色阳性。标尺示50 μm



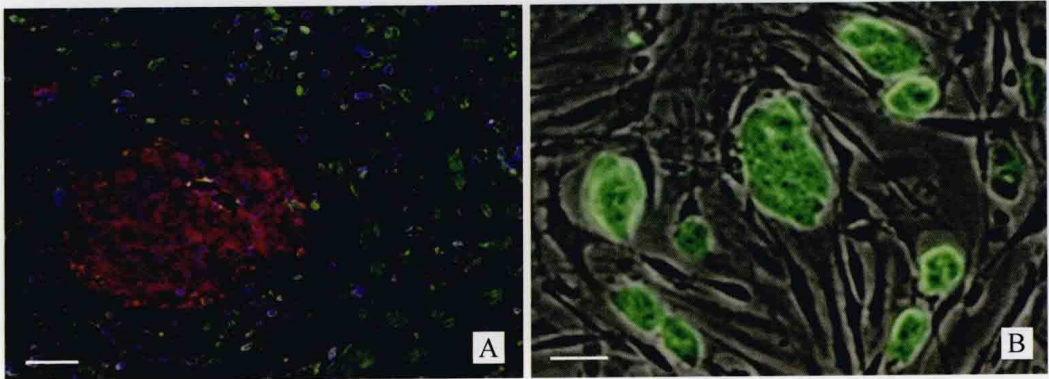
彩图8-6 ESC在GCM和MCM内贴壁生长时的分化状态

A. 未分化的ESC集落; B. 在GCM中分化的细胞, 可见从细胞团块中伸展出的轴突, 用抗神经元标记物 β -III-tubulin抗体进行免疫细胞化学染色, 这些轴突呈阳性; C. 在MCM中分化的细胞游出细胞团块, 用抗GFAP抗体进行免疫细胞化学染色, 从MCM中分化游离出的细胞呈阳性。标尺示100 μm

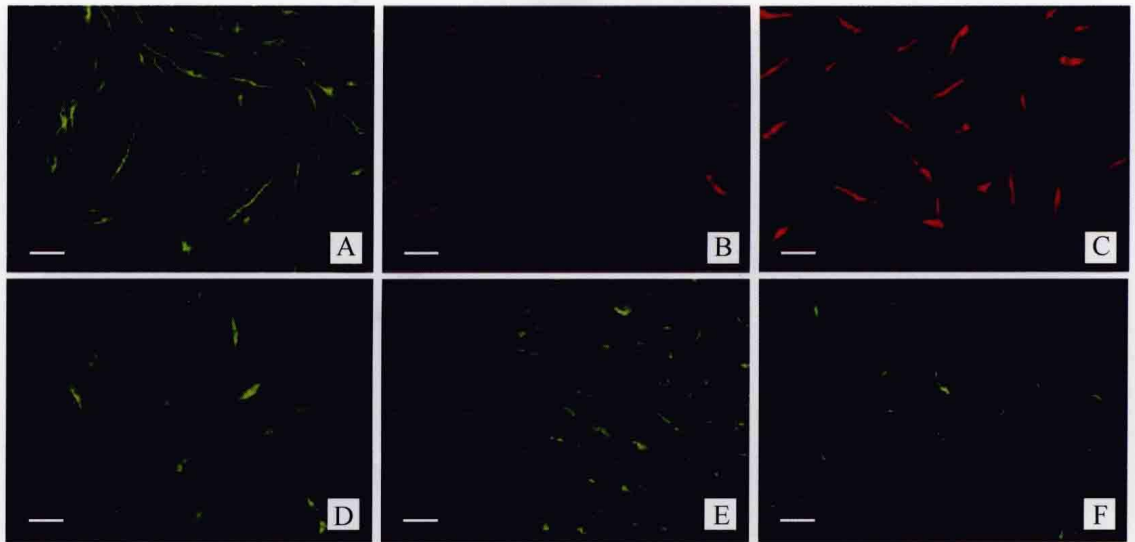


彩图8-8 小鼠ESC的体内分化

A. 神经样上皮; B. 管状结构; C. 软管; D. 脂肪细胞。标尺示50 μm

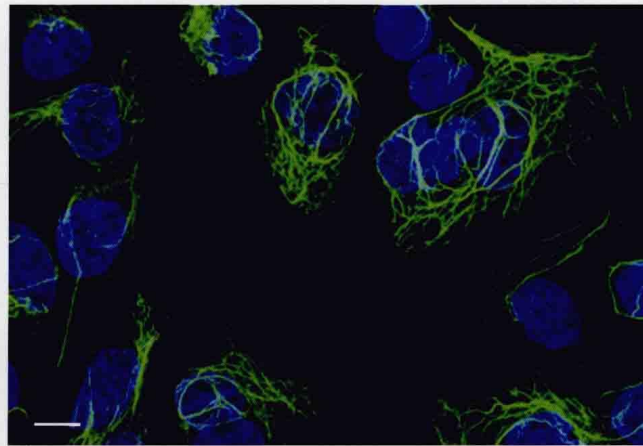


彩图8-11 体外培养的人(A)与小鼠(B)的胚胎干细胞; 引自<http://b2b.5191.com>

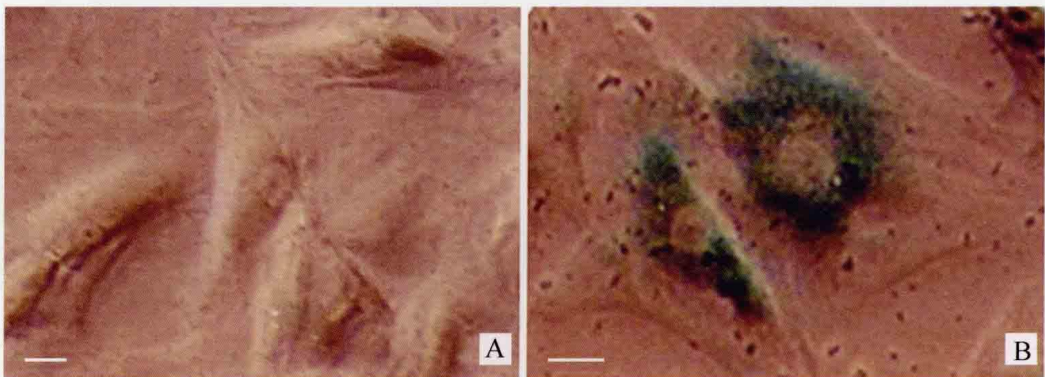


彩图8-13 神经干细胞分化形成的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞

A. β -III-tubulin阳性; B. GABA弱阳性; C. 5-羟色胺阳性; D. 突触素阳性; E. GFAP 阳性; F. O4阳性。标尺示50 μ m
(北京大学第三医院陈贵安教授供图)



彩图9-2 肝癌细胞系Hep-11细胞的CK-19免疫荧光染色
细胞呈阳性反应，绿色为CK-19，蓝色为DAPI染色的细胞核。标尺示10 μ m



彩图10-1 诱导后MSC的衰老相关- β -半乳糖苷酶活性

A. 正常MSC; B. 老年血清诱导的衰老MSC。标尺示10 μ m (复旦大学上海医学院张大勇博士供图)