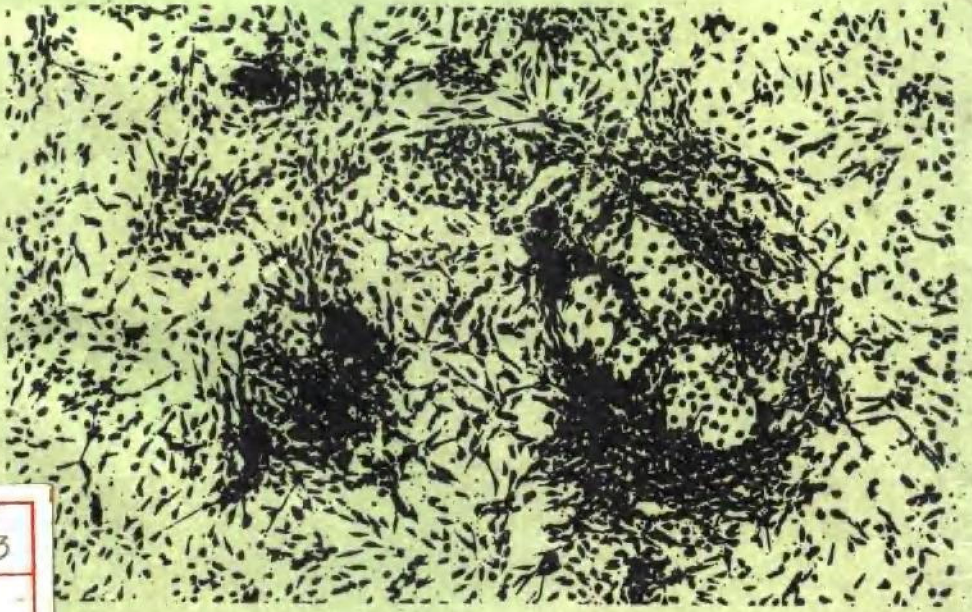


# 实用动物细胞培养技术

R. I. 弗雷什尼 编著  
潘李珍 等译



-33

世界图书出版公司

Q954.6-33

FLS

# 实用动物细胞培养技术

[英]R. I. 弗雷什尼 编著

潘李珍 张海燕 高明庚 郝冬梅 译  
刘尔翔 高天祥 薛绍白 刘成贵 校

世界图书出版公司

北京·广州·上海·西安

1 9 9 6

## 图书在版编目(CIP)数据

实用动物细胞培养技术/(英)弗雷什尼(Freshney, R. I.)著;潘李珍译. —北京:世界图书出版公司北京公司, 1996. 8

书名原文: Animal Cell Culture, a proactical approach

ISBN 7-5062-3001-1

I. 实… II. ①弗… ②潘… III. 动物-细胞培养-技术  
IV. Q954. 6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 15720 号

edited by R. Ian Freshney

Animal Cell Culture, a Practical approach

Oxford University Press, 1992

实用动物细胞培养技术

[英]R. I. 弗雷什尼 编著

潘李珍 张海燕 高明庚 郝冬梅 译

刘尔翔 高天祥 薛绍白 刘成贵 校

责任编辑 西世良

\*

世界图书出版公司北京公司出版

北京朝阳门内大街 137 号

北京昌平百善印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1996 年 9 月第 1 版 开本: 850×1168 1/32

1996 年 9 月第 1 次印刷 印张: 12.125

印数: 0001—5000 字数: 31 万

ISBN 7-5062-3001-1/S·1

著作权合同登记图字: 01—96—0888 号

定价: 18.60 元

由牛津大学出版社授权世界图书出版公司北京公司出版中译本, 1996

## 译者的话

动物组织培养技术诞生于本世纪初，现已应用于医学、生物学有关各个分支。近年来利用组织培养技术进行细胞水平、分子水平以及动物细胞工程的研究进展相当迅速，积累了很多资料。我们翻译的 R. Ian Fresheny 《Animal Cell Culture, A Practical Approach》这本书，就是对组织培养技术最新进展的综述。书中对组织培养的有关新技术，如无血清培养液、大规模细胞培养技术、流式细胞术的原理和应用等作了详细的阐述，特别介绍了 MTT 比色技术在细胞毒检测的应用这一前沿课题以及 DNA 指纹分析在细胞株的鉴定方面的突破性进展。全书贯穿着具体的实验操作程序，可供广大组织培养工作者以及有关科研人员参考或直接采用。

本书的英文原版于1986年在英国出版，1992年再版，1994年重印，深受专业工作者好评，并翻译成俄文与日文。

在多年从事动物组织培养的科研教学工作中，我们也深感本书是一本非常难得的理论与技术兼用的好书。在征得原作者 R. I. Fresheny 教授的同意后，我们组织人员对1986年版本着手进行翻译。脱稿后，北京世界图书出版公司迅速列选并得到了英国牛津大学出版社的授权在中国出中译本。后者还于1995年底寄来了1992年的新版本，这是国内看到的第一本新书。为此，我们根据新版本对手稿进行了全面修订，因此，我们可以毫无愧色地认为，中译本内容完全反映了这一领域的最新水平和最新进展。

中国医学科学院刘尔翔教授，首都医科大学高天祥教授，北京师范大学薛绍白教授以及中国人民解放军总医院基础所刘成贵

教授仔细审校书稿，我们还曾参考了首都医科大学安威博士翻译1986年版第6章的手稿，陈佩惠、李慧珠教授也曾给予帮助，在此一并表示感谢。

由于我们水平有限，译文中错误在所难免，敬请读者批评指正。

译 者

1995年10月

## 第一版序

近年来，动物细胞培养技术已从单纯的实验操作扩展到生物学研究和商业利用的许多方面，成为广泛采用的技术学手段。在提高动物细胞培养技术的多种适应性和标准化方面，已取得新进展。本书目的就在于为本领域的科学家和技术专家提供了解和使用这些最新进展的参考资料。这些进展包括无血清培养和动物细胞扩大培养技术在工业和半工业水平应用上的主要成就。现在已广泛认识到细胞系的鉴定、标准化和细胞贮存库的重要性。本书提供了有关信息以便读者自行建库和利用现有的中心贮存库和数据库。

细胞种群的分析 and 制备性组分的分级分离在“流式细胞术”和“细胞离心淘洗分离活细胞技术”两章中介绍，而细胞和亚细胞水平的分析则在“原位杂交”一章中描述。细胞间相互作用和保持组织结构的重要性已在“器官培养”一章中加以强调，其中讲述了许多标准技术。最后，在有关细胞活力及细胞毒检测一章中，还包括了离体毒理学以及抗肿瘤药物筛选的基本要求和常规培养物活力调控等方面的内容。

R. I. 弗雷什尼

## 第二版序

同生物学其他领域一样，科学家和工业生物技术人员所采用的细胞培养技术在方法上正进行着日新月异的变化。对于这些变化，我们尽量在第二版中反映出来。但第一版的基本原则仍保持不变，所以第一章几乎没有什么改变，改变较大的是其他章节，尤其是在无血清培养液、大规模培养、流式细胞分析等方面。这些变化不仅在细胞生物学者作为工具所用的技术方面，而且非专业人员也都是需要的。本书第一版发行之初，很少能从商业途径获得无血清培养液，而现在许多生产商不但可提供无血清培养液，如 Clonetics Corporation 的角化细胞培养液 (Keratinocyte medium) 及许多种杂交瘤培养液，而且能用适当的细胞进行质量控制。流式细胞分析 (第6章) 仍然是一项较新的技术，只要使用台式设备，即使不用专业技术人员的指导，初学者也可使用。

四唑氮盐 MTT (第8章) 作为细胞活性比色指示剂进行介绍，它对细胞毒活性分析方法产生很大的冲击。DNA 指纹分析的出现使鉴定单细胞株发生了革命性的变化 (第4章)。这些技术方面的发展是本书新版的必要内容。本书仍强调以较简便形式提供专业技术，增加其实用性及易学习的实验程序。

第一版发行后，本书的一位作者 Luciano Morasca 已不幸去世。他是我的朋友和同事，深受认识他及与他共同工作的人们的尊敬与爱戴。我们曾就组织培养在肿瘤细胞细胞毒活性研究方面的应用进行了饶有兴趣的探讨。在本书第二版问世之际，我愿把本书作为对他的纪念。

R. I. 弗雷什尼

# 目 录

<b>第1章 基本原理介绍</b> .....	(1)
1. 引言 .....	(1)
2. 培养细胞的生物学 .....	(1)
2.1 培养的来源和特征 .....	(1)
2.2 分化 .....	(3)
3. 培养材料的选择 .....	(4)
3.1 器官培养或细胞培养 .....	(4)
3.2 组织来源 .....	(5)
3.3 传代培养 .....	(6)
3.4 培养基的选择 .....	(8)
3.5 气相 .....	(9)
3.6 基质 .....	(10)
4. 培养的准备 .....	(10)
4.1 基质 .....	(10)
4.2 培养液 .....	(11)
4.3 细胞 .....	(12)
参考文献 .....	(15)

<b>第2章 培养哺乳类细胞使用的化学成分明确培养液及无血清培养液</b> .....	(17)
1. 引言 .....	(17)
2. 血清在细胞培养中的作用 .....	(17)
2.1 血清成分的作用 .....	(17)



2.2细胞培养中使用血清的优点和缺点.....	(22)
3. 无血清培养液设计策略和培养液的应用 .....	(24)
3.1一般程序.....	(24)
3.2培养液选择前的考虑.....	(25)
3.3无血清培养液要求的成分和因素：作用和性质.....	(26)
3.4最佳培养液的测定分析.....	(34)
3.5细胞培养的低血清和无血清培养液.....	(35)
3.6激素和生长因子的选择.....	(36)
3.7大规模培养生产细胞时无血清和化学明确培养液 的设计.....	(42)
4. 无血清培养液的制备和操作 .....	(44)
4.1一般原则和准备过程.....	(44)
4.2细胞从有血清到无血清和化学明确培养液的适应 .....	(45)
5. 生物基质涂抹培养表面的程序 .....	(48)
参考文献 .....	(50)

### **第三章 动物细胞大规模培养技术 .....** (54)

1. 引言 .....	(54)
2. 一般方法和培养参数 .....	(55)
2.1细胞的定量测定.....	(55)
2.2设备和试剂.....	(57)
2.3实施考虑.....	(58)
2.4细胞生长的动力学.....	(59)
2.5培养液和营养物质.....	(60)
2.6pH值 .....	(62)
2.7氧气.....	(64)
2.8大规模培养系统的类型.....	(69)

2.9 限制大规模培养因素的概述 .....	(71)
3. 单层细胞培养 .....	(72)
3.1 引言 .....	(72)
3.2 细胞贴壁 .....	(74)
3.3 大规模细胞培养 .....	(75)
4. 悬浮细胞培养 .....	(91)
4.1 细胞对悬浮培养的适应 .....	(91)
4.2 静止的悬浮培养 .....	(94)
4.3 小规模悬浮培养 .....	(95)
4.4 影响大规模悬浮培养的因素 .....	(95)
4.5 搅拌生物反应器 .....	(98)
4.6 连续流动的培养系统 .....	(99)
4.7 气动发酵器 .....	(102)
5. 固定培养 .....	(103)
5.1 固定培养系统 .....	(104)
5.2 包被培养系统 .....	(106)
5.3 有孔微载体 .....	(107)
参考文献 .....	(109)
<b>第4章 培养细胞的保存与特性鉴定 .....</b>	<b>(111)</b>
1. 引言 .....	(111)
2. 细胞库的建立 .....	(112)
3. 细胞的冷冻与定量复苏 .....	(114)
3.1 仪器 .....	(115)
3.2 准备工作及冷冻程序 .....	(117)
3.3 冷冻细胞的定量复苏和重建 .....	(118)
4. 细胞系特征 .....	(122)
4.1 细胞种的鉴定 .....	(122)

4.2微生物污染的检测 .....	(132)
4.3同种细胞间交叉污染的测定 .....	(144)
4.4细胞系组织来源的鉴定 .....	(159)
4.5免疫产物的定性与定量测定 .....	(167)
5. 细胞来源及特征数据的计算机化.....	(172)
6. 致谢.....	(173)
参考文献.....	(173)
<b>第5章 细胞离心淘洗分离活细胞技术 .....</b>	<b>(176)</b>
1. 引言.....	(176)
2. 细胞分离方法.....	(176)
3. 细胞淘洗器.....	(178)
3.1淘洗器转头 .....	(178)
3.2淘洗室 .....	(178)
3.3蠕动泵及附件 .....	(180)
3.4离心淘洗系统 .....	(182)
4. 技术操作.....	(183)
5. 数据收集及处理.....	(187)
5.1不同种细胞群的淘洗 (各部分细胞纯度的测定)	
.....	(187)
5.2已建立细胞系的细胞群体的淘洗 .....	(187)
6. 发展前景.....	(190)
7. 致谢.....	(193)
参考文献.....	(193)
<b>第6章 流式细胞术 .....</b>	<b>(194)</b>
1. 引言.....	(194)
2. 操作原理.....	(196)

2.1 流体动力学的聚焦 .....	(196)
2.2 激发 .....	(197)
2.3 聚焦 .....	(198)
2.4 光束几何学 .....	(199)
2.5 光学过滤 .....	(201)
2.6 光散射 .....	(204)
3. 数据输出与分析 .....	(211)
3.1 数据显示 .....	(211)
3.2 数据分析 .....	(213)
4. 质量控制 .....	(217)
4.1 检查 .....	(217)
4.2 重合校正 .....	(217)
4.3 脉冲形状分析 .....	(218)
4.4 时间 .....	(220)
5. 细胞分选 .....	(222)
5.1 静电分选 .....	(222)
5.2 分选效率 .....	(224)
6. 样品的制备 .....	(228)
6.1 不同组织细胞悬液的制备 .....	(228)
7. 分析种类范例 .....	(232)
7.1 非染色细胞的光散射 .....	(232)
7.2 染色方法 .....	(233)
7.3 染色方法的应用 .....	(238)
7.4 荧光素抗体的应用技术 .....	(240)
7.5 讨论 .....	(242)
参考文献 .....	(244)

<b>第7章 器官培养 .....</b>	<b>(247)</b>
-----------------------	--------------

1. 引言	(247)
2. 器官组织培养技术的回顾	(247)
2.1 凝固的血浆底物	(248)
2.2 琼脂基质	(248)
2.3 漂浮法	(249)
2.4 格栅培养法	(249)
2.5 交替暴露培养液和气相的培养法	(249)
3. 表玻璃培养技术	(250)
3.1 血浆凝固体与“救王筏”技术的结合	(256)
4. Maximow 单载片培养技术	(257)
5. 琼脂胶培养技术	(259)
5.1 体外运用悬浮技术研究小鼠胚胎块的发育	(266)
6. 用于畸胎学研究的胚胎培养	(269)
7. 格栅培养方法	(271)
8. 组织的器官培养：实例	(280)
8.1 神经细胞	(280)
8.2 新生大鼠肝脏	(282)
8.3 兔主动脉	(283)
8.4 人小梁网系统	(285)
8.5 人胃肠粘膜	(286)
9. 人成体组织的长期培养	(287)
10. 器官培养物光镜样品的制备	(290)
10.1 组织切片的制备	(290)
10.2 染色方法	(291)
11. 放射自显影术	(294)
11.1 类固醇放射自显影	(298)
12. 结果的定量	(300)
13. 器官培养的优缺点	(301)

参考文献	(302)
<b>第8章 细胞毒和活性检测</b>	<b>(305)</b>
1. 引言	(305)
2. 背景知识	(306)
3. 特异的培养技术	(307)
3.1 培养方法	(308)
3.2 药物作用时间与药物浓度	(312)
3.3 恢复期	(314)
4. 终点显示	(315)
4.1 细胞毒性、存活力和存活	(315)
4.2 细胞毒性与存活力	(315)
4.3 存活 (生殖完整性)	(323)
5. 检测法的比较	(324)
6. 操作步骤	(325)
6.1 药物及药物溶液	(325)
6.2 药物温育	(326)
6.3 存活与繁殖能力检测	(327)
6.4 细胞毒性检测	(334)
7. 结果的解释	(342)
7.1 细胞数和细胞毒指数间的关系	(342)
7.2 剂量-反应曲线	(343)
8. 细胞毒和活力检测的疑难点	(345)
8.1 大的标准误	(346)
8.2 检测间的变异	(346)
8.3 高于对照水平的刺激	(346)
9. 自动化作业与未来的发展	(348)
参考文献	(348)

<b>第9章 原位杂交</b>	(352)
1. 引言	(352)
2. 杂交技术	(352)
2.1 载玻片的处理	(352)
2.2 固定	(353)
2.3 原位杂交	(355)
2.4 洗脱程序	(356)
2.5 信号检测	(356)
3. 原位杂交的应用	(356)
4. 探针的选择	(357)
5. 标记物的选择	(358)
6. 灵敏度	(359)
7. 阴性对照	(359)
8. 原位杂交的具体步骤	(360)
9. 致谢	(363)
参考文献	(363)
<b>附录</b>	(365)
A <sub>1</sub> 常规试剂	(365)
A <sub>2</sub> 专门项目供应	(367)

# 第1章 基本原理介绍

## 1. 引言

动物组织和细胞培养是细胞基础科学以及分子生物学很多不同领域中广泛使用的技术，也应用于迅速发展的生物技术应用领域。基本操作程序的介绍，很多实验室已具备，而且通常作为大学生学习生物科学的部分内容。有几本教科书已经用于帮助初学者学习<sup>[1~3]</sup>，向他们介绍配制、除菌以及细胞繁衍的基本原理。因而本书重点是介绍一些特殊问题，其中的大多数对于全面理解以及正确利用组织培养技术是相当重要的。

本章将介绍培养细胞的一般内容，它们的生物学、来源及特征，并提出某些基本概念及定义。

## 2. 培养细胞的生物学

### 2.1 培养的来源和特性

当前能培养生长的各种细胞类型十分广泛。它们包括结缔组织，如成纤维细胞、骨骼组织（骨及软骨）、骨骼肌、心肌、平滑肌、上皮组织（如肝、肺、乳腺、皮肤、膀胱及肾脏）、神经细胞（神经胶质细胞、不繁殖的神经细胞）、内分泌细胞（肾上腺、垂体、胰岛细胞）、黑色素细胞以及许多不同类型肿瘤细胞（进一步介绍可参考4部分）。

使用细胞类型特异标志（参看第4章）对多数培养物进行细胞



世系的检查是有可能的，但在很多情况下，还不能完全清楚这些细胞在一个世系中所处的位置。对于能增殖的细胞，可能是代表一种前体细胞而不是充分分化了的细胞，后者通常不繁殖，因此，某些培养物细胞系可以是异质的。某些培养物，如表皮角质细胞，它包含有干细胞、前体细胞和角质鳞状细胞。干细胞不断地更新，最终不可逆转的分化，释放鳞状细胞到培养液中去。别的培养物，例如成纤维细胞，包含有在低密度下（ $\sim 10^4$ 细胞/cm<sup>2</sup>）能增殖的一种相当一致的细胞种群，而在高密度下（ $\sim 10^5$ /cm<sup>2</sup>）则是已分化的不增殖的细胞种群。这种高密度成纤维样细胞种群，如果用胰蛋白酶消化或用橡皮刮子刮除以减少细胞密度，则它们又可重新进入细胞周期。

由于细胞世系繁殖的结果，在细胞系中存在培养的异质性。使其一致的唯一因素是培养液和基质以及生长率最大的细胞类型（或多个类型）的优势。这种倾向选择了普通的类型。但由于细胞之间生长控制的性质事实上很不清楚，故细胞种群包含了几种不同的、只有用克隆方法才能查明的表型。

营养因素如血清、钙离子浓度<sup>[5]</sup>和激素，细胞<sup>[6]</sup>和基质的相互关系<sup>[7]</sup>，以及培养细胞密度都可影响细胞的分化和繁殖。因此，不但确定所使用细胞世系是重要的，还需要辨别及稳定的分化时期，后者可通过控制细胞密度及营养、激素、环境获得均匀一致的细胞种群。

因为细胞培养动力学性质有时很难控制，而且在体外又难以再现体内细胞合适的相互关系，很多人放弃连续增殖细胞的观念，偏向于保持原有组织的整体结构进行培养。这样的培养系统叫做组织型培养或器官培养，将在第7章中讨论。为试图重新创造体外组织群结构，现在已试验用不同类型细胞聚集在一起培养，用高密度细胞培养成多细胞球体<sup>[9]</sup>，在玻璃或塑料基质上灌注细胞成多层培养物<sup>[10]</sup>，或将细胞培养在飘浮胶原上<sup>[10]</sup>，或人工制造的微