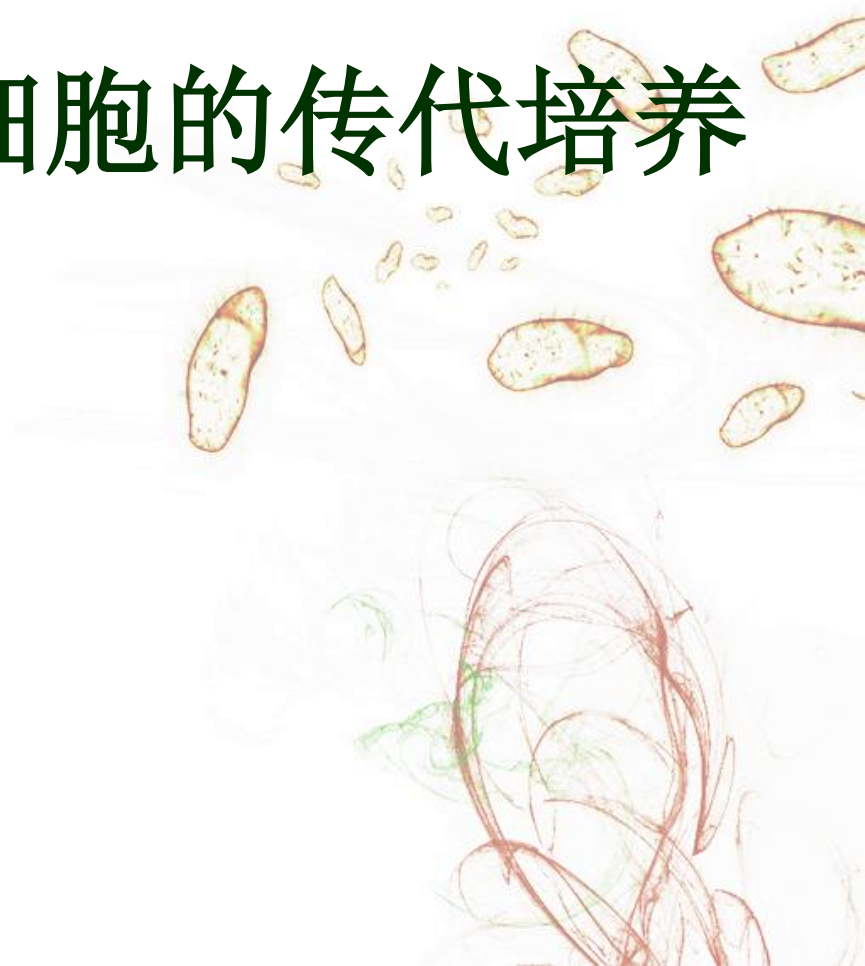


哺乳动物离体贴壁细胞的传代培养



目的

1

- 熟悉实验原理

2

- 掌握细胞传代的操作

3

- 学习细胞计数

一、实验原理

- 细胞生长类型：

- 贴壁型细胞：附着在某一固相支持物表面才能生长的细胞。

- 悬浮型细胞：不必附着于固相支持物表面，在悬浮状态下即可生长的细胞。

- 绝大多数有机体细胞属于贴壁型细胞，只有少数细胞类型如某些肿瘤细胞和白细胞可在悬浮状态下生长。

- 但是为什么贴壁细胞能贴壁，是否思考过？

- 为什么要传代：

- 细胞在培养瓶中长成致密单层后，已基本饱和；为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就要进行传代（再培养）。传代培养使一种将细胞株保存下去的方法，也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。

一、实验原理——贴壁生长细胞的生长过程

- 游离期or悬浮期：

——细胞接种后在培养基中处于悬浮状态，细胞质回缩，胞体呈圆球形。

- 贴壁期：

——细胞附着于胶原、玻璃、塑料或其它细胞等底物上，细胞株平均于10min—4h贴壁。

- 潜伏期：

——细胞有生长活动，但无细胞分裂，一般为6-24h。

- 对数生长期：

——细胞数随时间变化成倍增长，活力最佳；适合进行各种实验。

- 平台期：

——细胞长满瓶底后，虽有活力但不再分裂。

二、实验准备——试剂配制or购买

- 培养基

- 不同细胞有不同的适合培养基，养细胞前需查清楚。大多数培养基中使用酚红作为pH指示剂红色代表中性，黄色代表酸性，紫色代表碱性。

- 很多细胞的培养基中需要加入血清：血清最好放置在-20℃，解冻时应先置于4℃融解，融解过程必须规则摇晃均匀。（思考：血清是否应该灭活？）

- 此次实验为RPMI1640完全培养基（需添加5%NaHCO₃，小牛血清，青霉素，链霉素和谷氨酰胺）。

- 缓冲液

- 磷酸盐溶液（Phosphate Buffered Saline, PBS）、Hanks液or D-Hanks液

- 消化液

- 可以使用0.25%胰酶、0.05%胰酶or EDTA溶液；若胰酶是自己配制，则要用不含钙、镁离子及血清的平衡盐溶液。

- 添加剂

- 谷氨酰胺：合成培养基中都含有较大量的谷氨酰胺，作为核酸和蛋白质的合成原料；注意：其在溶液中很不稳定，4℃仅能存放两周。

- HEPES：羟乙基哌嗪乙硫磺酸，用于防止培养基pH迅速变动。

二、实验准备——熟悉实验材料

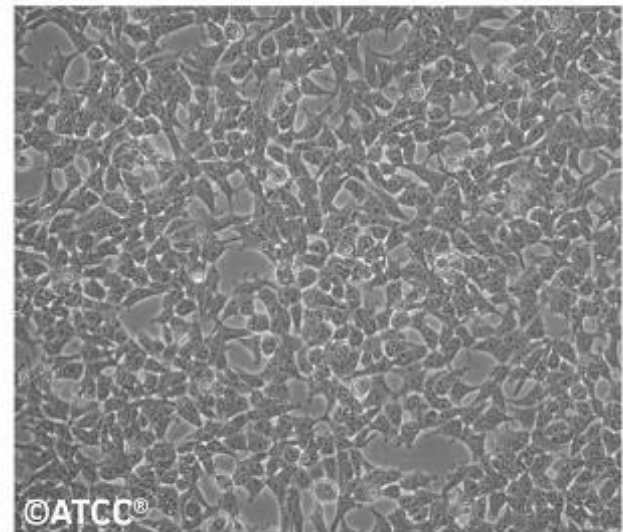
293T, 人胚肾上皮细胞系293经过腺病毒转染, 能表达SV40大T抗原

<http://www.atcc.org>

<http://www.cellbank.org.cn/index.asp>

ATCC Number: CRL-3216

Designation: 293/T



©ATCC®

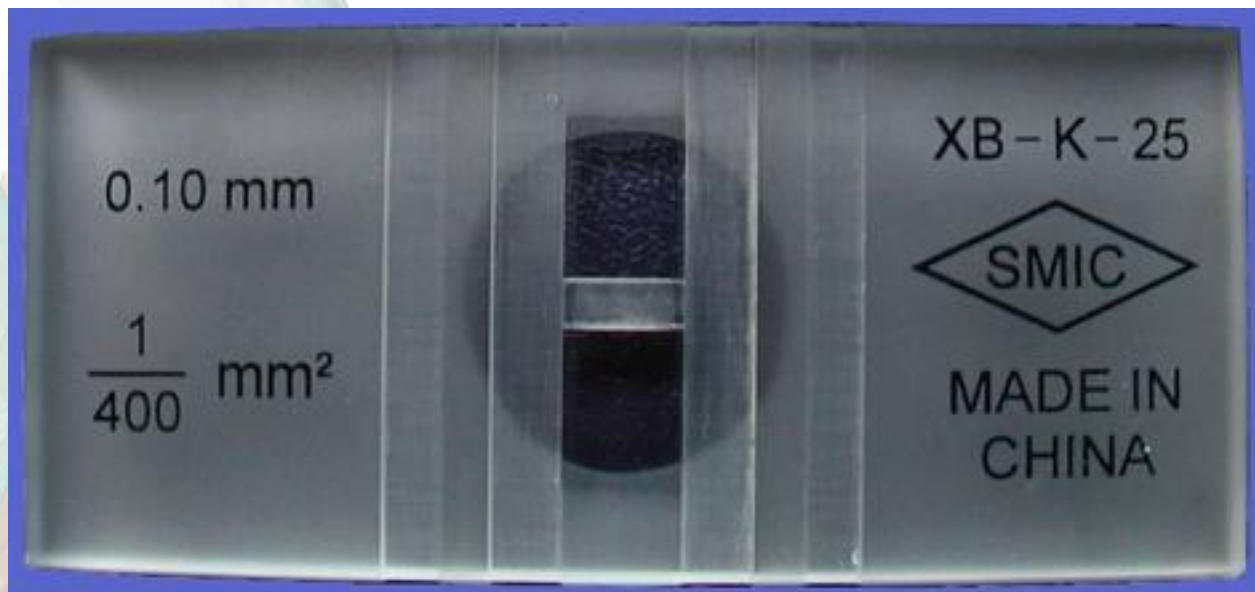
Low Density

三、实验操作——本次实验步骤

- 1. 洗净双手，入无菌室缓冲间穿戴工作服、帽子、口罩后进入无菌室。
- 2. 点燃煤气(或酒精)灯，用75%乙醇棉球抹拭双手、操作台表面、各种试剂瓶口和瓶身。
- 3. 消化细胞。取接种3-5天已形成单层细胞的培养皿，将原有培养液弃去。吸取1-2 mL的胰酶加入到培养皿内（从侧面加入，勿直接冲洗细胞单层），轻摇数次后弃去。吸取2mL的消化液加入到培养皿内（从侧面加入，勿直接冲洗细胞单层），轻摇数次使消化液均匀分布在细胞表面。室温消化1-2min，待细胞单层上出现透明针尖样小孔隙时（此时镜检可见成片层的细胞收缩成圆形，细胞与细胞之间相互接触松散或互不接触），弃去大部分消化液（留下100-200 uL液体），然后迅速加入32mL完全培养液进行中和，用Tip头吸打细胞数次，使细胞团块成单，弃去1ml细胞悬液。
- 4. 细胞接种。吸出1mL的细胞悬液在35mm培养皿内，再添加新鲜的完全培养基1mL。混合均匀（前后或左右小幅晃动），编号，放置到细胞培养箱内进行培养，隔天观察结果。

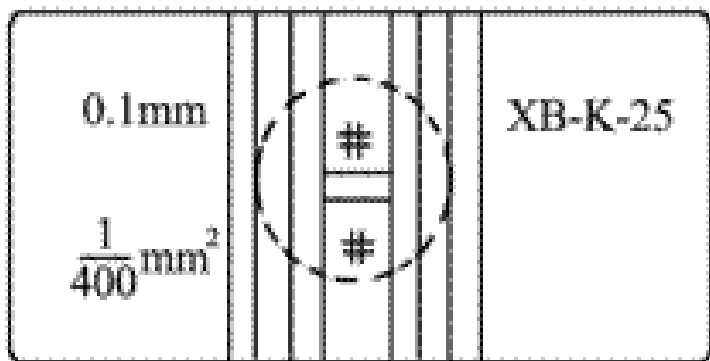
三、实验操作——细胞计数

- 手工计数细胞：血细胞计数板

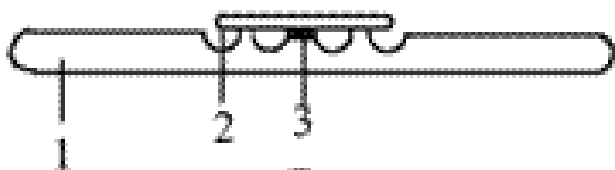


- Coulter计数器

三、实验操作——细胞计数



A

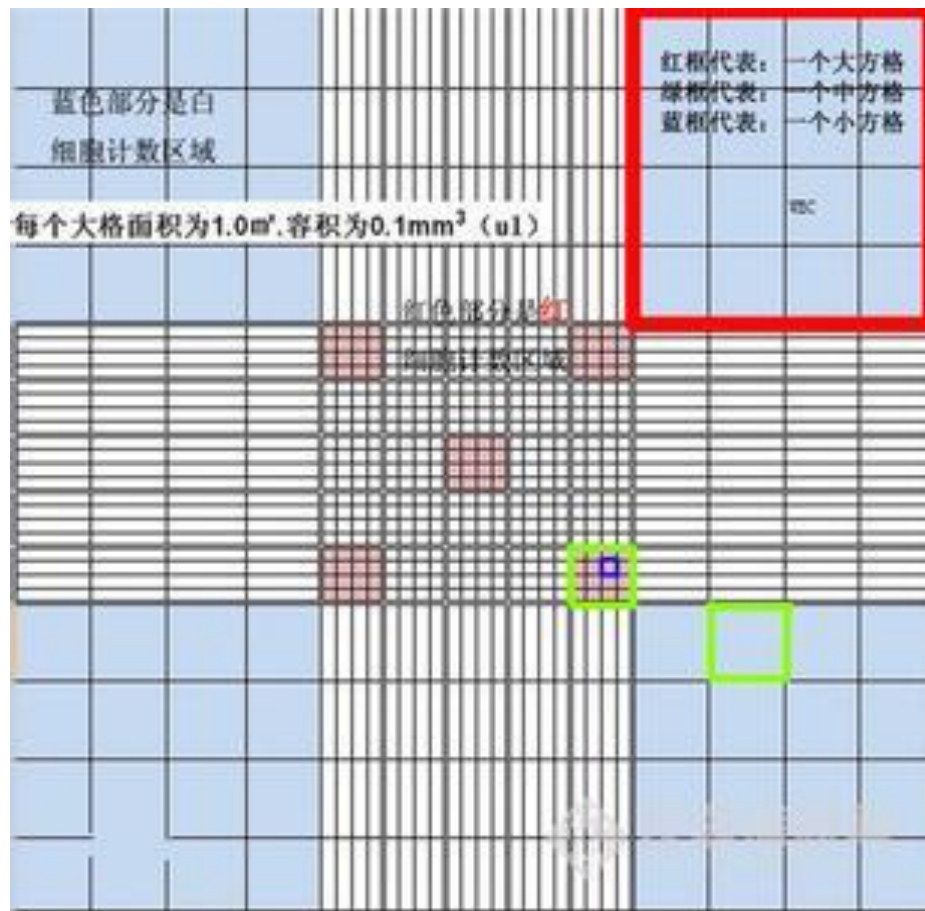


B

血细胞计数板构造 (一)

A. 正面图; B. 纵切面图

1. 血细胞计数板; 2. 盖玻片; 3. 计数室



$$\text{计算公式: 细胞数 / ml} = 4 \text{大格细胞总数} / 4 \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

三、实验操作——细胞计数

用酒精棉球擦拭细胞计数板，自然晾干。取90ul消化后的细胞悬液，加10ul台酚蓝染色液，吹打均匀后吸取10ul细胞悬液（勿引入气泡）沿细胞计数板血盖片边沿轻轻加入计数板内（不能有气泡、空隙，也不能使其外溢以免定量有误），在光学显微镜(10×10)下计数。

计算公式：细胞数 / ml = 4大格细胞总数 / 4 × 稀释倍数 × 10⁴

三、实验操作——细胞计数

手工计数注意事项：

- 1、计上不计下，计左不计右。
- 2、吸取少量悬液沿盖片边缘缓缓滴入，要保证盖片下充满悬液，注意盖片下不要有气泡。
- 3、镜下偶见由两个或以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团占10%以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。
- 4、细胞悬液须与台盼蓝（0.4%）混合后再计数，以区别死细胞。（活细胞不被染色，死细胞染成蓝色。）

三、实验操作——传代培养

- 1、细胞房及超净台的紫外线消毒，时间约30min-1h。
- 2、准备材料：完全培养基，0.25%胰酶，PBS，75%乙醇，培养瓶，并且预热培养用液：把装有培养液、PBS和胰酶的瓶子放入37°C水浴锅内预热。
- 3、用酒精棉球擦拭实验台和双手，正确摆放使用的器械（保证足够的操作空间，不仅便于操作而且可减少污染）；点燃酒精灯（注意火焰不能太小）。
- 4、从培养箱内取出细胞（若是培养瓶，注意取出细胞时要旋紧瓶盖），用酒精棉球擦拭显微镜的台面，再在镜下观察细胞。
- 5、小心用移液枪吸去原培养皿中的培养液；加入2ml的PBS（无Ca²⁺和Mg²⁺）清洗贴壁细胞1-2次，吸去PBS（此步骤中，PBS应小心添加，以免将贴壁细胞吹打损失）
- 6、加入原培养液1/10体积（量以盖住细胞最好）的胰蛋白酶-EDTA消化，此处为800ul，使细胞间连接断裂，液体均匀覆盖培养皿，大约2min或培养箱中20s（目测贴壁细胞块状脱落为标准；倒置显微镜下观察消化细胞，若胞质回缩，细胞之间不再连接成片，表明此时细胞消化适度；最佳消化温度为37°C）。
- 7、细胞消化完毕后，加入适量的培养基（带血清）拮抗以终止消化，并吹打细胞，制成均匀的细胞悬液（尽量吹打均匀，使细胞分散开。）
- 8、将细胞悬液转移至1.5mlEP管，离心2-3min，转速控制在2000rpm下，后弃去上清（此步骤旨在去除可能过度消化产生的细胞碎片）。
- 9、沉淀用1mlDMEM吹打均匀后，按照下面介绍的方法计数细胞，后按比例分装到已装有新鲜培养液的培养皿中。（传代细胞的密度应该不低于5×10⁵/ml。）
- 10、做好标记，晃动以使细胞铺展均匀（经验为横纵轴方向各晃动20-30下，此处应小心勿让培养液溅出）。
- 11、显微镜下观察细胞：倒置显微镜下观察细胞量，以及细胞是否铺展均匀。

无菌是细胞操作的根本！

思考题：

- 1、如何规范操作确保无菌？
- 2、贴壁细胞为什么会贴壁？

