

吉祥

细胞的原代培养



细胞培养系列实验注意事项：重要！

- 1、每周完成实验后，重复清洗，消毒灭菌工作。
- 2、灭菌的培养用液在细胞间的黑色冰柜；一个组一个超净工作台；培养的CO₂培养箱是专用的，上面有标签，不要弄混，不用开其他培养箱，不要拿其他工作台面上的用品。
- 3、操作间和操作台的紫外灯照射
- 4、间隙每组准备好自己的用品，特别是酒精棉球、酒精灯、止血钳或大镊子、废液缸、打火机、标签纸、封口膜；培养用品；培养用液从冰箱拿出复温；人员的准备
- 5、定期观察实验结果（每天下午17:00-18:00），记录并拍照，如需换液或传代也在此时间段进行。（观察必须严格准时实验室时间分配，传代或换液如需另行安排时间请先和杨菁老师申请，18010518538）

细胞培养开设的实验项目

- 原代培养
- 传代培养
- 换液
- 冻存和复苏（视频教学）
- 细胞活力测定
- 细胞凋亡的形态学检查

细胞培养(cell culture)技术



将细胞从体内分离，并模拟体内生理环境在体外 (*in vitro*) 进行培养，从而研究其生长发育生殖等现象的一门实验技术。

分类：原代培养和传代培养



原代细胞培养概念

- 由体内直接取出组织或细胞进行培养叫原代培养。原代培养细胞离体时间短，性状与体内相似，适用于研究。
- 幼稚状态的组织和细胞，如：动物的胚胎、幼仔的脏器等更容易进行原代培养

原代细胞培养操作（小鼠组织细胞培养为例）

- **取材：**（实验操作者做好准备后，辅助人员）用颈椎脱位法使小鼠迅速死亡。把整个小鼠浸入盛有75%乙醇的烧杯中数秒钟消毒，取出后放在大平皿中携入超净台。用消毒的剪刀在躯干中部环行剪开皮肤，（换剪刀）取出目标器官或组织，放置于培养皿或青霉素小瓶中，以平衡盐溶液洗去血污
- 处死——表面消毒——进入超净工作台，解剖（注意换解剖工具）——取目标——缓冲液冲洗——去掉表面的污渍、结缔组织或膜

原代细胞培养操作

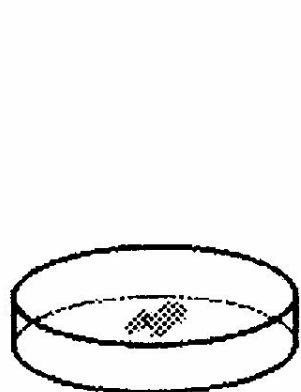
- **切割：**用平衡盐溶液将取出的组织块清洗三次，然后用眼科手术剪刀仔细将组织反复剪碎，直到成 1mm^3 左右的小块，再用平衡盐溶液清洗，洗到组织块发白为止。静置数分钟，使组织块自然沉淀到管底，弃去上清（或离心，800—1000转 / 分，5分钟）

■ 下面分两种方法：组织块法和酶消化法

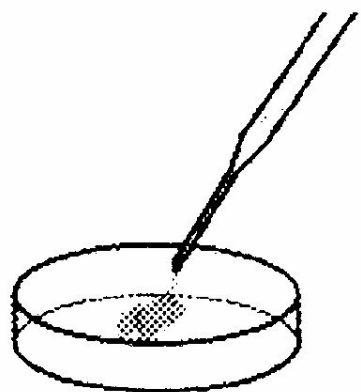
原代细胞培养操作

■ 1. 组织块培养法:

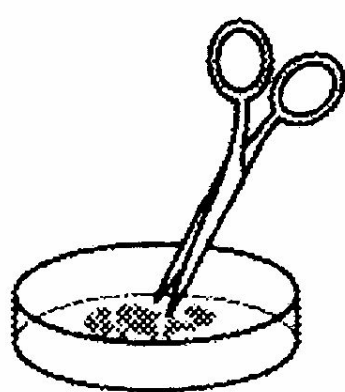
用吸管吸取小块，在培养瓶底部均匀摆开，**翻转培养瓶**，加入2—3ml培养液，培养4—5h后，待组织卡能牢固贴于瓶壁，再轻轻**翻转培养瓶**，静置培养



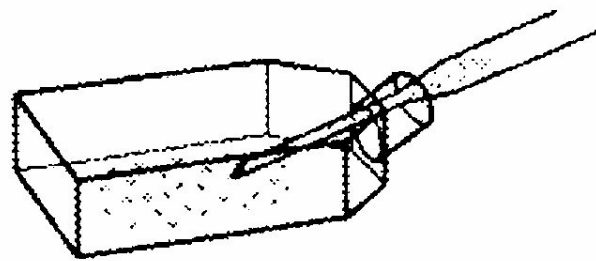
取材



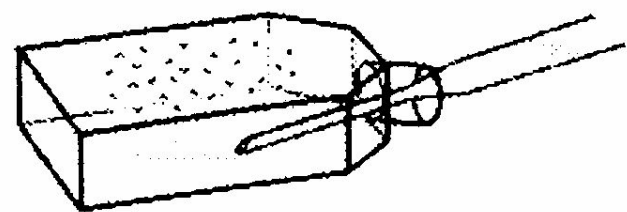
冲洗



剪碎



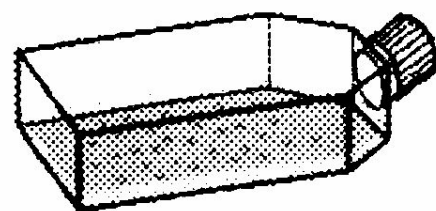
贴瓶



翻瓶加培养液



干涸



培养

原代细胞培养操作



■ 组织块培养法:

每天后观察，在组织块边缘是否有细胞长出，根据培养液颜色，适当**更换培养液**，10—15d可长成单层，此时，可传代培养。



换液操作

- 贴壁细胞：

无菌条件下倒掉原培养液，加入新鲜培养液（预先复温）。（也可半量换液）

- 悬浮细胞：

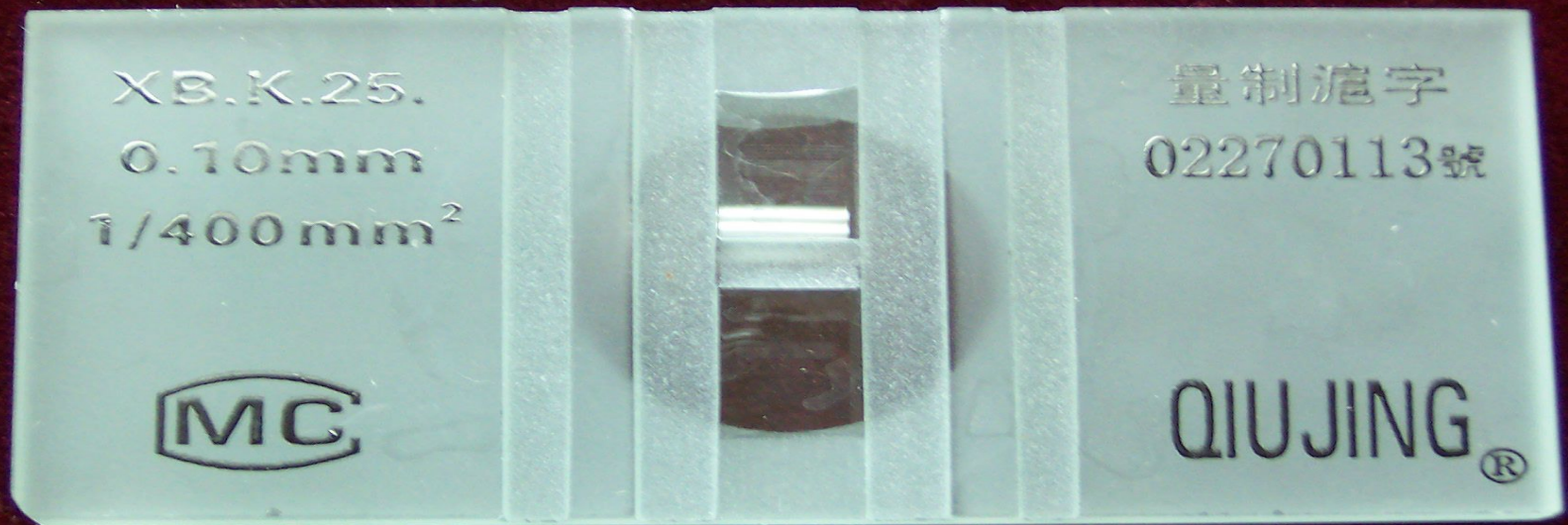
无菌条件下将瓶中的细胞连同培养液一起移至离心管中，离心，弃上清，加入新鲜培养液重悬细胞，重新接种。

原代细胞培养操作

- 2. (酶) 消化法:
- 加入0.25%胰蛋白酶消化液(5-10倍量), 与组织块混匀。置37℃消化, 观察消化情况(每隔一定时间摇动一下离心管或烧杯), 组织块变松散, 颜色略白时, 拿出反复吹打, 加入培养液(含血清)终止消化。细胞筛网过滤。
- 离心, 吸去上清, (可反复一次), 沉淀加入3-5~10ml细胞培养液, 用吸管吹打混匀, 计数, 细胞浓度为 5×10^5 , 移入培养瓶中, 置于二氧化碳培养箱中培养

血细胞记数板

吉祥如意



2005/12/02

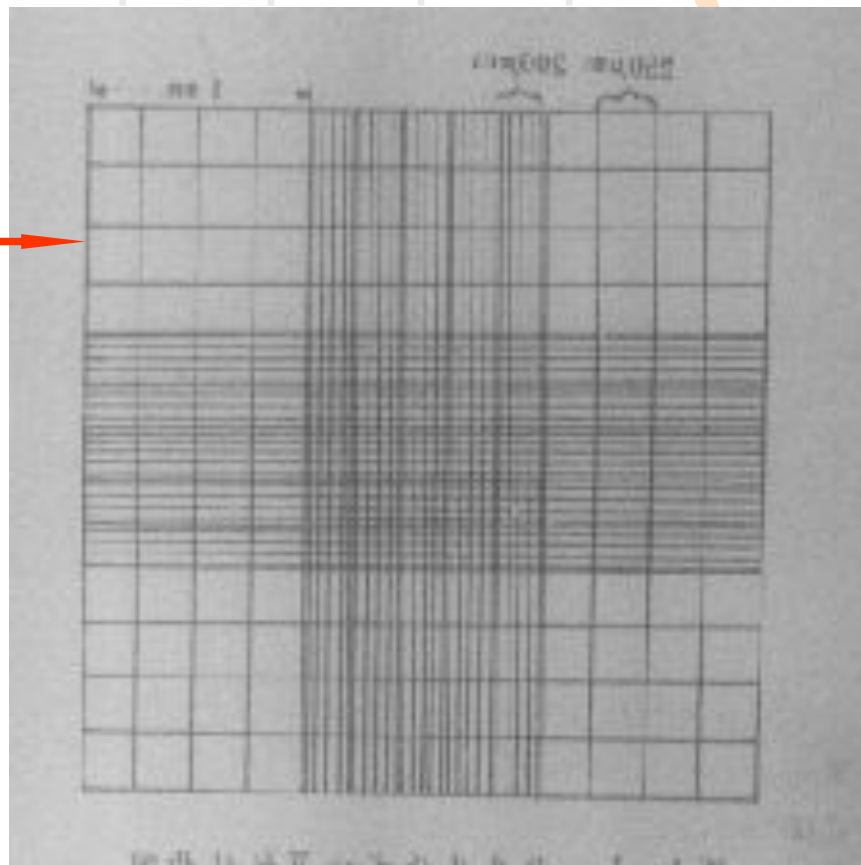
血细胞计数板的构造

细胞计数区：

四个角得大方格

16个中格 (4×4)

原则：计左不计右，计上不计下，细胞成团计一个



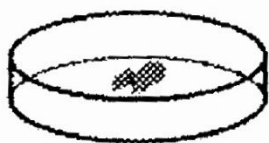
公式

$$(\text{细胞悬液的细胞数}) / \text{ml} = (\text{四个大格子细胞数} / 4) \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

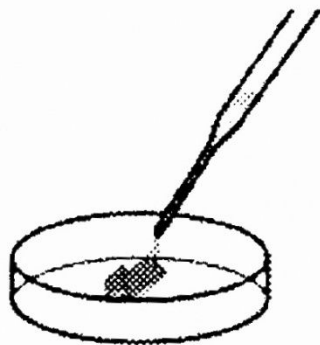
说明：

公式中乘以 10^4 因为计数板中每一个大格的体积为：

$$1.0\text{mm} (\text{长}) \times 1.0\text{mm} (\text{宽}) \times 0.1\text{mm} (\text{高}) = 0.1\text{mm}^3$$



取材



冲洗



剪碎



加胰蛋白酶

消化



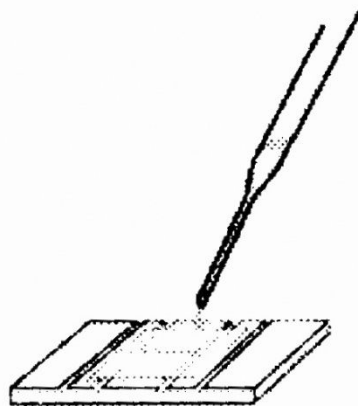
弃消化液



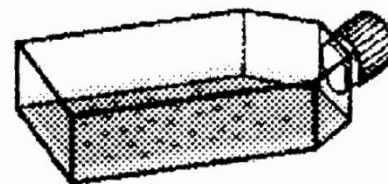
加培养液



吹打



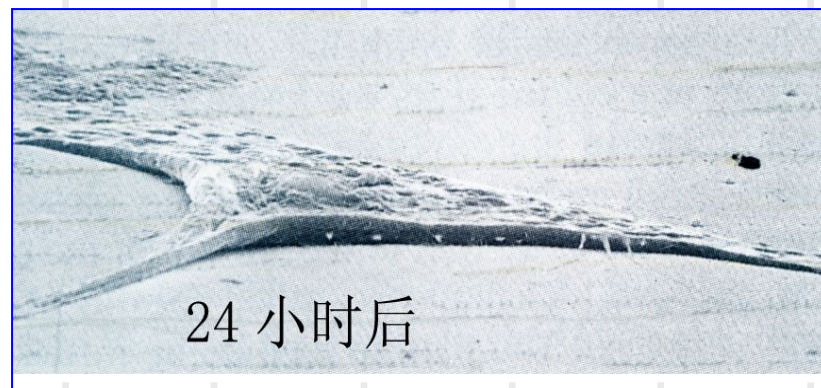
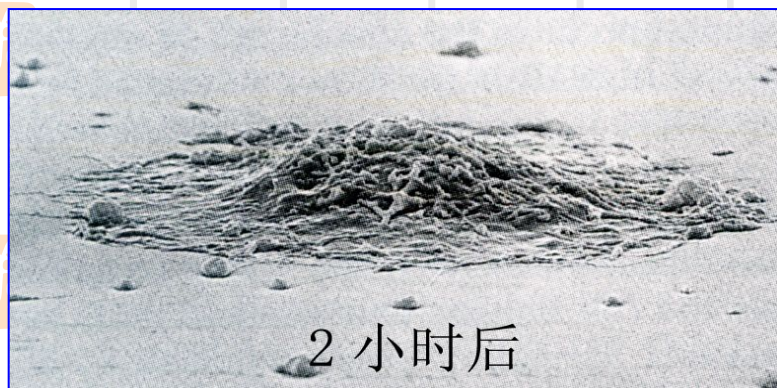
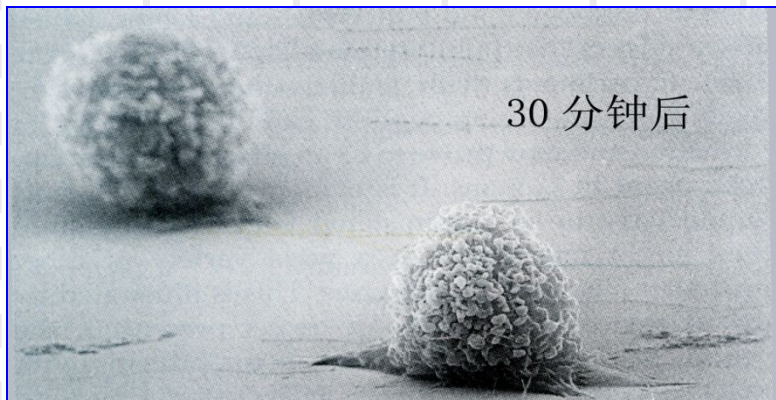
计数



培养

贴壁细胞的生长规律

吉祥如意



贴壁过程

原代培养实验操作

- 1、**分组操作**——小鼠细胞原代培养（组织块法和酶消化法，一个组一个超净工作台，两人操作，分别完成两种方法）
- **步骤：**处死——取材——切割——分两组分别进行组织块法和酶消化法
- 2、每天来实验室观察细胞长势，作好记录，拍照。
- 3、根据培养基和细胞生长状况换液。
- **4、不污染**