

吉祥

细胞培养的准备



本次课内容

- **掌握：**细胞培养无菌间的基本要求，各种相关设备的使用方法，培养器械清洗和消毒，用液灭菌的方法。
- **熟悉：**细胞培养用液的配制方法，血清的灭活方法，各种用液的分装和保存原则。
- **了解：**细胞培养准备阶段的重要性。

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。是广泛应用于医学研究领域的重要技术。

细胞培养的关键



- 1、无菌——核心
- 2、培养条件



一、细胞培养的必备设施

（一）无菌实验室

无菌室的结构：一般由更衣间、缓冲间、操作间三部分组成。

- 使用前，紫外照射（30分钟-1小时）；使用后可紫外照射10min左右；人员进出要更衣。
- 平时：每日用紫外照射1-2小时；每周甲醛、乳酸、过氧乙酸熏蒸（2小时）和每月新洁尔灭擦拭地面和墙壁一次的方式进行消毒。



无菌室

超净工作台使用流程和注意事项

- 1、使用前，70%（或75%）酒精擦拭，将培养用品从传递窗进入工作台（有菌的放进污物传递窗，特别检查酒精灯、棉球、镊子、废液缸；有生物活性的从冰箱中取出，放在洁净窗，复温）
- 2、开启超净台内紫外灯照射30min-50min，同时开启无菌间的紫外灯。
- 3、操作者准备：头、脸、手。进入无菌工作间，关超净工作台紫外灯，将实验其他用品拿进工作台。
- 4、开超净台日光灯和风机，预工作2-5min，以除去臭氧和使用工作台面空间呈净化状态；
- 5、使用时，任何中途进入超净工作台的物品必须用酒精消毒表面，包括操作者的手。
- 6、使用完毕后，要用酒精将台面和台内四周擦拭干净，并用紫外照射5分钟以上，以保证超净台无菌。

操作时



注意：物品要归类摆放，防止污染

- 1. 动作要轻，不能太快，以免搅动空气增加污染；玻璃器皿也应轻取轻放，以免破损污染环境
- 2. 操作应在近火焰区进行。
- 3. 接种环、接种针等金属器材使用前后均需灼烧
- 4. 工作结束，收拾好工作台上的样品及器材，最后用消毒液擦拭工作台。
- 5. 操作过程中，所有带进的器皿表面，必须擦拭。





Heraeus BB5060UVC02培养箱

(三) CO₂培养箱

- 通过在培养箱箱体内模拟形成一个类似细胞/组织在生物体内的生长环境，如稳定的温度（ $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ ）、稳定的CO₂水平（5%）、恒定的酸碱度（pH值：7.2-7.4）、较高的相对饱和湿度（95%），来对细胞/组织进行体外培养的一种装置。
- CO₂培养箱：水套式、气套式
- CO₂培养箱的灭菌：HEPA高效滤器能过滤培养箱内空气，可过滤除去99.97%的0.3um以上的颗粒



(三) **CO₂**培养箱

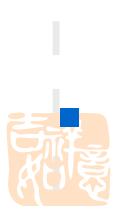
- 使用注意事项：

- 1、开关门人员手部需消毒、动作快速

- 2、培养物是开放培养。

- 3、定期向增湿盘中补充无菌水。

- 4、长期不使用，开机后必须有一定时间缓冲期，并用消毒液擦拭内表面。





低温（-20℃）冷藏冰柜



- 倒置显微镜
- 电热鼓风干燥箱
- 电子天平
- 恒温水浴箱
- 离心机
- 压力蒸汽消毒器
- 液氮储存罐





LS-B50L立式压力蒸汽灭菌器

液氮罐



吉祥

细胞培养常用器材和培养基

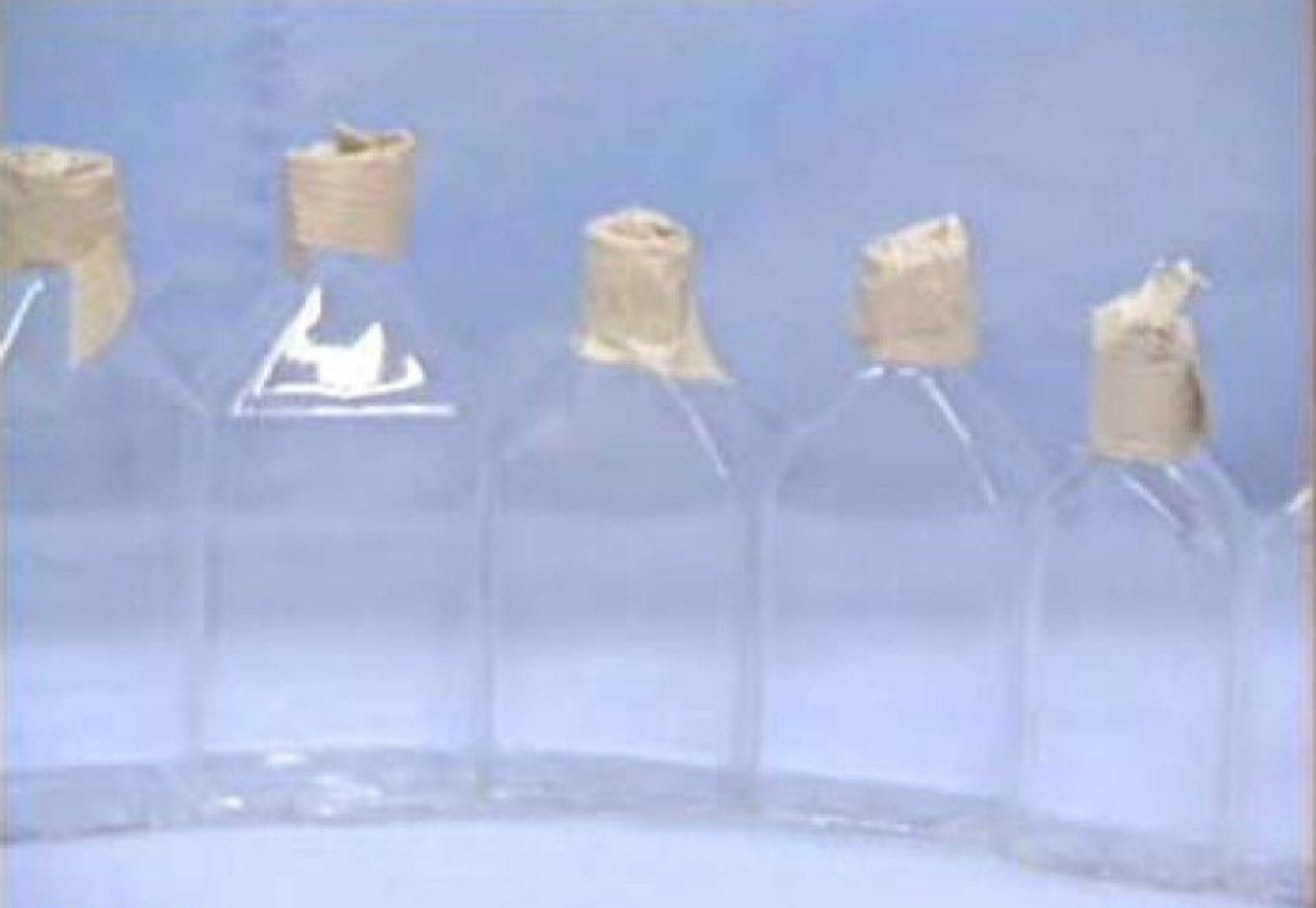




培养皿



滴流瓶



培养瓶



刻度吸管、离心管等



烧杯、量筒等

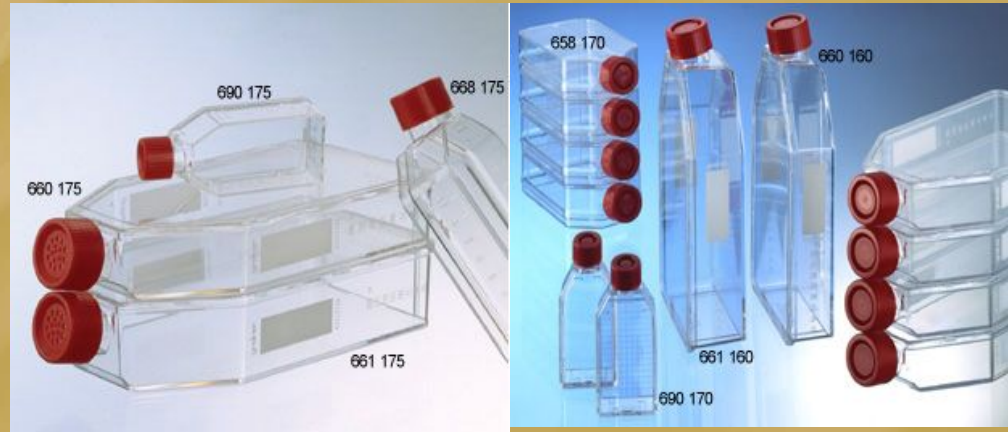
三角烧瓶



细胞培养的实验用品

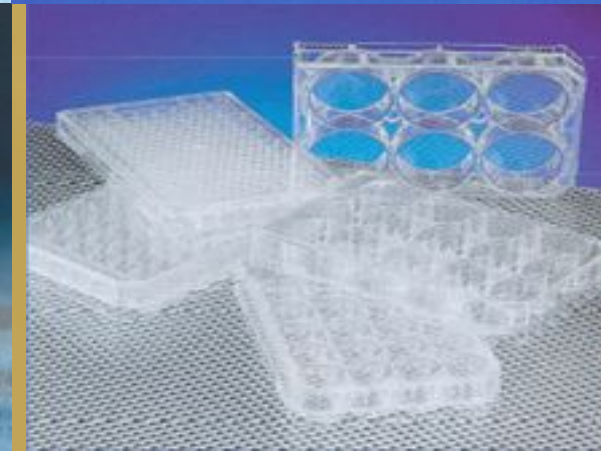
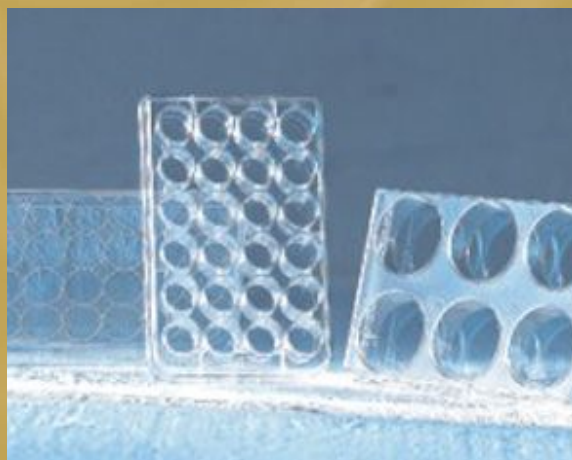
◆ 细胞培养瓶

- ◆ 25平方厘米，正方斜颈
- ◆ 25平方厘米，三角斜颈
- ◆ 75平方厘米，正方斜颈
- ◆ 75平方厘米，三角斜颈
- ◆ 150平方厘米，正方斜颈



◆ 细胞培养板

- ◆ 6孔,
- ◆ 12孔,
- ◆ 24孔,
- ◆ 48孔
- ◆ 96孔



- ◆ 细胞培养皿

- ◆ 35mm
- ◆ 60mm
- ◆ 100mm

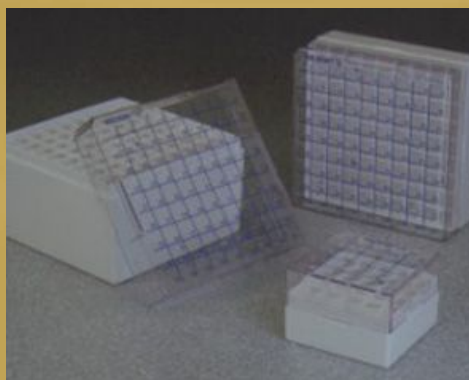


- ◆ 冻存管

- ◆ 1.2ml

- ◆ 2ml,

- ◆ 5ml



◆ 离心管

◆ 15ml

◆ 50ml

◆ 细胞刮



一、常用器材

一）玻璃器材

- 培养皿
- 滴流瓶
- 刻度吸管、离心管等
- 培养瓶
- 烧杯、量筒等
- 三角烧瓶

吉祥如意



(二) 金属器材



金属器材

二、细胞培养常用器材清洗方法

（一）玻璃器材的清洗处理方法

- 1、浸泡：自来水浸泡（新的器皿用5%盐酸浸泡，以中和碱性物质）；（**所有的器皿用过之后要及时浸泡**）
- 2、刷洗：毛刷和洗涤剂或洗衣粉刷洗，自来水冲数次，洗净，干燥。
- 3、清洁液浸泡（泡酸缸）：在酸缸（**洗液：浓硫酸+重铬酸钾+水；棕红色**）浸泡4h以上（通常过夜）
- 4、冲洗：自来水冲15-20次，洗净后再用蒸馏水漂洗**2-3**次，三蒸水漂洗**1**次，烤干，包装。
- **泡——刷——浸（酸）——洗**

检测玻璃器皿是否清洗干净的方法：装满水，瓶口向下，看水流成片还是成股

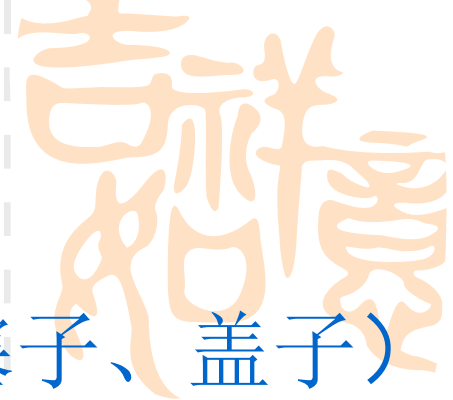
（二）塑料器材（容易出现划痕）的清洗处理方法

1、用流水冲洗浸泡，或**3%HCl**或**2%NaOH**溶液并浸泡过夜（单用或交叉处理）

2、纱布或棉签沾清洁液刷洗；

3、水洗，晾干后浸泡如清洁液中15分钟以上

4、流水冲洗（15-20遍），蒸馏水润洗三次，晾干备用



(三) 橡皮器材（各种瓶或试管的塞子、盖子）

- 1、使用后浸泡在清水中，刷洗。
- 2、5%NaOH煮15分钟，水洗，
- 3、4%盐酸煮，水洗8~10次，
- 4、自来水煮2分钟，蒸馏水煮20分钟，
- 5、50度烤干备用。



(四) 金属器材（剪刀、镊子、手术刀、解剖刀、血管钳、组织镊、眼科镊及各种型号针头等）

擦去表面的油脂，洗衣粉煮沸，或用
1%碳酸氢钠煮沸15分钟，水洗，蒸馏水
润洗， **95%酒精**纱布擦干，包装灭菌

二、灭菌

- 1、实验用玻璃器皿以铝箔纸或**双层牛皮纸**包覆瓶盖，吸管、培养瓶、手术器械等置饭盒内，以及一般液体（**注意通气性**），**高压蒸汽灭菌**121℃, 20-30 分钟，烘干。
- 2、实验用玻璃器皿也可以**干热灭菌**160-170℃, 4 小时。
- 3、**紫外线消毒**：房间、台面、以及一些不能经高温的物品
- 4、**过滤除菌**：**具有活性的液体**，**0.22um**的微孔滤膜滤器过滤
- 5、**火焰消毒**：部分金属器皿，如接种针等
- 6、**新洁尔灭**：台面、皮肤等

滤 器

大多数培养用液，如人工合成培养基、血清、酶液等均采用滤过法除菌。

有Zeiss滤器、玻璃滤器、微孔滤膜滤器

滤膜使用：推荐0.22 μm 和0.45 μm 各一张





细胞培养液

- ◆ 水
- ◆ 平衡盐溶液
- ◆ pH调节液
- ◆ 消化液
- ◆ 抗生素溶液
- ◆ 培养基

细胞培养用液的配制

水：新鲜配置的三蒸水或去离子水

平衡盐溶液

- ◆ 主要由无机盐和葡萄糖配制而成
- ◆ 作用： 维持渗透压、缓冲和调节酸碱度。 常用于洗涤组织和细胞等

- ◆ 常用的缓冲液

生理盐水

PBS

Hanks液

（D-Hank's常用于配制胰酶溶液）

消化液

(1) 胰蛋白酶溶液

主要作用是使细胞间的蛋白质水解，从而使贴壁细胞从瓶壁上脱落并使细胞游离分散开来

常用浓度为**0.25%或0.5%**胰蛋白酶。

(2) EDTA溶液

作用机制是破坏细胞间的连接。

对于一些贴壁特别牢固的细胞，可用**EDTA**和胰酶的混合液

EDTA溶液的使用浓度为**0.02%**，配制时应加碱助溶

(3) 胶原酶溶液

胶原酶在上皮类细胞原代培养时经常使用，胶原酶作用的对象是胶原组织，因此不容易对细胞产生损伤。

培养基

- ◆ 分天然培养基和合成培养基

- ◆ 天然培养基：

血清

血浆

组织提取液（如鸡胚和牛胚浸液）

合成培养基

- ◆ 根据细胞生存所需物质的种类和数量，用人工方法模拟合成的。
- ◆ 包括四大类物质：无机盐、氨基酸、维生素、碳水化合物
- ◆ 目前常用培养基：**RPMI-1640、DMEM、TC199、MEM、**
- ◆ 另有无血清培养基、无蛋白培养基

干粉培养基的配制

- ◆ 认真阅读说明书。说明书都注明干粉不包含的成分，常见的有**NaHCO₃**、谷氨酰胺、丙酮酸钠、**HEPES**等。这些成分有些是必须添加的，如**NaHCO₃**、谷氨酰胺，有些根据实验需要决定。
- ◆ 配制是要保证充分溶解，**NaHCO₃**、谷氨酰胺等物质都要等培养基完全溶解之后才能添加。
- ◆ 配制所用的水应是三蒸水，离子浓度很低。
- ◆ 所用器皿应严格消毒。
- ◆ 配制好的培养基应马上过滤，无菌保存于4度。



- 液体培养基分装后贮存于4℃ 冰箱，避免光照，实验进行前放在37℃ 水槽中温热。
- 一般使用前加血清
- 液体培养基(加血清) 存放期为六个月，期间 **glutamine** 可能会分解，若细胞生长不佳，可以再添加适量glutamine(0.002mol/L)。



培养基中的pH缓冲液

(1) 碳酸氢钠液

(2) **Hepes**缓冲液：是一种可以保持细胞培养过程中pH值较长时间稳定的氢离子缓冲剂

通常使用浓度为10~15mM

培养基的pH调节

- 1、培养基pH要求：7.2-7.4；
- 2、配制好后调节，比最后要求约低0.2，因为过滤以后会上升。
- 3、用1N氢氧化钠或者1N盐酸调节。

争论：加血清前调节还是加血清后调节？
(血清偏酸、血清无菌、血清很难过滤)

抗生素溶液

- ◆通常是**青霉素**和**链霉素**联合使用，俗称“双抗溶液”。
- ◆青霉素主要是对革兰阳性菌有效，链霉素主要对革兰阴性菌有效。加入这两种抗生素可预防绝大多数细菌污染。

培养基内青霉素最终使用浓度**100U/ml**，链霉素

庆大霉素：每毫升**100单位**

(三) 血清

- **种类:** 牛（小牛、新生牛、胎牛）、马、人等
- 血清一般贮存于-20 ~ -70℃，若存放于4℃，请勿超过一个月。
- 需分装、避免反复冻融。使用浓度：5-20%，通常10%
- **血清解冻步骤(逐步解冻法):** -20℃或-70℃至4℃冰箱溶解一天，至室温下全溶后再分装，一般以50 ml 无菌离心管可分装40~45 ml。
勿直接由-20℃直接至37℃解冻，因温度改变太大，容易造成蛋白质凝结而发生沉淀。
- 一般厂商提供之血清为无菌，不需再无菌过滤。若发现血清有许多悬浮物，则可将血清加入培养基内一起过滤，**勿直接过滤血清**。



■ 灭活 (heat-inactivation)

是指56℃， 30分钟加热已完全解冻之血清。加热过程中须规则摇晃均匀。此热处理之目的是使血清中之补体成份 (complement) 去活化。除非必须，一般不建议作此热处理。



实验内容



- 领培养用品：全班分12组
- 各组自行安排时间，清洗用品，消毒灭菌（本周——下周）
- 注意：先把血清瓶（试剂瓶清洗出来），自行配试剂，并消毒灭菌
- 推荐参考书：《细胞培养》司徒镇强，世界图书出版社
- 预习：细胞原代培养、传代培养

