

原代细胞培养和传代培养的方法

原代培养

原理

将动物机体的各种组织从机体中取出,经各种酶(常用胰蛋白酶)、螯合剂(常用 EDTA)或机械方法处理,分散成单细胞,置合适的培养基中培养,使细胞得以生存、生长和繁殖,这一过程称原代培养。

仪器、材料及试剂

仪器:培养箱(调整至 37℃),培养瓶、青霉素瓶、小玻璃漏斗、平皿、吸管、移液管、纱布、手术器械、血球计数板、离心机、水浴箱(37℃)

材料:动物组织块

试剂:1640 培养基(含 20%小牛血清),0.25%胰酶,Hank's 液,碘酒

初代消化培养法

1. 准备:取各种已消毒的培养用品置于净化台面,紫外线消毒 20 分钟。开始工作前先洗手、75%酒精擦拭手至肘部。
2. 布局:点燃酒精灯,安装吸管帽。
3. 处理组织:把组织块置于烧杯中,用 Hanks 液漂洗 2~3 次,去除血污;如怀疑组织可能污染,可先置于含有青链霉素的混合液中 30~60 分钟。
4. 剪切:用眼科剪把组织切成 2~3 毫米大小的块,以便于消化。加入比组织块总量多 30~50 倍的胰蛋白酶液,然后一并倒入三角烧瓶中,结扎瓶口或塞以胶塞。
5. 消化:或用恒温水浴,或置于 37℃温箱消化均可,消化中每隔 20 分钟应摇动一次,如用电磁恒温搅拌器消化更好。消化时间依组织块的大小和组织的硬度而定。
6. 分离:在消化过程中见消化液发混浊时,可用吸管吸出少许消化液在镜下观察,如组织

已分散成细胞团或单个细胞，立即终止消化，随即通过适宜不锈钢筛，滤掉尚未充分消化开的组织块。低速（500~1000 转/分）离心消化液 5 分钟，吸出上清，加入适量含有血清的培养液。

7. 计数：用计数板计数，如细胞悬液细胞密度过大，再补加培养液调整后，分装入培养瓶中。对大多数细胞来说，pH 要求在 7.2~7.4 范围，培养液呈微红色，如颜色偏黄，说明液体变酸，可用 NaHCO_3 调整。

8. 培养：置于 36.5℃ 温箱培养，如用 CO_2 温箱培养，瓶口需用纱布棉塞或螺旋帽堵塞，纱布塞易生霉菌，每次换液时需要换新塞。

初代组织块培养法

1. 剪切：把组织小块置于小烧杯或青霉素小瓶中，用 Hanks 液漂洗二三次以去掉表面血污，吸静 Hanks 液，用眼科剪反复剪切 1mm³ 块为止。

2. 摆布：用弯头吸管吸取若干小块，置于培养瓶中，用吸管弯头把组织小块摆布在培养瓶底部，小块相互距离以 0.5cm 为宜，每一 25ml 培养瓶底可摆布 20~30 块。

3. 轻轻翻转培养瓶，另瓶底向上，注意翻瓶时勿另组织小块流动，塞好瓶塞，置 36.5℃ 温箱培养 2 小时左右（勿超过 4 小时），使小块微干涸。

4. 培养：从微箱中取出培养瓶，开塞，46 度斜持培养瓶，箱瓶底脚部轻轻注入培养液少许，然后缓缓再把培养瓶翻转过来，让培养液慢慢覆盖附于瓶地上的组织小块。置温箱中静止培养。待细胞从组织块游出数量增多后。再补加培养液。

传代培养法

原理

细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本上饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就必须进行传代（再培养）。传代培养也是一种将细胞种保存下去

的方法。同时也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。悬浮型细胞直接分瓶就可以，而贴壁细胞需经消化后才能分瓶。

材料和试剂

1. 细胞：贴壁细胞株
2. 试剂：0.25%胰酶、1640 培养基（含 10%小牛血清）
3. 仪器和器材：倒置显微镜，培养箱、培养瓶、吸管、废液缸等

操作步骤

1. 吸除培养瓶内旧培养液。
2. 向瓶内加入胰蛋白酶和 EDTA 混合液少许，以能覆满瓶底为限。
3. 置温箱中 2~5 分钟，当发现细胞质回缩，细胞间隙增大后，立即终止消化。
4. 吸除消化液，向瓶内注入 Hanks 液数毫升，轻轻转动培养瓶，把残余消化液冲掉。注意加 Hanks 液冲洗细胞时，动作要轻，以免把已松动的细胞冲掉流失，如用胰蛋白酶液单独消化，吸除胰蛋白酶液后，可不用 Hanks 液冲洗，直接加入培养液。
5. 用吸管吸取营养液轻轻反复吹打瓶壁细胞，使之从瓶壁脱离形成细胞悬液。
6. 计数板计数后，把细胞悬液分成等份分装入数个培养瓶中，置温箱中培养。

无菌操作注意事项

1. 操作前要洗手，进入超净台后手要用 75%酒精或 0.2%新洁尔灭擦试。试剂等瓶口也要擦试。
2. 点燃酒精灯，操作在火焰附近进行，耐热物品要经常火焰上烧灼，金属器械烧灼时间不能太长，以免退火，并冷却后才能夹取组织，吸取过营养液的用具不能再烧灼，以免烧焦形成碳膜。
3. 操作动作要准确敏捷，但又不能太快，以防空气流动，增加污染机会。

4. 不能用手触已消毒器皿的工作部分，工作台面上用品要布局合理。
5. 瓶子开口后要尽量保持 45°斜位。
6. 吸溶液的吸管等不能混用。