

细胞原代培养、传代培养、冻存和复苏

1 实验原理

细胞培养可分为原代培养和传代培养。直接从体内获取的组织细胞进行首次培养为原代培养；当原代培养的细胞增殖达到一定密度后，则需要做再培养，即将培养的细胞分散后，从一个容器以 1: 2 或其他比率转移到另一个或几个容器中扩大培养，为传代培养，传代培养的累积次数就是细胞的代数。

细胞冻存及复苏的基本原则是慢冻快融，实验证明这样可以最大限度的保存细胞活力。目前细胞冻存多采用甘油或 DMSO 作保护剂，这两种物质能提高细胞膜对水的通透性，加上缓慢冷冻可使细胞内的水分渗出细胞外，减少细胞内冰晶的形成，从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。

2 实验方法

一：材料

小鼠，生理盐水，100ml 灭菌烧杯，15ml 离心管，培养皿，滴管，无菌镊子、剪刀，筛网，泡沫板，大头针，酒精灯，培养瓶，培养液，PBS，0.25%胰酶，超净工作台、二氧化碳培养箱、倒置显微镜，显微镜，计数板，离心机，恒温水浴箱，冰箱（4℃、-20℃、-70℃），液氮罐，冻存管，冻存液，废液缸等。

二：方法

（1）原代培养：

1.取出小鼠后沥干酒精，放入超净台内，固定在泡沫板上。

2.用镊子提起皮肤，用解剖剪剪开皮肤一个横切口，将皮肤向上撕开，然后剪开肌肉等，暴露出腹腔，在左侧找到脾脏，用弯头眼科镊取出脾脏，置于无菌培养皿中。

3.用生理盐水将取出的脾脏清洗多次，并剔除多余无用的组织。

4.将筛网置于平皿中，脾脏置于筛网上，用弯头镊镊住，轻轻在筛网上进行碾磨，同时不停滴加不含血清的培养液冲洗。

5.将碾磨好的细胞悬液吸入至离心管中，离心(1000rpm,5min)，吸去上清（去除血液等）。

6.加入 10ml 培养液，吹打混匀，取样计数。

7.将稀释好的细胞悬液分装于培养瓶中，轻轻摇晃混匀，在培养瓶上。

面做好标志，注明细胞、组别及日期。然后将培养瓶置于二氧化碳培养箱中培养。

(2) 传代培养：

1.倒置显微镜下观察细胞形态，确定细胞是否需要传代。

2.培养液瓶打开后，过酒精灯火焰，置酒精灯火焰周围。

3.拿出直头滴管，套上橡皮吸头，过火，放入培养液瓶中。

4.打开培养瓶，瓶口过火，将培养瓶内的培养液轻轻倒入废液缸，用 2-3ml PBS 洗去残留的旧培养基。

5.培养瓶加入 0.25%胰酶，用量以薄薄盖满一层为宜，37℃消化，倒置显微镜下观察到细胞收回突起变圆时立即翻转培养瓶，使细胞脱离胰酶，然后将胰酶倒掉，加入少量的含血清的新鲜培养基。

6.取弯头滴管反复吹打细胞使其脱壁并分散，再根据分传瓶数补加一定量的含血清的新鲜培养基，制成细胞悬液，然后分装到新培养瓶中。盖上瓶盖，适度拧紧后再稍回转，以利于 CO₂ 气体的进入，将培养瓶放回 CO₂ 培养箱。

7.对半贴壁培养细胞，不需胰酶，直接吹打，加入新鲜培养基，然后分装到各瓶中。

(3) 冻存:

1.吸取传代后的细胞悬液，离心，去除培养液，加入冻存液，分装冻存管（冻存管内细胞数目一般为 $(5 \sim 10) \times 10^6$ 个/ml，2ml 冻存管中一般放 1 ~ 1.5ml 细胞）。

2.按步冻存

o 冷冻保存方法一：标准的冻存程序为降温速率-1 ~ -2°C/min；当温度达-25°C以下时，可增至-5 ~ -10°C/min；到-100°C时，则可迅速浸入液氮中。

o 冷冻保存方法二：冷冻管置于已设定程序之程序降温机中每分钟降 1 ~ 3°C至-80°C以下，再放入液氮长期保存。

(4) 复苏:

1.取出冷冻管，立即放入 37°C水浴箱中快速解冻，轻摇冷冻管使其在 1 分钟内全部融化，移入无菌操作台内。

2.打开冻存管，将细胞悬液吸到离心管中。

3.1000rpm 离心 10 分钟，弃去上清液。

4.加适当培养液后将细胞转移至培养瓶中，37°C培养，第二天观察生长情况。

3 实验结果计算

1.一只小鼠可获得 $(1 \sim 2.5) \times 10^8$ 个脾细胞。

2.细胞接种后一般几小时内就能贴壁，并开始生长，如接种的细胞密度适宜，5 天到一周即可形成单层。

3.一般情况，传代后的细胞在 2 小时左右就能附着在培养瓶壁上，2 ~ 4 天就可在瓶内形成单层，需要再次进行传代。

4 注意事项

- 1.取材要求新鲜，无菌，解剖小鼠时，注意不要损伤脾脏及其周围的脏器，尤其是肠道等，防止污染脾脏。
- 2.冲洗脾脏时要尽量洗净血污，去除无用组织，并要防止组织干燥。
- 3.碾磨后及时用清水冲洗筛网，防止组织、细胞阻塞网孔。
- 4.计数前，注意吸尽平皿里的细胞，充分混匀，使细胞分散成单个细胞。
- 5.实验操作应在操作台中央无菌区域内进行，勿在边缘非无菌区域操作。
- 6.金属器械不能在火焰中烧的时间过长，烧过的金属镊要待冷却后才能挟取组织，以免造成组织损伤。
- 7.另外胶塞过火焰时也不能时间长，以免烧焦产生有毒气体，危害培养细胞。
- 8.吸取过营养液后的吸管不能再用火焰烧灼，因残留在吸管头中营养液能烧焦形成炭膜，再用时会把有害物带入营养液中。
- 9.不能用手触及已消毒器皿瓶口、瓶塞内部，吸管前部等所有可能与细胞接触的部分，如已接触，要用火焰烧灼消毒或取备品更换。
- 10.开启、关闭长有细胞的培养瓶时，火焰灭菌时间要短。防止因温度过高烧死细胞。
- 11.换液时倾倒废液，瓶口不能接触废液缸，速度不能过快，防止废液四溅。
- 12.吹打细胞时，要注意边角的细胞是否吹打下来。
- 13.手或相对较脏的物品不能经过开放的瓶口上，即不可以在开放容器上方操作。
- 14.每次操作只处理一株细胞，以免造成细胞交叉污染。
- 15.注意自身的安全，对于来自人源性或病毒感染的细胞株应特别小心。操作过程中，应避免引起气溶胶的产生，小心有毒性试剂例如 DMSO，并避免尖锐物品伤人等。

16.从增殖期到形成致密的单层细胞以前的培养细胞都可以用于冻存，但最好为对数生长期细胞。在冻存前一天最好换一次培养液。

17.将冻存管放入液氮容器或从中取出时，要做好防护工作，以免冻伤。

18.冻存和复苏最好用新配制的培养液。