

动物细胞培养大全

<http://emuch.net/bbs/>

• 小木虫经典出品 (C) emuch.net

细胞培养基本条件.....	4
细胞培养基种类与基本成分.....	5
液体培养基保存:	8
血清.....	8
细胞培养环境	10
1、实验室设计.....	10
2、常用设施及设备.....	11
3、培养器皿.....	11
4、细胞培养温度.....	13
5、合适的气体环境.....	13
细胞培养无菌操作基本技术.....	14
工作环境的处理	14
细胞培养所用玻璃及塑料制品的清洗与消毒.....	16
消毒	19
常用物品消毒压力及时间:	20
细胞培养的污染及控制.....	21
1) 污染的类型.....	21
一、细菌污染.....	21
二、真菌污染.....	21
三、支原体污染.....	21
四、病毒污染.....	22
(2) 污染来源及鉴别.....	22
一、污染来源.....	22
二、污染的鉴别.....	23
(3) 污染的清除和预防.....	24
一、污染的清除.....	24
二、污染的预防.....	24
培养细胞的冷冻保存与复苏.....	25
■ 概述.....	26
■.....冷冻保存与复苏原理	27
◆ 冷冻速率.....	28
◆ 冷冻保存温度.....	29
◆ 复苏速率.....	30
◆ 冷冻保护剂.....	30
■..... 冷冻保存方法	31
◆ 非玻璃化冻存方法.....	32
◇ 主要材料	32
◇ 操作过程.....	32

◇ 冻存结果	33
◇ 讨论	34
◆ 玻璃化冻存方法	34
◇ 主要材料	34
◇ 冻存过程	35
◇ 冻存结果	36
◇ 讨论	36
■..... 冻存细胞的复苏	36
◆ 非玻璃化冻存的复苏方法	36
◇ 主要材料	36
◇ 复苏过程	37
◇ 结果	37
◇ 讨论	37
■..... 玻璃化冻存的复苏方法	38
◇ 主要材料	38
◇ 操作过程	38
◇ 结果	39
◇ 讨论	39
细胞培养常见问题及回答	39
如何选用特殊细胞系培养基?	39
L-谷氨酰胺在细胞培养中重要吗? 它在溶液中不稳定吗?	40
GlutaMAX-I是什么? 培养细胞如何利用GlutaMAX-I? 这个二肽有多稳定?	40
什么培养基中可以省去加酚红?	40
如何用台盼兰计数活细胞?	41
如何消除组织培养的污染?	41
Tech tips.....	46
细胞培养从头学	47
常用设备.....	47
无菌操作.....	47
玻璃器械洗消:	48
一、新的玻璃器皿的洗消:	48
细胞培养用液的配制与消毒.....	50
一. 水的制备.....	50
二.PBS的制备与消毒(也可用于其它BSS, 如: Hanks, D-Hanks液的配制):	50
三. 胰蛋白酶溶液的配制与消毒:	50
四.青、链霉素溶液的配制于消毒.....	50
五.RPMI1640 的制备与消毒:	50
六. 血清的灭活:	51
七.HEPES溶液:	51
八.谷氨酰胺:	51
九.肝素溶液的配制:	52
十. I 型胶原酶:	52
十一.明胶溶液:	52
注意事项:	52
细胞传代培养(消化法)	52
一. 传代前准备:	53

二.胰蛋白酶消化:	53
三.吹打分散细胞:	53
四.分装稀释细胞:	53
五.继续培养:	54
传代细胞培养注意事项:	54
细胞的复苏.....	54
细胞计数.....	55
细胞的冻存.....	57
细胞培养技术中的关键因素.....	58
上皮细胞培养	59
1) 表皮细胞培养.....	59
2) 乳腺组织培养.....	59
3) 胃上皮细胞培养.....	60
4) 肝细胞培养.....	60
5) 内皮细胞培养.....	61
6) 毛细血管内皮细胞培养.....	61
神经组织细胞培养.....	62
结缔组织类细胞培养.....	63
1) 成纤维细胞培养.....	63
2) 巨噬细胞培养.....	63
肌组织细胞培养	63
1) 骨骼肌细胞培养.....	63
2) 肌细胞培养.....	64
细胞凋亡的几种检测方法.....	64
一、形态学观察方法.....	64
二、DNA凝胶电泳	64
三、酶联免疫吸附法 (ELISA)核小体测定	65
四、流式细胞仪定量分析.....	65
■检测细胞膜成分变化的Annexin V 联合PI法.....	66
培养细胞染色体显示法.....	67
1) 传代培养细胞染色体显示法.....	67
2) 人末梢血微量全血培养染色体显示法.....	67
3) 羊水细胞培养.....	68
特殊培养法	68
1) 二倍体细胞培养法.....	68
2) 支持物培养法.....	69
3) 细胞分离(克隆)培养.....	69
4) 球体细胞培养.....	70
5) 微载体细胞培养法.....	70
6) 悬浮培养法.....	71
实验室常用细胞目录.....	71
细胞目录大全	76
人类组织正常及永生化细胞.....	76
人类组织肿瘤细胞.....	78
动物组织正常及永生化细胞.....	81
动物组织肿瘤细胞.....	83

细胞培养基本条件

1、合适的细胞培养基

合适的细胞培养基是体外细胞生长增殖的最重要的条件之一，培养基不仅提供细胞营养和促使细胞生长增殖的基础物质，而且还提供培养细胞生长和繁殖的生存环境。

2、优质血清

目前，大多数合成培养基都需要添加血清。血清是细胞培养液中最重要成分之一，含有细胞生长所需的多种生长因子及其它营养成分。

3、无菌无毒细胞培养环境

无菌无毒的操作环境和培养环境是保证细胞在体外培养成功的首要条件。在体外培养的细胞由于缺乏对微生物和有毒物的防御能力，一旦被微生物或有毒物质污染，或者自身代谢物质积累，可导致细胞中毒死亡。因此，在体外培养细胞时，必须保持细胞生存环境无菌无毒，及时清除细胞代谢产物。

4、恒定的细胞生长温度

维持培养细胞旺盛生长，必须有恒定适宜的温度。

5、合适的气体环境

气体是哺乳动物细胞培养生存必需条件之一，所需气体主要有氧气和二氧化碳。

细胞培养基种类与基本成分

细胞培养基的种类很多，按其来源分为合成培养基和天然培养基（目前使用的培养基绝大部分是合成培养基），按其物质状态分为干粉培养基和液体培养基两类。干粉培养基需由实验者自己配制并灭菌，液体培养基由专业商家提供，用户可直接使用，非常方便。

1、合成培养基的主要成分有：氨基酸、碳水化合物、无机盐、维生素及其它辅助物质：

氨基酸

氨基酸是组成蛋白质的基本单位。不同种类的细胞对氨基酸的要求各异，但有几种氨基酸细胞自身不能合成，必须依靠培养液提供，这几种氨基酸称为必需氨基酸。其中谷氨酰胺是细胞合成核酸和蛋白质必需的氨基酸，在缺少谷氨酰胺时，细胞生长不良而死亡。因此，各种培养液中都有较大量的谷氨酰胺。但是，由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定，应置于-20℃冰箱中保存，在使用前加入培养液内。已含谷氨酰胺的培养液在4℃冰箱中储存2周以上时，还应重新加入原来量的谷氨酰胺。

碳水化合物

碳水化合物是细胞生长主要能量来源，其中有的是合成蛋白质和核酸的成分。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸等。

无机盐

培养液中无机盐的主要功能是帮助细胞维持渗透压平衡。此外，通过提供钠，钾和钙离子，帮助细胞调节细胞膜功能。培养液的渗透压是一个非常重要的因素，细胞通常可耐受 260mOsm/kg ~ 320 mOsm/kg。标准培养液的渗透压在此范围内波动。特别注意：向培养液中加入其它物质有可能会明显改变培养液的渗透压，特别是溶于强酸或强碱中的物质。向培养液中添加 HEPES 时需按以下方法调节钠离子浓度。

缓冲系统

大多数细胞所需 pH 在 7.2 - 7.4。但是，细胞培养最适 pH 值随培养的细胞种类不同而不同。成纤维细胞喜欢较高 pH (7.4 - 7.7)，而传代转化细胞系则需要偏酸 pH (7.0 - 7.4)。

由于多数培养液靠碳酸氢钠 (NaHCO_3) 与 CO_2 体系进行缓冲，因此，气相中的 CO_2 浓度应与培养液中碳酸氢钠浓度相平衡。如果气相或培养箱空气中 CO_2 浓度设定在 5%，培养液中 NaHCO_3 的加

入量为 1.97g/L；如果 CO₂ 浓度维持在 10%，培养液中 NaHCO₃ 的加入量为 3.95g/L。

细胞培养瓶盖不应拧得太紧，以保证气体交换。HEPES 是一种非离子缓冲液，在 pH 7.2 - 7.4 范围内具有较好的缓冲能力，但是非常昂贵，在高浓度时对一些细胞可能有毒。HEPES 缓冲液可与低水平的碳酸钠（0.34g/L）共用，以抵消因额外加入 HEPES 引起的渗透压增加。在这种培养条件下，细胞培养瓶的盖子应拧紧，以防止培养液中所需的少量碳酸盐散入空气中。大多数培养液中含有酚红作为 pH 指示剂，酸性培养液呈橙黄色，碱性培养液呈深红色。

维生素

在细胞培养中，尽管血清是维生素重要来源，但是许多培养基中添加了各种维生素以适合更多的细胞系生长。

其它成分

在一些较为复杂的培养液中还包括其它一些成分。如在杂交瘤技术中常用的 DMEM 培养液，使用时还需要补加丙酮酸钠和 2-巯基乙醇（2-Mercaptoethanol, 2-Me）。2-Me 对细胞生长有很重要的作用。有人认为它相当于胎牛血清，有直接刺激细胞增殖作用。2-Me

的活性部分是硫氢基，其中一个重要作用是使血清中含硫的化合物还原成谷胱甘肽，能诱导细胞的增殖，为非特异性的激活作用。同时避免过氧化物对培养细胞的损害。另一个重要作用是促进分裂原

的反应和 DNA 合成,增加植物凝集素(PHA)对淋巴细胞的转化作用,已广泛应用于杂交瘤技术,另外,也开始用于一些难以培养的细胞。2-Me 是一种小分子还原剂,极易氧化。分子量为 78.13,纯的 2-Me 是一种无色有刺激味的液体,比重为 1.110-1.120(D₂₀),常用终浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 。常配制成 0.1M 的储存液,用时每升培养液加 0.5ml。

液体培养基保存:

液体培养基应于 4℃冰箱避光保存,实验前放入 37℃预热。未加血清液体培养基有效期为 12 个月。液体培养基中的 L-谷氨酰胺会随着储存时间的延长而慢慢分解。如果细胞生长不良,可以再添加适量 L-谷氨酰胺。

干粉培养基保存:

4℃冰箱避光保存,有效期 36 个月。

血清

细胞培养液中添加的血清有牛血清、马血清、人血清等,其中牛血清是最常用的血清,分为胎牛血清和新生小牛血清。胎牛血清是从母牛破腹取出的胎牛中分离出的血清,价格昂贵。新生小牛血清是

从刚出生的尚未哺乳的小牛中分离出来的血清，如厂家能做到这一点，新生小牛血清的质量与胎牛血清的质量相差不大。如小牛出生后已哺乳，从这种小牛中取出的血清中可能含有较多的生物活性物质，其质量明显不如前两种。

血清的质量，种类及使用的浓度都有可能影响细胞的生长，而不同批次的血清支持细胞生长的能力也不同，尤其是对克隆细胞的生长，某些批次血清可能含有毒性或抑制细胞生长的物质。因此，在购买大量血清之前，必须对血清支持细胞生长能力进行检测，然后再大量购买质量好的同一批号的血清，并注意以下几点：

(1) 需要长期保存的血清必须储存于 -20°C - 70°C 低温冰箱中。 4°C 冰箱中保存时间切勿超过 1 个月。由于血清结冰时体积会增加约 10%，因此，血清在冻入低温冰箱前，必须预留一定体积空间，否则易发生污染或玻璃瓶冻裂。

(2) 一般厂商提供的血清为无菌，无需再过滤除菌。如发现血清有悬浮物，则可将血清加入培养液内一起过滤，切勿直接过滤血清。

(3) 瓶装血清解冻需采用逐步解冻法： -20°C 至 -70°C 低温冰箱中的血清放入 4°C 冰箱中溶解 1 天。然后移入室温，待全部溶解后再分装。在溶解过程中需不断轻轻摇晃均匀（小心勿造成气泡），使温度与成分均一，减少沉淀的发生。切勿直接将血清从 -20°C 进入 37°C 解冻，这样因温度改变太大，容易造成蛋白质凝集而出现沉淀。

(4) 热灭活是指 56°C ，30 分钟加热已完全解冻的血清。加热过程中须规则摇晃均匀。此热处理的目的是使血清中的补体成分（complement）灭活。除非必须，一般不建议作此热处理，因为热处理会造成血清沉淀物显著增多，而且还会影响血清的质量。补体

参与反应有：细胞毒作用，平滑肌细胞收缩，肥大细胞和血小板释放组胺，增强吞噬作用，促进淋巴细胞和巨噬细胞发生化学趋化和活化。

（5）切勿将血清在 37℃ 放置太久，否则血清会变得浑浊，同时血清中的有效成分会破会而影响血清质量。

（6）血清中的沉淀物絮状物：主要是血清中的脂蛋白变性及解冻后血清中纤维蛋白造成，这些絮状物不会影响血清本身的质量。可用离心 3000rpm，5 分钟去除，也可不用处理。

显微镜下“小黑点”：经过热处理过的血清，沉淀物的形成会显著增多。有些沉淀物在显微镜下观察象“小黑点”，常误认为血清受污染。一般情况下，此小黑点不会影响细胞生长，但如果怀疑血清质量，则应立即停止使用，更换另一批号的血清。

细胞培养环境

1、实验室设计

细胞培养是一种无菌操作技术，要求工作环境和条件必须保证无微生物污染和不受其它有害因素的影响。细胞培养室和设计原则是防止微生物污染和有害因素影响，要求工作环境清洁、空气清新，干燥和无烟尘。细胞培养室的设计原则一般是无菌操作区设在室内较少走动的内侧，常规操作和封闭培养于一室，而洗刷消毒在另一室。

2、常用设施及设备

(1) 超净工作台：也称净化工作台，分为侧流式、直流式和外流式三大类。

(2) 无菌操作间：一般由更衣间、缓冲间和操作间三部分组成。操作间放置净化工作台及二氧化碳培养箱、离心机、倒置显微镜等。缓冲间可放置电冰箱、冷藏器及消毒好的无菌物品等。

(3) 操作间：普通培养箱、离心机、水浴锅、定时钟、普通天平及日常分析处理物

(4) 洗刷消毒间：烤箱、消毒锅、蒸馏水处理器及酸缸等。

(5) 分析间：显微镜、计算机及打印机等。

3、培养器皿

常用细胞培养器皿有培养瓶、培养板、培养皿等。常准备量是使用量的三倍。器皿应选择透明度好、无毒、利于细胞粘附和生长的材

料，常用一次性聚苯乙烯材料制品或中性硬度玻璃制品。常用的器皿有下面几种。

(1) 液体储存瓶：用于储存各种配制好的培养液、血清等液体，常用规格有 500ml、250ml、100ml 等几种。

(2) 培养瓶：根据培养细胞种类要求不同培养瓶的形态各异，用于细胞传代培养的细胞要求瓶壁厚簿均匀，便于细胞贴壁生长和观察，瓶口要大小一致，口径一般不小于 1cm，允许吸管伸入瓶内任何部位，规格有 200ml、100ml、50ml、25ml、10ml 等几种。

(3) 培养皿：用于开放式培养及其它用途。分直径 30mm、60mm、120mm 等几种。

(4) 吸管：常用的有长吸管和短吸管两类，长吸管也称刻度吸管。其改良后管上部有球型刻度称改良吸管，刻度吸管用于移动液体。常用 1ml 和 10ml 两种。短吸管也叫滴管，分弯头和直头两种。

(5) 离心管：离心管是细胞培养中使用最广泛的器皿，根据用途不同形态各样，常用于细胞培养的离心管有大腹式尖底离心管和普通尖底离心管两类。前者分别为 50ml、30ml、15ml；后者则多为 10ml 和 5ml。

(6) 其它：如三角烧瓶、烧杯、量筒、漏斗、注射器等。

4、细胞培养温度

维持培养细胞旺盛生长，必须有恒定而适宜的温度。不同种类的细胞对培养温度要求也不同。人体细胞培养的标准温度为 $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，偏离这一温度范围，细胞的正常代谢会受到影响，甚至死亡。培养细胞对低温的耐受力较对高温强，温度上升不超过 39°C 时，细胞代谢与温度成正比；人体细胞在 $39-40^{\circ}\text{C}$ 1 小时，即能受到一定损伤，但仍有可能恢复；在 $40-41^{\circ}\text{C}$ 1 小时，细胞会普遍受到损伤，仅小半数有可能恢复； $41-42^{\circ}\text{C}$ 1 小时，细胞受到严重损伤，大部分细胞死亡，个别细胞仍有恢复可能；当温度在 43°C 以上 1 小时，细胞全部死亡。相反，温度不低于 0°C 时，对细胞代谢虽有影响，但并无伤害作用；把细胞放入 $25-35^{\circ}\text{C}$ 时，细胞仍能生存和生长，但速度减慢；放在 4°C 数小时后，再回到 37°C 培养，细胞仍能继续生长。细胞代谢随温度降低而减慢。当温度降至冰点以下时，细胞可因胞质结冰受损而死亡。但是，如果向培养液中加入一定量的冷冻保护剂（二甲亚砜或甘油），可在深低温下如 -80°C 或 -196°C （液氮）长期保存。

5、合适的气体环境

气体是哺乳动物细胞培养生存必需条件之一，所需气体主要有氧气和二氧化碳。氧气参与三羧酸循环，产生供给细胞生长增殖的能量和合成细胞生长所需用的各种成分。

开放培养时一般把细胞置于 95%空气加 5%二氧化碳混合气体环境

中。二氧化碳既是细胞代谢产物，也是细胞生长繁殖所需成分，它在细胞培养中的主要作用在于维持培养基的 pH 值。大多数细胞的适宜 pH 为 7.2-7.4，偏离这一范围对细胞培养将产生有害的影响。但细胞耐酸性比耐碱性大一些，在偏酸环境中更利于细胞生长。但有一些细胞也喜欢偏碱环境中生长，如成纤维细胞最适合 pH 是 7.4-7.6。每种细胞都有其最适 pH 值。

细胞培养无菌操作基本技术

无菌操作技术分为三个部分：工作环境及表面的处理，细胞培养所用玻璃及塑料制品的处理及培养液与培养细胞的处理。

工作环境的处理

使用层流超净工作台是最经济有效的手段。超净工作台正常工作时，向下的气流可阻挡外界空气污染物进入超净台。

(1) 实验前，无菌室及无菌操作台用紫外灯照射 30-60 分钟灭菌，用 70% 酒精擦拭无菌操作台面，并开启无菌操作台风机运转 10 分钟后，才可开始实验操作。每次操作只处理一株细胞，以免造成细

胞交叉污染。实验结束后，将实验物品带出工作台。如需要继续进行下一个实验，则用 70% 酒精擦拭无菌操作台面，再让无菌操作台风机运转 10 分钟后，才可进行下一个实验操作。

(2) 无菌操作工作区域应保持清洁与宽敞，必要物品，如试管架、移液器或吸管头等可以暂时放置，其它实验用品用完后应及时移出，以利气体流通。实验用品要用 70%酒精擦拭后才能带入无菌操作台内。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。

(3) 小心取出无菌实验用品，避免造成污染。切勿碰触吸管与吸头头部或容器瓶口，不要在打开的容器正上方操作实验。容器打开后，用手夹住瓶盖并握住瓶身，倾斜约 45° 角取用，尽量勿将瓶盖盖口朝上放在台面上。

(4) 工作人员应注意自身的安全，必须穿戴实验衣与手套后才进行实验。对于来自人源性或病毒感染的细胞株应特别小心，并选择适当等级的无菌操作台（至少两级）。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 及 TPA 等，并避免尖锐物品伤人等。

(5) 定期检查下列项目：CO₂ 钢瓶内的 CO₂ 压力；CO₂ 培养箱内的 CO₂ 浓度、温度、及水盘是否有污染；无菌操作台内气流压力是否正常，定期更换紫外灯管及 HEPA 过滤器滤膜，预滤网（300 小时/预滤网，3000 小时/HEPA）。

细胞培养所用玻璃及塑料制品的清洗与消毒

清洗

在组织细胞培养中，体外细胞对任何有害物质都非常敏感。微生物产品附带杂物，上次细胞残留物及非营养成分的化学物质，均能影响培养细胞的生长。因此对新使用玻璃器皿和重新使用的培养器皿都要严格彻底的清洗，且要根据器皿的组成材料不同，选择不同的清洗方法。

玻璃器皿的清洗

组织细胞培养中，使用量最大的是玻璃器皿，故工作最最大的是玻璃器皿的清洗。一般玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、浸酸和冲洗四个步骤。清洗后的玻璃器皿不仅要求干净透明无油迹，而且不能残留任何物质。

(1) 浸泡：初次使用和培养使用后的玻璃器皿均需先用清水浸泡，以使附着物软化或被溶液掉。新的初次使用的玻璃器皿，在生产及运输过程中，玻璃表面带有大量的干固的灰尘，且玻璃表面常呈碱性及带有一些对细胞有害的物质等。新瓶使用前应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸液浸泡过夜，以中和其中的碱性物质。再次使用的玻璃器皿则常附有大量刚使用过的蛋白质，干固后不易洗掉，

故用后要立即浸入水中，且要求完全浸入，不能留有气泡或浮在液面上。

(2) 刷洗：浸泡后的玻璃器皿一般要用毛刷沾洗涤剂刷洗，以除去器皿表面附着较牢的杂质。刷洗要适度，过度会损害器皿表面光泽度。

(3) 浸酸：清洁液是由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水按一定比例配制而成，其处理过程称为浸酸。清洁液对玻璃器皿无腐蚀作用，而其强氧化作用可除掉刷洗不掉的微量杂质。清洁液去污能力很强。是清洗过程中关键的一环。浸泡时器皿要充满清洁液，勿留气泡或器皿露出清洁液面。浸泡时间一般为过夜，不应少于 6 小时。清洁液可根据需要，配制成不同的强度，常用的下列三种：重铬酸钾 (g) 浓硫酸 (ml) 蒸馏水 (ml) 比例如下

(A) 强清洁液 63 : 1000 : 200000

(B) 次强清洗液 120 : 200 : 1000

(C) 弱清洁液 100 : 100 : 100。

清洁液配制时应注意安全，须穿戴耐酸手套和围裙，并要保护好面部及身体裸露部分。配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒搅拌，使产生的热量挥发，配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒

搅拌，使产生的热量挥发，配制溶液应选择塑料制品。配成后清洁液一般为棕红色。

(4) 冲洗：玻璃器皿在使用后，刷洗及浸泡后都必须用水充分冲洗。使之尽量不留污染或洁液的残迹。冲洗最好用洗涤装置。即省力、效果又好。如用手工操作，则需流水冲洗十次以上，每天水须灌满及倒干净，最好用蒸馏水清洗 3-5 次，晾干备用。

胶塞的清洗

细胞培养中所用的橡胶制品主要是瓶塞。新购置的瓶塞带有大量滑石粉及杂质，应先用自来水冲洗，再做常规处理，常规清洗方法是：每次用后立即置入水中浸泡，然后用 2% NaOH 或洗衣粉煮沸 10-20 分钟，以除掉培养中的蛋白质。自来水冲洗后，再用 1% 稀盐酸浸泡 30 分钟或蒸馏水冲洗后再煮沸 10-20 分钟，晾干备用。

塑料制品的清洗

塑料自制品现多是采用无毒并已经特殊处理的包装，打开包装即可用，多为一次性物品。必要时用 2% NaOH 浸泡过夜，用自来水充分冲洗，再用 5% 盐酸溶液浸泡 30 分钟，最后用自来水和蒸馏水冲洗干净，晾干备用。

消毒

细胞培养的最大危险是发生培养物的细菌，真菌和病毒等微生物的污染。污染主要是由于操作者的疏忽而引起，常见的原因有操作间或周围空间的不洁，培养器皿和培养液消毒不合格或不彻底。由于有关培养的每个环节的失误均能导致培养失败，故细胞培养的每个环节都应严格遵守操作常规，防止发生污染。

消毒方法分为三类：物理灭菌法（紫外线、湿热、干烤、过滤等），化学灭菌法（各种化学消毒剂）和抗生素。

（1）紫外线消毒：用于空气，操作台表面和不能使用其它法进行消毒和培养器皿。紫外线直接照射方便、效果好，经一定的时间照射后，可以消灭空气中大部分细菌，培养室紫外线灯应距地面不超过 2.5 米，且消毒物品不宜相互遮挡，照射不到的地方起不到消毒作用。

用。紫外线可产生臭氧，污染空气，试剂及培养液都有不良影响，对人皮肤也有伤害，不宜近照射。

（2）湿热消毒：即高压蒸气消毒，是一种使用最广泛、效果最好的消毒方法。湿热消毒时，消毒物品不能装得过满，以防止消毒器内气体阻塞而千百万危险，保证其内气体的流通。在加热升压之前，先要打开排气阀门排放消毒器内的冷空气，冷气空气排出后，关闭排气。

阀门，同时检验安全阀活动自如，继后开始升压，当达到所需压力时，开始记算消毒时间。

消毒过程中，操作者不能离开工作岗位，要定时检查压力及安全，防止消毒及表皮意外事件发生。

常用物品消毒压力及时间：

培养液、平衡盐溶液及其它需要灭菌的液体：121℃，15 磅，20 分钟；布类、玻璃制品、金属器械等物品：先 121℃，15 磅，20 分钟，然后在烘箱中烘干；玻璃瓶：干热灭菌 170℃，4 小时。

（3）化学消毒法：最常见的是 70%酒精及 1%的新洁而灭，前者主要用于操作者的皮肤，操作台表面及无菌室内的壁面处理。后者则主要用器械的浸泡及皮肤和操作室壁面的擦拭消毒。化学消毒法操作简单、方便有效。

（4）抗生素消毒：主要用于培养用液灭菌或预防培养物污染。

细胞培养的污染及控制

1) 污染的类型

细胞培养过程中的污染不仅仅指微生物，而且还包括所有混入培养环境中的、对细胞生存有害或造成细胞不纯的物质，包括生物和化学物质。

一、细菌污染

细菌污染是实验室细胞培养中常见的污染，即使在细胞培养液中加入了抗菌素(一般为预防剂量)，也可能因为操作不慎而引起污染。最常见的有革兰氏阳性菌，如枯草杆菌以及大肠杆菌、假单胞菌等革兰氏阴性菌，其中又以白色葡萄球菌较常见。

培养细胞受细菌污染后，会出现培养液变混浊，pH 改变。也有的培养液肉眼观察无多少改变，只能在镜下发现菌体才知污染。所以，每天应仔细观察。污染后细胞发生病理改变，胞内颗粒增多、增粗，最后变圆脱落死亡，造成试验失败和细胞株(系)丢失。

二、真菌污染

真菌污染是细胞培养过程中最常见的一种，尤其在霉雨季节进行细胞培养更易污染。最常见的真菌有烟曲霉、黑曲菌、孔子霉、毛霉菌、白色念珠菌和酵母菌。

培养细胞受真菌污染后，可见培养液中漂浮着白色或浅黄色的小点，有的散在生长，培养液一般不发生混浊；倒置显微镜下可见丝状、管状或树枝状的菌丝纵横交错在细胞之间或培养基中，有的呈链状排列。念珠菌和酵母菌呈卵圆形散在细胞周边和细胞之间。个体细小，有增多趋势。镜下看时，要将培养瓶用酒精棉球擦干净，以防止与瓶外尤其瓶底外面生长的菌丝相混淆。真菌污染后，细胞生长变慢，但最后由于营养耗尽及毒性作用而使细胞脱落死亡。

三、支原体污染

支原体是介于细菌与病毒之间能独立生活的最小微生物，最小直径 $0.2\ \mu\text{m}$ ，一般过滤除菌无法去除它，光镜下难以看清它的形态结构。开始不易发现，能在偏碱条件(pH7.6~8.0)下生存，对青霉素有抗药性。多吸附于细胞表面或散在于细胞之间。电镜下可见其有三层结构，无细胞壁，中央有电子密度大的密集颗粒或丝状的中心囊。

培养细胞受支原体污染后，部分敏感细胞可见细胞生长增殖变慢，部分细胞变圆，从瓶壁脱落。

但多数细胞污染后无明显变化，或略有变化，若不及时处理，还会产生交叉污染。

四、病毒污染

采用组织细胞培养法生产疫苗，如果没有除去潜在病毒的组织培养物，会产生病毒污染。目前，从原代猴肾细胞的培养中已发现不少于 20 种血清性病毒。尽管病毒污染的细胞不影响原代培养，但生产疫苗是不安全的。若二倍体细胞系有 SV40 或多发瘤病毒，B 淋巴细胞含 EB 病毒，细胞和会发生变异、转化，形成异倍体的细胞系。因此，潜在病毒是细胞大量生产和疫苗、干扰素等生物制品制作中的难题。

五、非同种细胞污染

由于细胞培养操作时各细胞株所需的器材和溶液没有严格分开，操作不当，往往会使一种细胞被另一种细胞污染。如“灵长类”细胞系发现猴和鼠类细胞的混合物，ERK/KD 细胞是从兔肾中分离出来的，而现在却认为是 HeLa 细胞。目前，世界上已有几十种细胞都被 HeLa 细胞所污染，致使许多实验宣告无效。

非细胞培养物所造成的化学成分的污染也偶有发生，大多是由于细胞培养所需物品清洗消毒不彻底而带入一些有毒化学物质所致。

(2) 污染来源及鉴别

一、污染来源

细胞培养过程中污染的来源主要有以下几条途径：

1、不洁的动物组织标本

很多动物组织本该是无菌的(直接与外界相通的呼吸道和消化道、泌尿系统除外)，但由于取材时不小心也会有污染的机会。组织本身含有细菌，如取材时不用浓的抗生素洗液洗涤浸泡，也会带菌，造成细胞污染。

2、空气

空气中含有大量的微生物，如果操作室与外界隔离不严或消毒不充分下，很容易造成污染。另外，净化工作台使用过久，滤板未定期更换或长久不更换，滤气受尘埃堵塞，工作时不戴口罩或外界气流过强，污染空气进入操作区，也会导致污染。春夏季南方地区多雨，空气湿度大，含菌量多，工作不注意也易造成污染。

3、清洗消毒

培养用物品、材料洗刷不净，培养用液和器材灭菌不彻底也会引入微生物和有毒物质。

4、操作

来自操作者的污染主要有以下几方面：

- (1) 器材和溶液使用前未仔细检查是否污染过，或者是否已经消毒灭菌处理过，或者虽经处理，时隔已久又未重新处理。
- (2) 操作者未戴口罩、帽子，呼出气中排出细菌和支原体。
- (3) 培养瓶口未用 75%酒精擦和烧灼。

(4) 操作者不当心, 动作不正确而将吸管或无菌器具碰到了污染的物品, 如手上皮肤和瓶子外壁等。

(5) 操作者操作时大声说话, 来回走动扬起灰尘等。

5、血清

市售血清灭菌不彻底, 潜在病毒和支原体污染。

二、污染的鉴别

1、细菌、真菌污染的检测

(1) 肉眼观察 细菌、真菌污染常在传代、换液、加样等开放性操作之后发生, 而且增生迅速, 若有污染, 在 48 小时内可明显观察到。如培养液变混浊, 或略加振荡有很多漂浮物漂起。

(2) 镜下观察 在倒置显微镜的高倍镜下可见培养液中有大量圆球状颗粒漂浮, 即为细菌污染。若细胞之间有丝状、管状、树枝状或卵形的物质常为真菌污染。

(3) 接种观察 采用普通肉汤接种或用未加双抗药物的培养液接种, 也可发现是否有污染。

2、支原体污染的检测

(1) 相差显微镜观察 将细胞接种于事先放置于培养瓶内的支持物(一般用长形盖玻片), 24 小时后用清洁镊子从培养瓶中取出支持物, 细胞面向上放置于载物片上, 再盖上较大盖玻片, 用相差油镜观察; 若不用支持物培养法, 直接取少许培养液滴在载物片上, 再盖上盖片观察亦可。支原体在镜下呈暗色微小颗粒, 多位于细胞与细胞之间, 有时可见类似于布朗运动的表现。应注意与细胞破碎溢出的内容物如线粒体等相区别。

(2) 低涨处理地衣红染色观察 取已在培养瓶中的支持物盖片或培养液, 用新鲜配制的 0.5% 枸橼酸溶液处理盖片细胞。用新配制的 Carnoy 液固定两次, 每次 10 分钟, 取出盖片凉干。用培养液时, 先吸取 1mL, 500~800r/min 离心 5 分钟后去除上清, 留 0.2mL, 将 0.5% 枸橼酸溶液加入其中, 置 10 分钟, 加入 Carnoy 液固定, 离心弃上清固定液, 余 0.2mL 沉淀物, 制成 2~3 张涂片。然后用 2% 醋酸依地红(地衣红 2g, 冰醋酸 60mL, 加蒸馏水至 100mL) 染 5 分钟。纯酒精过三次, 每次 1 分钟, 封入 Euparal 或树胶中。若染色过深, 可先用 75% 酒精脱色, 再封片。镜下观察见支原体呈暗紫色小点, 位于细胞外或细胞之间。

(3) 荧光染色法观察 用荧光染料 Hoechst33258, 此染料能与 DNA 特异地结合, 可使支原体内的 DNA 着色, 然后用荧光显微镜观察。染色方法为: 用支持物盖片培养法将细胞接种在盖片上, 在细胞汇合前(即未长满前)取出玻片, 于碟皿中, 用不含酚红的 Hanks 液漂洗, 1:3 醋酸钾固定 10 分钟, 再用生理盐水漂洗后置于 50 μ g/mL 的 Hoechst33258(生理盐水配制)中染色 10 分钟, 置于蒸馏水漂洗 1~2 分钟, 向细胞面滴加数滴 pH5.5 磷酸缓冲液, 然后置荧光显微镜下观察。若用细胞培养液, 先离心去除上清液, 再加入 Hanks 液漂洗, 离心弃上清后加入 1:3 醋酸甲醇固定 10 分钟, 再用生理盐水漂洗后去上清液, 再用 Hoechst33258 染色 10 分钟, 加入蒸馏水漂洗, 离心去上清蒸馏水, 加 3~5 滴 pH5.5 磷酸缓冲液, 稍吹打使沉淀细胞重悬浮, 用吸管吸出, 滴于载物片上, 盖上盖片后观察。荧光显微镜下支原体呈绿色小点, 散在于细胞周围或附于细胞表面。

(4) 电镜检测 若条件许可, 可用扫描电镜或透射电镜观察。一般在细胞培养 48~72 小时, 细胞接近汇合前, 用胰酶消化细胞制成细胞悬液后进行。需经过固定、包埋、切片后才能进行观察。详细方法同细胞形态观察法(见第九章)。

(5) 培养检测 将 2.5×10^9 /L 细胞悬液 5mL 加入 45mL 支原体肉汤培养基(Sigma 或北京生物制品所生产的均可), 培养 14 天后观察肉汤培养有无雾状沉淀, 然后取 0.5ml 加入已冷却到 50 $^{\circ}$ C 的培养基中, 再用琼脂培养基做分离培养, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 天观察有无“荷包蛋”菌落出现。

(3) 污染的清除和预防

一、污染的清除

培养细胞一经污染，多数较难处理。如果污染细胞价值不大，宜弃之；有细胞株留存的或可购置的，可在寻找原因后彻底消毒操作室，复苏或重新购置细胞，再培养。若污染细胞价值较大，又难于重新得到，可采取以下办法清除。

1、使用抗生素

抗生素对杀灭细菌较有效。联合用药比单独用药效果好。预防用药比污染后再用药效果好。预防用药一般用双抗生素(青霉素 100u/mL 加链霉素 100 μ g/mL)，污染后清除用药需采用大于常用量 5~10 倍的冲洗法，于加药后作用 24~48 小时，再换常规培养液。此法在污染早期可能有效。所用抗生素品种除青霉素、链霉素外，还可庆大霉素、卡那霉素、多粘菌素、四环素、制霉菌素等。常用 400~800 μ g/mL 卡那霉素或 200 μ g/mL 四环素处理，每隔 2~3 日换液 1 次，传 1~2 代进行治疗。近年来有报道，4-氟，2-羟基喹啉(Ciprofloxacin,Cip)、截耳素衍生物(Pleu-romutilin derivative, BM-Cyclin2:BM-1 和四环素衍生物(BM-2)等三种抗生素单用或合用对杀灭支原体有效。这三种抗生素均用 PBS 配成 250X 浓缩液，-20℃ 保存备用，使用浓度 Cip 为 10 μ g/mL，BM-1 为 10 μ g/mL，BM-2 为 5 μ g/mL。使用时先吸除污染的培养液，加入含 BM-1 的 RPMI1640 培养液，3 天后再吸除培养液，加入含 BM-2 的 RPMI1640 培养液，培养 4 天，如此连续 3 个轮次，直至用 33258 荧光染色镜检证明已清除支原体后，再加正常培养液培养传代 3-4 次。

2、加温处理

将污染的组织培养物放在 41℃ 培养 18 小时，可杀死支原体，但对细胞有不良影响。所以在处理前要进行预试验，摸索能最大限度杀死支原体又对细胞影响最小的加热时间。此法有时不可靠。若先用药物处理后，再以 41℃ 加温处理效果更佳。

3、使用支原体特异性血清

用 5% 的兔支原体免疫血清(血凝效价 1:320 以上)可去除支原体污染，因特异抗体可抑制支原体生长，故经抗血清处理后 11 天即转为阴性，并且 5 个月后仍为阴性。但此法比较麻烦，不如用抗生素方便、经济。

4、其他方法

除了上述去除污染的方法外，还有动物体内接种除菌法、巨噬细胞吞噬法、污染培养瓶中加溴尿嘧啶再用光照射的方法及过滤法等，但均较麻烦，且效果不确定。所以一旦支原体污染，除非有特别重要价值，一般均弃之重新培养。

二、污染的预防

预防是防止细胞培养过程中发生污染的最好办法。只有预防工作做在前，才能将发生污染的可能性降到最小程度。一般预防可从以下几方面着手：

1、从物品、用品消毒灭菌着手

细胞培养所用物品清洗、消毒要彻底，各种溶液灭菌除菌要仔细，并在无菌试验阴性后才能使

用。操作室及剩余的无菌器材要定期清洁消毒灭菌。

2、从操作者做起

(1) 操作者责任心要强，要细心稳重，操作技术要熟练。进无菌室前要用肥皂洗手或用 5%新洁尔灭浸泡 5 分钟，按规定穿隔离衣。进入后关好门，坐下来尽量少走动。工作开始要先用 75% 酒精棉球擦手、擦瓶口和烧灼瓶口。事先要严格检查器材、溶液和培养物，不要把污染品或未经消毒的物品带入无菌室内，更不能随便使用，以免造成大批污染。

(2) 操作者动作要轻，必须在火焰周围无菌区内打开瓶口，并将瓶口转动烧灼。操作时尽量不要谈话，若打喷嚏或咳嗽应转向背面。

(3) 操作时要常更换吸管，切勿一根吸管做到底。一旦发现吸管口接触了手和其他污染物品应弃去。实验完毕及时收拾，保持实验室清洁整齐，最后用消毒水浸泡的纱布擦台面。

3、防止细胞交叉污染

在进行多种细胞培养操作时，所用器具要严格区分，最好做上标记便于辨别。并按顺序进行操作，避免一起进行时易发生混乱。

在进行换液或传代操作时，注射器和滴管不要触及细胞培养瓶瓶口，以免把细胞带到培养液中污染其他细胞。

所有细胞一旦购置，或从别处引入，或自己建立，均应及早留种冻存，一旦发生污染可弃之复苏，重新培养。

培养细胞的冷冻保存与复苏

■ 概述

◇ 冻存过程

■ 冷冻保存与复苏的原理

◇ 冻存结果

◆ 冷冻速率

◇ 讨论

◆ 冷冻保存温度

■ 冻存细胞的复苏

◆ 复温速率

◆ 非玻璃化冻存细胞的复苏

◆ 冷冻保护剂

◇ 主要材料

■ 冷冻保存方法	◇ 复苏过程
◆ 非玻璃化冻存方法	◇ 结果
◇ 主要材料	◇ 讨论
◇ 冻存过程	◆ 玻璃化冻存细胞的复苏
◇ 冻存结果	◇ 主要材料
◇ 讨论	◇ 复苏过程
◆ 玻璃化冻存方法	◇ 结果
◇ 主要材料	◇ 讨论

■ 概述

Spallanzani (1776) 最早发表了冷“处理”对“细胞”生命活动影响的报道，他用雪冷冻玻璃瓶中的马精子 10 多分钟之后，再将玻璃瓶放回室温下，发现了一个令人惊奇的现象，那些原本已经不动了的精子又“复活”了，就好像是刚从输精管排出来的一样，冷处理延长至数十分钟，情况依然如此。于是，他认为冷不能杀死精子。大约 100 年以后，许多早期的学者重复了低温处理对精子活动的影响，同样得出了相似的结论。到 1900 年前后，科学家基本上肯定了生物成分（如精子和一些生物化学物质）能够在零下温度贮存的事实。

Shettles (1940) 证明人类的精子也能抵抗温度的突然变化，他将人的精液封闭在小管内，在 -79°C ~ -196°C 之间的低温条件下进行冷处理，发现有 10% 的精子仍然能够存活。此后，冷冻处理研究材料的范围大大拓展。

Polge等人（1949）发现了甘油对低温下贮存的细胞具有保护作用，他们仍然以精子进行研究发现，加入甘油能够大大提高贮存于 -79°C 下精子的存活率。接下来的重大进展是Luyet（1951）与Lovelock（1953）等多位学者发现了电解质浓度对贮存细胞的损伤作用。他们的结论是，电解质浓度增大是造成贮存细胞损伤的主要原因。冷冻理论后来得到Merryman（1956）、Rey（1957）以及Smith（1961）等学者的继续和发展。

1949年至1960年这一段时间可以称为冷冻保存的“甘油时期”，这一时期对生物材料的冷冻保存一般都是以甘油作为保护剂。Lovelock（1959）等人发现了一种新的化学保护剂，这就是人们熟悉的二甲基亚砷（DMSO）。而且，用于冷冻保存的仪器也有明显的发展。目前，无论是冷冻保存理论、各种保护剂、冷冻用品和设备以及各种生物材料的保存与复苏技术都已十分成熟和完备。

[返回页首](#)

■……冷冻保存与复苏原理

在低于 -70°C 的超低温条件下，有机体细胞内部的生化反应极其缓慢，甚至终止。因此，采取适当的方法将生物材料降至超低温，即可使生命活动固定在某一阶段而不衰老死亡。当以适当的方法将冻存的生物材料恢复至常温时，其内部的生化反应可恢复正常。所谓冷冻保存，就是将体外培养物或生物活性材料悬浮在加有或不加冷冻保护剂的溶液中，以一定的冷冻速率降至零下某一温度（一般是低于 -70°C 的超低温条件），并在此温度下对其长期保存的过程。而复苏就是以一定的复温速率将冻存的体外培养物或生物活性材料恢复到常温的过程。不论是微生物、动物细胞、植物细胞还是体外培养的器官都可以进行冻存，并在适当条件下复苏。

水在低于零度的条件下会结冰。如果将细胞悬浮在纯水中，随着温度的降低，细胞内外的水分都会结冰，所形成的冰晶会造成细胞膜和细胞器的破坏而引起细胞死亡。这种因细胞内部结冰而导致的细胞损伤称为细胞内冰晶的损伤。如果将细胞

悬浮在溶液中，随着温度的降低，细胞外部的水分会首先结冰，从而使得未结冰的溶液中电解质浓度升高。如果将细胞暴露在这样的溶液中且时间过长，细胞膜上脂质分子会受到损坏，细胞便发生渗漏，在复温时，大量水分会因此进入细胞内，造成细胞死亡。这种因保存溶液中溶质浓度升高而导致的细胞损伤称为溶质损伤或称溶液损伤。当温度进一步下降，细胞内外都结冰，产生冰晶损伤。但是如果在溶液中加入冷冻保护剂，则可保护细胞免受溶质损伤和冰晶损伤。因为冷冻保护剂容易同溶液中的水分子结合，从而降低冰点，减少冰晶的形成，并且通过其摩尔浓度降低未结冰溶液中电解质的浓度，使细胞免受溶质损伤，细胞得以在超低温条件下保存。在复苏时，一般以很快的速度升温，1-2 分钟内即恢复到常温，细胞内外不会重新形成较大的冰晶，也不会暴露在高浓度的电解质溶液中过长的时间，从而无冰晶损伤和溶质损伤产生，冻存的细胞经复苏后仍保持其正常的结构和功能。冷冻保护剂对细胞的冷冻保护效果还与冷冻速率、冷冻温度和复温速率有关。而且不同的冷冻保护剂其冷冻保护效果也不一样。

[返回页首](#)

◆ 冷冻速率

冷冻速率是指降温的速度，直接关系到冷冻效果。细胞在冷冻过程中会发生如下变化：当细胞被冷至 -5°C 时，因溶液中加入有冷冻保护剂而降低溶液的冰点，细胞内外溶液仍未结冰；当被冷至 $-5 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 之间时，细胞外溶液先出现结冰而细胞内仍保持未结冰状态。细胞内未结冰的水分子会比细胞外部分结冰溶液中的水分子具有更高的化学能。其结果是，细胞内水分子为了和细胞外水分子保持化学能的平衡，会向细胞外流动。冷冻速度不同，细胞内水分向外流动的情况也不相同：如果冷冻速度慢，细胞内水分外渗多，细胞脱水，体积缩小，细胞内溶质浓度增高，细胞内不会发生结冰；如果冷冻速度快，细胞内水分没有足够的时间外渗，结果随着温度的下降而发生细胞内结冰；如果冷冻速度非常快（即超快速冷冻），则细胞内形成的冰晶非常小或不结冰而呈玻璃状态（玻璃化冷冻）。Luyet（1973）证实液体的凝

固可分为两种形式：一种是晶体化，溶液中的分子呈有序排列；另一种情况是非晶体即玻璃化，液体中的分子呈无序状态，保持未凝固前的状态。

不同的冷冻速度既然能使细胞内发生不同的生理变化，也可以对细胞产生不同的损伤。当冷冻速度过慢时，细胞脱水严重，细胞体积严重收缩，超过一定程度时即失去活性。同时冷冻速度过慢，还会引起细胞外溶液部分结冰，从而使细胞外未结冰的溶液中溶质浓度增高，产生溶质损伤。当冷冻速度过快时，细胞内水分来不及外渗，会形成较大冰晶，造成细胞膜及细胞器的破坏，产生细胞内冰晶损伤。超快速玻璃化冷冻对细胞存活来说是最为理想的冷冻方法。细胞内外呈玻璃化凝固，无冰晶形成或形成很小的冰晶，对细胞膜和细胞器不致造成损伤，细胞也不会在高浓度的溶质中长时间暴露而受损。

不同细胞的最适冷冻速率不同。小鼠骨髓干细胞、酵母、人红细胞的最适冷冻速率分别为 $1.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。细胞与细胞之间的最适冷冻速率可在 $1.6^{\circ}\text{C} \sim 300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，故对一种细胞进行冷冻保存之前，首先需要测定其最适冷冻速率，以保证获得最高的冷冻存活率。

[返回页首](#)

◆ 冷冻保存温度

冷冻保存温度是指能长期保存细胞的超低温，在此温度下，细胞生化反应极其缓慢甚至停止，但经过长期保存，在复苏后仍能保持正常的结构和功能。

不同的细胞和生物体以及使用不同的冷冻保存方法要取得同样的冷冻保存效果，冷冻保存温度可以不同。但从实际和效益的观点出发，液氮温度 (-196°C) 是目前最佳的冷冻保存温度。在 -196°C 时，细胞的生命活动几乎完全停止，但复苏后细胞的结构和功能完好。如果冷冻过程得当，一般生物样品在 -196°C 下均可保存十年

以上。应用-700C~-800C 保存细胞，短期内对细胞的活性无明显影响，但随着冻存时间延长，细胞存活率明显降低。在冰点到-400C 范围内保存细胞的效果不佳。

[返回页首](#)

◆ 复苏速率

冷冻保护体外培养物，除了必须有最佳的冷冻速率、合适的冷冻保护剂和冻存温度外，在复苏时也必须要有最佳的复温速率，这样才能保证最后获得最佳冷冻保存效果。

复温速率是指在细胞复苏时温度升高的速度。复温速率不当也会降低冻存细胞存活率。一般来说，复温速度越快越好。常规的做法是，在 37⁰C 水浴中，于 1-2 分钟内完成复苏。复温速度过慢，细胞内往往重新形成较大冰晶而造成细胞损伤。复温时造成的细胞损伤非常快，往往在极短的时间内发生。

[返回页首](#)

◆ 冷冻保护剂

冷冻保护剂是指可以保护细胞免受冷冻损伤的物质。冷冻保护剂常常配制成一定的溶液。一般来讲，只有红细胞、大多数微生物和极少数有核的哺乳动物细胞悬浮在不加冷冻保护剂的水或简单的盐溶液中，并以最适的冷冻速率冷冻，可以获得活的冻存物。但对于大多数有核哺乳动物细胞来说，在不加冷冻保护剂的情况下，无最适冷冻速率可言，也不能获得活的冷冻物。例如将小鼠骨髓细胞悬浮在不加冷冻保护剂的平衡盐溶液中，并以 0.3~600⁰C/min 的冷冻速率降温冷冻，98% 以上的细胞会死亡；而加入甘油冷冻保护剂进行冷冻保存时，98% 以上的细胞都可存活。

冷冻保护剂可分为渗透性和非渗透性两类。渗透性冷冻保护剂可以渗透到细胞内，一般是一些小分子物质，主要包括甘油、DMSO、乙二醇、丙二醇、乙酰胺、

甲醇等。其保护机制是在细胞冷冻悬液完全凝固之前，渗透到细胞内，在细胞内外产生一定的摩尔浓度，降低细胞内外未结冰溶液中电解质的浓度，从而保护细胞免受高浓度电解质的损伤，同时，细胞内水分也不会过分外渗，避免了细胞过分脱水皱缩。甘油和DMSO并不防止细胞内结冰，在使用该类冷冻保护剂时，需要一定的时间进行预冷，让甘油或DMSO等成分渗透到细胞内，在细胞内外达到平衡以起到充分的保护作用。目前DMSO的应用比甘油更为广泛，但要注意的是，DMSO在常温下对细胞的毒性作用较大，而在4⁰C时，其毒性作用大大减弱，且仍能以较快的速度渗透到细胞内。所以，冻存时DMSO平衡多在4⁰C下进行，一般需要40~60分钟。

非渗透性冷冻保护剂不能渗透到细胞内，一般是些大分子物质，主要包括聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、蔗糖、聚乙二醇、葡聚糖、白蛋白以及羟乙基淀粉等。其保护机制的假说很多，其中有一种可能是，聚乙烯吡咯烷酮等大分子物质可以优先同溶液中水分子结合，降低溶液中自由水的含量，使冰点降低，减少冰晶的形成；同时，由于其分子量大，使溶液中电解质浓度降低，从而减轻溶质损伤。

不同的冷冻保护剂有不同的优、缺点。目前一般多采用联合使用两种以上冷冻保护剂组成保护液。由于许多冷冻保护剂（如DMSO）在低温下能保护细胞，但在常温下却对细胞有害，故在细胞复温后应及时洗涤冷冻保护剂。

[返回页首](#)

■…… 冷冻保存方法

按照冷冻保护液在冻结后是否形成冰晶来划分，冻存方法可分为非玻璃化和玻璃化冻存两种。非玻璃化冻存是利用各种温级的冰箱分阶段降温至-70⁰C~-80⁰C，然后直接投入液氮进行保存；或者是利用电子计算机程控降温仪以及利用液氮的气、液，按一定的降温速率从室温降至-100⁰C以下，再直接投入液氮保存的方法。以该方法冻结的细胞悬液或多或少都有冰晶的形成。玻璃化冻存则是指利用多种高浓



度的冷冻保护剂联合形成的玻璃化冷冻保护液保护悬浮细胞，直接投入液氮进行冻存的方法。以该方法冻结的细胞悬液没有冰晶的形成。但目前细胞冻存最常用的仍是前一种方法。

[返回页首](#)

◆ 非玻璃化冻存方法

下面以肿瘤细胞和杂交瘤细胞为例，介绍非玻璃化冻存细胞的详细过程。

[返回页首](#)

✧ 主要材料

(1) 仪器设备：普通冰箱、-30⁰C低温冰箱和-70⁰C ~ -80⁰C超低温冰箱、液氮冻存罐、高速离心机、电子计算机程控降温仪等；

(2) 冻存管：容量为 1ml 或 1.5ml；

(3) 冷冻保护液：一般是以 9 份小牛血清或细胞培养液与 1 份 DMSO 混合而成。现配现用，或配制后放入普通冰箱冰盒内冷冻保存。使用前，于室温下水浴溶解；

(4) 待冻存细胞：各种肿瘤细胞或杂交瘤细胞。

[返回页首](#)

✧ 操作过程

1. 待冻存细胞悬液的制备

- (1) 按常规方法消化处于对数生长期的细胞培养物，制备单细胞悬液，并计算细胞总数；
- (2) 将细胞悬液以 800 ~ 1000r/min 离心 5min，去上清液；
- (3) 向细胞沉淀物中加入冷冻保护液，轻轻吹打混匀，使细胞密度达 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml；
- (4) 按每管 1 ~ 1.5ml 的量分装于冻存管内，拧紧管盖；
- (5) 再冻存管上做好标记，包括细胞代号及冻存日期。

2. 分级冷冻

- (1) 先将冻存管放入普通冰箱冷藏室（ $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$ ），约 40min；
- (2) 接着将冻存管置于普通冰箱冷冻室（ $-10^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ ），约 30 ~ 60min；
- (3) 将冻存管转入低温冰箱（ -30°C ），放置 30min 左右；
- (4) 然后将冻存管转移到超低温冰箱（ $-70^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ ），过夜；
- (5) 最后将冻存管投入液氮保存。

3. 记录

做好冻存记录。记录内容包括冻存日期、细胞代号、冻存管数、冻存过程中降温的情况、冻存位置以及操作人员。

[返回页首](#)

✧ 冻存结果

如此冻存的细胞，其存活率可达 90%以上。

[返回页首](#)

✧ 讨论

在使用 DMSO 前，不要对其进行高压灭菌，因其本身就有灭菌作用。高压灭菌反而会破坏其分子结构，以致降低冷冻保护效果。在常温下，DMSO 对人体有毒，故在配制时最好带手套。

在将细胞冻存管投入液氮时，动作要小心、轻巧，以免液氮从液氮罐内溅出。若液氮溅出，可能对皮肤造成冻伤。操作过程中最好带防冻手套、面罩、工作衣或防冻鞋。

应注意控制冻存细胞的质量。既要在冻存前保障细胞具有高活力，还要确保无微生物污染，这样的细胞才具有冻存价值。另外，在每批细胞冻存一段时间后，要复苏 1~2 管，以观察其活力以及是否受到微生物的污染。

冻存管宜采用塑料冻存管，不宜使用玻璃安瓿。因为在复苏时，需要从 -196°C 的液氮中取出冻存管，立即投入 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水中，温差很大，玻璃安瓿瓶容易爆炸而发生危险。

[返回页首](#)

◆ 玻璃化冻存方法

以下以人单核细胞为例说明这种细胞冻存方法（Takahashi et al. 1986）。

[返回页首](#)

✧ 主要材料

(1) 冷冻保护液：为 Hanks 平衡盐溶液加入 20.5%DMSO (w/v)、15.5% 乙酰胺 (w/v)、10% 丙二醇 (w/v) 和 10% 聚乙二醇 (Mr 8000) 而成。用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4，现配现用。

(2) 冻存管：SILASTIC 玻璃小管，内径 3mm，外径 4.5mm；

(3) 设备：液氮储存罐；

(4) 待冻存细胞：人类外周血单核细胞。

[返回页首](#)

✧ 冻存过程

(1) 用常规方法分离全血中单核细胞；

(2) 在冰浴中预冷冷冻保护液；

(3) 将装有单核细胞的离心管放置入盛有冰水的烧杯内（冰浴）；

(4) 沿离心管壁缓慢滴加预冷的冷冻保护液。滴加过程为：前 3min 以 0.3ml/min 速度滴加，后 5min 以 0.6ml/min 速度滴加，余下的冻存液以 0.75ml/min 速度滴加。2 × 10⁷ 个细胞要滴加 15ml 冻存液。滴加的时间在 15min 左右。最终细胞密度要在 1 × 10⁶ ~ 1.5 × 10⁶ 个细胞/ml，边滴加边轻轻晃动离心管；

(5) 轻轻吹吸混匀细胞冷冻悬液；

(6) 将细胞冷冻悬液分装于冻存管中。12cm 长的冻存管装 0.8ml 细胞冷冻悬液；

(7) 将冻存管两端以火焰封口；

(8) 最后将冻存管直接投入液氮中保存。降温速度约为 600⁰C/min。



[返回页首](#)

✧ 冻存结果

如此冻存的细胞，其存活率可达 90% 以上。

[返回页首](#)

✧ 讨论

玻璃化冻存法对细胞活性的保存具有较好的效果，不需要复杂的仪器设备，具有液氮储存设备即可使用。目前，该方法已在胚胎冷冻方面得到广泛应用，但很少应用于一般细胞的冻存。这可能与需要配制较复杂的冻存液以及冷冻前和复苏后较烦琐的操作有关。

因为玻璃化冷冻保护液中的冷冻保护剂的浓度较高，室温下对细胞具有毒性（但在 4°C 时毒性大为减弱）。所以，冷冻保护液的滴加全过程必须在 4°C 冰浴中进行。另外，滴加速度要缓慢，如果滴加速度过快，则在细胞外产生很高的渗透压，造成细胞膜的损伤，导致细胞死亡，故要缓慢滴加，让冷冻保护剂有足够的时间缓慢渗透到细胞内，达到细胞内外的平衡。

[返回页首](#)

■…… 冻存细胞的复苏

◆ 非玻璃化冻存的复苏方法

[返回页首](#)

✧ 主要材料

(1) 仪器设备：恒温水浴箱、高速离心机；

(2) 培养用液：完全培养液。

[返回页首](#)

✧ 复苏过程

(1) 调配 $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 的温水，或将恒温水浴箱的温度调节至 $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ ；

(2) 从液氮中取出冻存管，立即投入 $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水中迅速晃动，直至冻存液完全溶解；

(3) 将细胞冻存悬液转移到离心管内，加入约 5ml 培养液，轻轻吹打混匀；

(4) 将细胞悬液经 $800 \sim 1000\text{r/min}$ 离心 5min，弃上清液；

(5) 向细胞沉淀内加入完全培养液，轻轻吹打混匀，将细胞悬液转移到培养瓶内，补足培养液进行培养。

[返回页首](#)

✧ 结果

复苏后的细胞应该保持其冻存时的活力，活细胞数达 90% 以上。

[返回页首](#)

✧ 讨论

细胞冻存悬液一旦融解后，要尽快离心除去冷冻保护液，防止冷冻保护剂对细胞产生毒性。实验人员在复苏细胞过程中，同样应具有自我保护意识，避免被液氮冻伤。

[返回页首](#)

■…… 玻璃化冻存的复苏方法

以下以人的单核细胞为例说明其过程（Takhashi et al. 1986）。

[返回页首](#)

✧ 主要材料

- （1）设备：高速离心机；
- （2）培养用液：添加 20%胎牛血清的 Hanks 平衡盐溶液、培养液。

[返回页首](#)

✧ 操作过程

- （1）将冻存管从液氮中取出，立即投入冰浴中 5min。复温速率约 $560^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。
一次可以进行多个冻存管的复苏；
- （2）将冻存管两端剪断，可以将 5ml 细胞冻存悬液转移到 50ml 离心管中；
- （3）沿离心管壁缓慢加入已在冰浴中预冷的含 20%胎牛血清的 Hanks 平衡盐溶液。前 10min 以 0.2ml/min 的速度加入，后 10min 以 0.5ml/min 的速度加入，接着的 15min 以 0.75ml/min 的速度加入，最后 30min 以 1ml/min 的速度加入。全过程约为 65min，都在冰浴中进行；

(4) 将稀释后的细胞悬液以 400r/min 离心 5min, 去除上清。向细胞沉淀中加入培养液重新悬浮细胞, 用于培养。

[返回页首](#)

✧ 结果

复苏后的细胞应该保存其冻存时的活力, 活细胞数达 90%以上。

[返回页首](#)

✧ 讨论

复苏时, 冷冻保护液的稀释及去除过程与冻存前冷冻保护液的滴加过程一样, 不能在室温下而必须在 4⁰C冰浴中进行, 避免在室温下冷冻保护剂对细胞产生毒性。稀释过程也要缓慢进行, 保证有足够的时间让冷冻保护剂从细胞内渗出, 以达到细胞内外的平衡, 避免高渗透压的损伤。

细胞培养常见问题及回答

如何选用特殊细胞系培养基?

培养某一类型细胞没有固定的培养条件。在 MEM 中培养的细胞，很可能在 DMEM 或 M199 中同样很容易生长。总之，首选 MEM 做粘附细胞培养、RPMI-1640 做悬浮细胞培养是一个好的开始，各种目的无血清培养最好首选 AIM V（12005）培养基（SFM）。

L-谷氨酰胺在细胞培养中重要吗？它在溶液中不稳定吗？

L-谷氨酰胺在细胞培养时是重要的。脱掉氨基后，L-谷氨酰胺可作为培养细胞的能量来源、参与蛋白质的合成和核酸代谢。L-谷氨酰胺在溶液中经过一段时间后会降解，但是确切的降解率一直没有最终定论。L-谷氨酰胺的降解导致氨的形成，而氨对于一些细胞具有毒性。

GlutaMAX-I 是什么？培养细胞如何利用 GlutaMAX-I？这个二肽有多稳定？

GlutaMAX-I 二肽是一个 L-谷氨酰胺的衍生物，其不稳定的 α -氨基用 L-丙氨酸来保护。一种肽酶逐渐裂解二肽，释放 L-谷氨酰胺供利用。

GlutaMAX-I 二肽非常稳定，即使在 121 磅灭菌 20 分钟，GlutaMAX-I 二肽溶液有最小的降解，如果在相同条件下，L-谷氨酰胺几乎完全降解。

什么培养基中可以省去加酚红？

酚红在培养基中被用来作为 PH 值的指示剂：中性时为红色，酸性时为黄色，碱性时为紫色。研究表明，酚红可以模拟固醇类激素的作用，（特别是雌激素）。为避免固醇类反应，培养细胞，尤其是哺乳类细胞时，用不加酚红的培养基。由于酚红干扰检测，一些研究人员在做流式细胞检测时，不使用加有酚红的培养基。

酚红在培养基中被用来作为 PH 值的指示剂：中性时为红色，酸性时为黄色，碱性时为紫色。研究表明，酚红可以模拟固醇类激素的作用，（特别是雌激素）。为避免固醇类反应，培养细胞，尤其是哺乳类细胞时，用不加酚红的培养基。由于酚红干扰检测，一些研究人员在做流式细胞检测时，不使用加有酚红的培养基。

如何用台盼兰计数活细胞？

用无血清培养基把细胞悬液稀释到 200~2000 个/毫升，在 0.1 毫升的细胞悬液中加入 0.1 毫升的 0.4% 的台盼兰溶液。轻轻混匀，数分钟后，用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼兰，因而染成蓝色的细胞是死细胞。

如何消除组织培养的污染？

当重要的培养污染时，研究者可能试图消除或控制污染。首先，确定污染物是细菌、真菌、支原体或酵母，把污染细胞与其它细胞系隔离开，用实验室消毒剂消毒培养器皿和超净台，检查 HEPA 过滤器。

高浓度的抗生素和抗霉菌素可能对一些细胞系有毒性，因而，做剂量反应实验确定抗生素和抗霉菌素产生毒性的剂量水平。这点在使用抗生素如两性霉素 B 和抗霉菌素如泰乐菌素时尤其重要。下面是推荐的确定毒性水平和消除培养污染的实验步骤。

1. 在无抗生素的培养基中消化、计数和稀释细胞，稀释到常规细胞传代的浓度。
2. 分散细胞悬液到多孔培养板中，或几个小培养瓶中。在一个浓度梯度范围内，把选择抗生素加入到每一个孔中。例如，两性霉素 B 推荐下列浓度，0.25，0.50，1.0，2.0，4.0，8.0 mg/ml。
3. 每天观测细胞毒性指标，如脱落，出现空泡，汇合度下降和变圆。
4. 确定抗生素毒性水平后，使用低于毒性浓度 2~3 倍浓度的抗生素的培养液培养细胞 2~3 代。
5. 在无抗生素的培养基中培养细胞一代。

6. 重复步骤 4。

7. 在无抗生素的培养基中培养 4~6 代，确定污染是否已被消除。

培养基中丙酮酸钠的作用是什么？

丙酮酸钠可以作为细胞培养中的替代碳源，尽管细胞更倾向于以葡萄糖作为碳源，但是，如果没有葡萄糖的话，细胞也可以代谢丙酮酸钠。

目录上说，Hank's 平衡盐溶液(HBS)要在空气中使用，不需要 CO₂ 培养箱。原因是什么？Hank's 平衡盐溶液(HBS)和 Earle's 平衡盐溶液(EBS)有什么本质的功能差别？

HBS 和 EBS 的主要差别在于碳酸氢钠的水平，在 Eagles (2.2g/L)中比在 Hanks (0.35g/L) 中高。碳酸氢钠需用高水平的 CO₂ 平衡，以维持溶液的 PH 值。Eagles 液在空气水平的 CO₂ 中，溶液会变碱，Hanks 液在 CO₂ 培养箱中会变酸。如果希望在 CO₂ 培养箱中保存组织，需要用 Eagles 液，。如果仅仅是清洗将要在细胞培养基中储存的组织，用 Hanks 液就可以了。

二价离子抑制胰蛋白酶活性吗？使用胰蛋白酶时加入 EDTA 的目的是什么？

二价离子的确抑制胰蛋白酶活性。EDTA 用来整合游离的镁离子和钙离子，以便保持抑制胰蛋白酶的活性。建议胰蛋白酶处理细胞前，用 EDTA 清洗细胞，以消除来自培养基中所有的二价离子。

我试用 SF900 II 时，细胞生长良好，但是我的蛋白产物不如使用 Graces 液和 10%胎牛血清时效果好。

如果目的蛋白是一个后期蛋白，它将与蛋白酶一起表达，这些蛋白酶将会作用于目的蛋白。在加有血清的培养基中，这些蛋白酶将作用到血清中的蛋白，从而使目的蛋白产品保持完好。在无血清配方中，蛋白酶作用的唯一底物是你的目的蛋白。为了避免这一问题，加入一些蛋白酶抑制剂或加入少量的血清（少于 1%），让血清给蛋白酶提供作用底物。

20° C 下配制的缓冲液，在较高或较低的温度下 PH 值会改变吗？

对于普通使用的缓冲液，PH 值随温度变化而变化。

下表列出温度改变 10℃时，PH 值的变化情况：

例如 20℃下配制 PH7.4 Tris 缓冲液, 40℃时 PH 值为 $7.4 - (2 \times 0.310) = 6.78$

缓冲系统 pKa/20℃ [Delta]pKa/10℃

Mes 6.15 -0.110
 Ada 6.60 -0.110
 Pipes 6.80 -0.085
 Aces 6.90 -0.200
 Bes 7.15 -0.160
 Mops 7.20 -0.013
 Tes 7.50 -0.200
 Hepes 7.55 -0.140
 Tricine 8.15 -0.210
 Tris 8.30 -0.310
 Bicine 8.35 -0.180
 Glycylglycine 8.40 -0.280

室温下(25)配制的 Tris-HCl 溶液, 在 37℃使用时 PH 值是多少?

缓冲液的 PH 值随温度变化而变化。下表列出了 50mM Tris-HC 溶液在 4℃, 25℃, 37℃ 时, 不同的 PH 值。

4° C	25° C	37° C
8.1	7.5	7.2
8.2	7.6	7.3
8.3	7.7	7.4
8.4	7.8	7.5
8.5	7.9	7.6
8.6	8.0	7.7
8.7	8.1	7.8
8.8	8.2	7.9
8.9	8.3	8.0
9.0	8.4	8.1
9.1	8.5	8.2

9.2	8.6	8.3
9.3	8.7	8.4
9.4	8.8	8.5

昆虫细胞培养的最适 PH 值和渗透压是多少？

生长培养基的 PH 值对细胞的增殖和病毒或重组蛋白的生产均会产生影响。对于大部分鳞翅类昆虫细胞系，在 PH 值 6.0~6.4 范围的大部分应用效果良好。培养鳞翅类昆虫细胞系时，培养基的最适渗透压是 345-380mOsm/kg.。为保证可靠和持久的细胞培养方式，减少技术问题，保持 PH 值和渗透压在以上所列的范围之内。

High Five 细胞有任何其它名称吗？

High Five 细胞也被称为 Trichoplasia ni 5B1-4 和 BTI-TN-5B1-4。

PFHM-II 和 HYBRIDOMA-SFM 之间有什么差别

PFHM-II (Protein-free Hybridoma Medium) 是不包含有蛋白质的单克隆抗体生产培养基。如果作为杂交瘤生产培养基使用，PFHM-II 可能需要补充低水平的血清。HYBRIDOMA-SFM 既是杂交瘤生产培养基，也是单克隆抗体生产培养基。它包含低水平的蛋白质。

在 High Five 无血清培养基中去污剂的浓度是多少？

High Five 无血清培养基中去污剂的浓度：0.025 g/L Tween-80, 1.0 g/L Pluronic Poly-all。

High Five 细胞用多大的密度冻存？

3.0x10E6 cells/ml。

在我的果蝇培养基中发现形成白色沉淀，加热后溶解。它是什么？对我的细胞有害吗？

可能是谷氨酰胺沉淀，但是更可能是 L-酪氨酸沉淀。培养基中谷氨酰胺的浓度比典型的 2mM 高 6 倍。酪氨酸的浓度比在 RPMI 1640 中高 25 倍，而且比谷氨酰胺更加难以溶解。沉淀也可能是不止一种成分的复合物。它可能是由于贮存在局部温度较低的地方



引起。只要沉淀在培养条件下可以溶解，对实验不会有不利的影响。

如何从 T25 瓶中转移 sf9 细胞？能用胰蛋白酶消化吗？

我们强力推荐使用脱落细胞的方法，因为这项技术破坏性最小，生活力最高。正如手册上所显示，通过使用巴斯德吸液管，让细胞上培养基流动。作为一种选择你也可以轻轻拍打培养瓶。只有在绝对必要的情况下，才使用胰酶消化细胞。

胰酶消化一个 T25 瓶的 sf9 细胞：

1. 去除培养基。
2. 用 2ml 1xPBS（足以覆盖细胞表面）洗涤细胞，去除 PBS。
3. 加入 2ml 1x 胰酶 EDTA（恰好覆盖细胞表面）。
4. 37 °C 孵育 5 到 10 分钟。在仪器下检测看到 5 分钟后它们正在向上移动。
5. 向细胞中加入 2ml 细胞培养液，移入锥形管，用 2ml 培养液洗瓶壁，移入同一锥形管中。（培养基中的 FBS 终止了胰酶的活性。）
6. 离心（1100rpm）沉淀细胞。去除培养基。
7. 用新的培养基重新悬浮细胞。传代。

在 Sf9, Sf21, 和 high Five 细胞悬浮培养时，肝素的使用量是多少？

为了防止悬浮培养细胞聚集的形成，使用肝素浓度为 10 单位/毫升细胞悬液。

在重新冻存 sf9 细胞前，它可以传多少代？随着传代的次数的增加，它的感染能力会降低吗？

通常情况当细胞经过 30 次传代后，应该返回冻存。无论什么时候计数时，都应该检查细胞活力。如果超过 95% 的细胞保持有活力和在大约 30 小时左右加倍，细胞仍然可以使用。如果活力和加倍时间下降，它们的感染力将不再有效。

Tech tips

- 贮存在冰箱中的瓶口已开的培养基，可能在放置几天后颜色变紫。这主要是由于在暴露到周围的 CO₂ 水平时，碳酸氢钠导致了 pH 值的上升。您可以在使用前松开瓶口，在 CO₂ 培养箱孵育培养基 10-15 分钟，来校正溶液的 pH 值（确定松开瓶口以保证气体交换）。
- 如果细胞培养基偶然被冻，您应该熔化培养基并观察是否有沉淀产生。如果没有沉淀产生，培养基可以正常使用，如果出现沉淀，只能丢弃这些培养基。
- 您要查找培养基成分表吗？您可以在 GIBCO™ 目录第一章的后面或在我们网站的技术资源部分找到。
- 当在无血清培养基中添加抗生素时，降低至少在有血清培养基中所使用浓度的 50%。血清蛋白会结合和灭活一些抗生素。在无血清培养条件下，抗生素不被灭活，可能对于细胞达到毒性水平。
- 一旦您在新培养基中添加了血清和抗生素时，您应该在两到三周内使用它。因为一些抗生素和血清中的基本成分在解冻后就开始降解。
- 总之，大部分添加物和试剂最多可以冻融 3 次，如果次数更多都会在包含蛋白的溶液引起一定水平的降解和沉淀，将会影响它的性能。
- 在进行传代培养时，我们强烈推荐进行台盼兰活性记数。研究者常常通过一个简单的稀释（1：4 或 1：2）进行传代，不进行活性检测，您可能接种比你认为的低的多的浓度的细胞，这常常可能导致生长缓慢或培养物根本不生长。
- 在溶解的一周内使用贮存在 4℃ 冰箱中的液体胰蛋白酶溶液。胰蛋白酶在 4℃ 就可能开始降解，如果在室温下放置超过 30 分钟，就会变得不稳定。
- GIBCO™ 产品的贮存期立足于实时稳定性研究结果。产品说明在超过指定的贮存期的一段时间内，产品仍然在可接受的范围内，但是由于在超过指定的效期后，产品的性能和稳定性没有检测，我们不推荐使用过了效期的产品。

细胞培养从头学

常用设备

准备室的设备：

单蒸馏水蒸馏器、双蒸馏水蒸馏器、酸缸、烤箱、高压锅、储品柜（放置未消毒物品）、储品柜（放置消毒过的物品）、包装台。配液室的设备：扭力天平和电子天平（称量药品）、PH计（测量培养用液PH值）、磁力搅拌器（配置溶液室搅拌溶液）。

培养室的设备：

液氮罐、储品柜（存放杂物）、日光灯和紫外灯、空气净化器系统、低温冰箱（-80℃）、空调、二氧化碳缸瓶、边台（书写实验记录）。必须放在无菌间的设备：离心机（收集细胞）、超净工作台、倒置显微镜、CO2孵箱（孵育培养物）、水浴锅、三氧消毒杀菌机、4℃冰箱（放置serum和培养用液）。

无菌操作

无菌室的灭菌：

1. 定期打扫无菌室：每周打扫一次，先用自来水拖地、擦桌子、超净工作台等，然后用3%来苏尔或者新洁尔灭或者0.5%过氧乙酸擦拭。
2. CO2孵箱（培养箱）灭菌：先用3%新洁尔灭擦拭，然后用75%酒精擦拭或者0.5%过氧乙酸，再用紫外灯照射
3. 实验前灭菌：打开紫外灯、三氧杀菌机、空气净化器系统各20-30分钟
4. 实验后灭菌：用75%酒精（3%新洁尔灭）擦拭超净台、边台、倒置显微镜的载物台。

实验人员的无菌准备：

1. 肥皂洗手。
2. 穿好隔离衣、带好隔离帽、口罩、放好拖鞋
3. 用75%酒精棉球擦净双手。

无菌操作的演示：

1. 凡是带入超净工作台内的酒精、PBS、培养基、胰蛋白酶的瓶子均要用75%酒精

擦拭瓶子的外表面

2. 靠近酒精灯火焰操作。
3. 器皿使用前必须过火灭菌
4. 继续使用的器皿（如瓶盖、滴管）要放在高处，使用时仍要过火。
5. 各种操作要靠近酒精灯，动作要轻、准确，不能乱碰。如吸管不能碰到废液缸。
6. 吸取两种以上的使用液时要注意更换吸管，防止交叉污染。

器械的清洗和消毒

玻璃器械洗消：

一、新的玻璃器皿的洗消：

1. 自来水刷洗，除去灰尘。
2. 烘干、泡盐酸：烤箱中烘干，然后再浸入5%稀盐酸中12小时以除去脏物、铅、砷等物。
3. 刷洗、烘干：12小时后立即用自来水冲洗，再用洗涤剂刷洗，自来水冲干净后用烤箱烘干。
4. 泡酸、清洗：用清洁液（重铬酸钾120g：浓硫酸200ml：蒸馏水1000ml）浸泡12小时，然后从酸缸内捞出器皿用自来水冲洗15次，最后蒸馏水冲洗3-5次和用双蒸水过3次。
5. 烘干、包装：洗干净后先烘干，然后用牛皮纸（油光纸）包装。
6. 高压消毒：包装好的器皿装入高压锅内盖好盖子，打开开关和安全阀，当蒸气成直线上升时，关闭安全阀，当指针指向15磅时，维持20-30分钟。
7. 高压消毒后烘干

二、旧的玻璃器皿的洗消：

1. 刷洗、烘干：使用过的玻璃器皿可直接泡入来苏尔液或洗涤剂溶液中，泡过来苏尔溶液（洗涤剂）的器皿要用清水刷洗干净，然后烘干。
 2. 泡酸、清洗：烘干后泡入清洁液（酸液），12小时后从酸缸内捞出器皿立即用自来水冲洗（避免蛋白质干涸后粘附于玻璃上难以清洗），再用蒸馏水冲洗3次。
 3. 烘干、包装：洗干净的器皿烘干后取出用牛皮纸（油光纸）等包装，以便于消毒储存及防止灰尘和再次被污染。
 4. 高压消毒：包装好的器皿装入高压锅内，盖好盖子，打开开关和安全阀，随着温度的上升安全阀冒出蒸气，当蒸气成直线冒出3-5分钟后，关闭安全阀，气压表指数随之上升，当指针指向15磅时，调节电开关维持20-30分钟即可。（玻璃培养瓶消毒前可将胶帽轻轻盖上）
 5. 烘干备用：因为高压消毒后器皿会被蒸气打湿，所以要放入烤箱内烘干备用。
- 金属器械洗消：

金属器皿不能泡酸，洗消时可先用洗涤剂刷洗，后用自来水冲干净，然后用75%酒精擦拭，再用自来水，然后用蒸馏水冲洗，再烘干或空气中晾干。放入铝制盒内包装好在高压锅内15磅高压（30分钟）消毒，再烘干备用。

橡胶和塑料：

橡胶和制品通常处理方法是：先用洗涤剂洗刷干净，再分别用自来水和蒸馏水冲干净，再用烤箱烘干，然后根据不同品质进行如下的处理程序：

1. 针式滤器帽不能泡酸液，用NaOH泡6-12小时，或者煮沸20分钟，在包装之前要装好滤膜两张，安装滤膜时注意光面朝上（凹向上），然后将螺旋稍微拧松一些，放入铝盒中在高压锅内15磅30分钟消毒，再烘干备用。注意在超净台内取出使用时应该立即将螺旋旋紧。

2. 胶塞烘干后用2%氢氧化钠溶液煮沸30分钟（用过的胶塞只要用沸水处理30分钟），自来水洗净，烘干。然后再泡入盐酸液30分钟，再用自来水，蒸馏水，三蒸水洗净，烘干。最后装入铝盒内高压消毒，烘干备用。

3. 胶帽，离心管帽烘干后只能在2%氢氧化钠溶液中浸泡6-12小时（切记时间不能过长），自来水洗净，烘干。然后再泡入盐酸液30分钟，再用自来水，蒸馏水，三蒸水洗净，烘干。最后装入铝盒内高压消毒，烘干备用。

4. 胶头可用75%酒精浸泡5分钟，然后紫外照射后使用即可。

5. 塑料培养瓶，培养板，冻存管：

6. 其他消毒方法：有的物品既不能干燥消毒，又不能蒸气消毒，可用70%酒精浸泡消毒。塑料培养皿打开盖子，放在超净台台面上，直接暴露在紫外线下消毒。也可用氧化乙烯消毒塑料制品，消毒后需要用2—3周时间洗除残留的氧化乙烯。用20000—100000rad的r射线消毒塑料制品效果最好。为了防止清洗器材已消毒与未消毒发生混淆，可在纸包装后，用密写墨水作好标记。其法即用沾水笔或毛笔沾以密写墨水，在包装纸上作一记号，平时__这种墨水不带痕迹，一经高温，即出现字迹，从而可以判定它们是否消毒。密写墨水的配制：氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)2g，30%盐酸10ml，蒸馏水88ml。

注意事项：

1. 严格执行高压锅的操作规程：高压消毒时，先检查锅内是否有蒸馏水，以防高压时烧干，水不能过多因为其将使空气流畅受阻，会降低高压消毒效果。检查安全阀是否通畅，以防高压时爆炸。

2. 安装滤膜时注意光面朝上：注意滤膜光滑一面是正面，要朝上，否则起不到过滤的作用。

3. 注意人体的防护和器皿的完全浸泡：A. 泡酸时要戴耐酸手套，防止酸液溅起伤害人体。B. 从酸缸内捞取器皿时防止酸液溅到地面，会腐蚀地面。C. 器皿浸入酸液中要完全，不能留有气泡，以防止泡酸不彻底。

细胞培养用液的配制与消毒

器材与试剂:

干粉型培养基、胰蛋白酶, 青霉素、链霉素. 纯净水系统、电子天平、PH计、磁力搅拌器。

具体步骤:

一. 水的制备:

细胞培养用水必须非常纯净, 不含有离子和其他的杂质。需要用新鲜的双蒸水、三蒸水或纯净水

二.PBS的制备与消毒(也可用于其它BSS, 如: Hanks, D-Hanks液的配制):

1. 溶解定容: 将药品 (NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ • H₂O 1.56g, KH₂PO₄ 0.2g) 倒入盛有双蒸水的烧杯中, 玻璃棒搅动, 充分溶解, 然后把溶液倒入容量瓶中准确定容至1000ml, 摇匀即成新配制的PBS溶液。

2. 移入溶液瓶内待消毒: 将PBS倒入溶液瓶(大的吊针瓶)内, 盖上胶帽, 并插上针头放入高压锅内8磅消毒20分钟。注意高压消毒后要用灭菌蒸馏水补充蒸发掉的水份。

三. 胰蛋白酶溶液的配制与消毒:

胰蛋白酶的作用是使细胞间的蛋白质水解从而使细胞离散。不同的组织或者细胞对胰酶的作用反应不一样。胰酶分散细胞的活性还与其浓度、温度和作用时间有关, 在pH为8.0、温度为37℃时, 胰酶溶液的作用能力最强。使用胰酶时, 应把握好浓度、温度和时间, 以免消化过度造成细胞损伤。因Ca²⁺、Mg²⁺和血清、蛋白质可降低胰酶的活性, 所以配制胰酶溶液时应选用不含Ca²⁺、Mg²⁺的BSS, 如: D-Hanks液。终止消化时, 可用含有血清培养液或者胰酶抑制剂终止胰酶对细胞的作用。

1. 称取胰蛋白酶: 按胰蛋白酶液浓度为0.25%, 用电子天平准确称取粉剂溶入小烧杯中的双蒸水(若用双蒸水需要调PH到7.2左右)或PBS(D-hanks)液中。搅拌混匀, 置于4℃内过夜。

2. 用注射滤器抽滤消毒: 配好的胰酶溶液要在超净台内用注射滤器(0.22微米微孔滤膜)抽滤除菌。然后分装成小瓶于-20℃保存以备使用。

四.青、链霉素溶液的配制于消毒

1. 所用纯净水(双蒸水)需要15磅高压20分钟灭菌。

2. 具体操作均在超净台内完成。青霉素是80万单位/瓶, 用注射器加4ml灭菌双蒸水。链霉素是100万单位/瓶, 加5ml灭菌双蒸水, 即每毫升各为20万单位。

3. 使用时溶入培养液中, 使青链霉素的浓度最终为100单位/ml。1单位=1微克?

五.RPMI1640的制备与消毒:

1. 溶解、调PH值、定容: 先将培养基粉剂加入培养液体积2/3的双蒸水中, 并用双蒸水冲洗包装袋2-3次(冲洗液一并加入培养基中), 充分搅拌至粉剂全部溶解, 并按照

包装说明添加一定的药品. 然后用注射器向培养基中加入配制好的青链霉素液各0.5ml, 使青链霉素的浓度最终各为100单位/ml。然后用一个当量的盐酸和NaOH调PH到7.2左右。最后定容至1000ml, 摇匀。

2. 安装蔡式滤器: 安装时先装好支架, 按规定放好滤膜, 用螺丝将不锈钢滤器和支架连接好。然后卸下支架腿分别用布包好待消毒。

3. 抽滤: 配制好的培养液通常用滤器过滤除菌。通常用蔡式滤器在超净工作台内过滤。

4. 分装: 将过滤好的培养液分装入小瓶内置于4℃冰箱内待用。

5. 使用前要向100ml培养液中加入1ml谷氨酰胺溶液(4℃时两周有效)。

六. 血清的灭活:

细胞培养常用的是小牛血清, 新买来的血清要在56℃水浴中灭活30分钟后, 再经过抽滤方可加入培养基中使用。

七. HEPES 溶液:

HEPES 的化学全称位羟乙基呱嗪乙硫磺酸 (N'-a-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid)。对细胞无毒性作用。它是一种氢离子缓冲剂, 能较长时间控制恒定的pH范围。使用终浓度为10-50mmol/L, 一般培养液内含20mmol/LHEPES即可达到缓冲能力。

1mol/L HEPE缓冲液配制方法如下:

准确称取HEPTS 238.3g, 加入新鲜三蒸水定容至1L。过滤除菌, 分装后4℃保存。

注意: 因为现在市售HEPES为约10g包装的小瓶, 所以可根据实际情况灵活配制, 但是要保证培养液内HEPES的终浓度仍然为20mmol/L。如: 称取4.766克HEPES溶于20ml三蒸水中, 过滤除菌后可完全(20ml)加入1L培养液中, 或者每100ml培养液中加入2ml即可。

八. 谷氨酰胺:

合成培养基中都含有大量的谷氨酰胺, 其作用非常重要, 细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质, 谷氨酰胺缺乏会导致细胞生长不良甚至死亡。在配制各种培养液中都应该补加一定量的谷氨酰胺。由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定, 4℃下放置1周可分解50%, 故应单独配制, 置于-20℃冰箱中保存, 用前加入培养液。加有谷氨酰胺的培养液在4℃冰箱中储存2周以上时, 应重新加入原来的谷氨酰胺。一般培养液中谷氨酰胺的含量为1~4mmol/L。可以配制200mmol/L谷氨酰胺液贮存, 用时加入培养液。配制方法为, 谷氨酰胺2.922g溶于三蒸水加至100ml即配成200mmol/L的溶液, 充分搅拌溶解后, 过滤除菌, 分装小瓶, -20℃保存, 使用时可向100ml培养液中加入1ml谷氨酰胺溶液。

九.肝素溶液的配制:

含有肝素的培养液可以使内皮细胞纯度提高, 肝素加入全培养液中最终浓度为50ug/ml。因为现在市售的多为肝素钠, 包装为约为0.56克/瓶, 配制时, 可将其溶于100ml三蒸水中, 定容, 过夜, 然后过滤除菌, 分装小瓶, 保存温度为℃。使用时, 向100ml培养液中加入1ml (精确可加入0.9ml) 即可。

十. I 型胶原酶:

0.1% I 型胶原酶溶液同胰蛋白酶一样配制和消毒灭菌。注意: 因为 I 型胶原酶分子颗粒比胰酶大, 不容易过滤, 因此可以用蔡式滤器过滤除菌。分装入10ml小瓶-20℃保存。

十一.明胶溶液:

因为明胶难于过滤, 所以配制0.1%明胶溶液必须用无菌的PBS配制。所以制备过程中必须要注意无菌操作。首要的问题是如何无菌准确称量0.1克 (配成100ml溶液) 一即解决无菌分装药品的问题。其次要注意即使是0.1%的溶液, 明胶也难溶, 因此要充分摇匀, 过夜放置, 然后无菌分装入50ml小瓶中, 4℃保存。

其他培养用液的配制:

20ug/ml内皮生长因子,

注意事项:

1. 配制溶液时必须用新鲜的蒸馏水。
2. 安装蔡式滤器时通常使用孔径0.45微米 和0.22微米滤膜各一张, 放置位置为0.45的位于0.22微米的滤膜上方, 并且要特别注意滤膜光面朝上。
3. 配制RPMI1640培养基时因为还要加入小牛血清, 而小牛血清略偏酸性, 为了保证培养液PH值最终为7.2, 可在配制时调PH至7.4。

细胞传代培养 (消化法)

具体操作:

一. 传代前准备:

1. 预热培养用液: 把已经配制好的装有培养液、PBS液和胰蛋白酶的瓶子放入37℃水浴锅内预热。
2. 用75%酒精擦拭经过紫外线照射的超净工作台和双手。
3. 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。
4. 点燃酒精灯: 注意火焰不能太小。
5. 准备好将要使用的消毒后的空培养瓶, 放入微波炉内高火, 8分钟再次消毒。
6. 取出预热好的培养用液: 取出已经预热好的培养用液, 用酒精棉球擦拭好后方能放入超净台内。
7. 从培养箱内取出细胞: 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。
8. 打开瓶口: 将各瓶口一一打开, 同时要在酒精灯上烧口消毒。

二. 胰蛋白酶消化;

1. 加入消化液: 小心吸出旧培养液, 用PBS清洗(冲洗), 加入适量消化液(胰蛋白酶液), 注意消化液的量以盖住细胞最好, 最佳消化温度是37℃。
2. 显微镜下观察细胞: 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。
3. 吸弃消化液加入培养液: 弃去胰蛋白酶液, 注意更换吸管, 加入新鲜的培养液。

三. 吹打分散细胞:

1. 吹打制悬: 用滴管将已经消化细胞吹打成细胞悬液。
2. 吸细胞悬液入离心管: 将细胞悬液吸入10ml离心管中。
3. 平衡离心: 平衡后将离心管放入台式离心机中, 以1000转/分钟离心6-8分钟。
4. 弃上清液, 加入新培养液: 弃去上清液, 加入2ml培养液, 用滴管轻轻吹打细胞制成细胞悬液。

四. 分装稀释细胞:

1. 分装: 将细胞悬液吸出分装至2-3个培养瓶中, 加入适量培养基旋紧瓶盖。
2. 显微镜下观察细胞: 倒置显微镜下观察细胞量, 必要是计数。注意密度过小会影响传代细胞的生长, 传代细胞的密度应该不低于 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。最后要做好标记。

五.继续培养:

用酒精棉球擦拭培养瓶,适当旋松瓶盖,放入CO₂培养箱中继续培养。传代细胞2小时后开始贴附在瓶壁上。当生长细胞铺展面积占培养瓶底面积25%时为一个+,占50%为++,占75%时为+++。

传代细胞培养注意事项:

1. 严格的无菌操作
2. 适度消化:消化的时间受消化液的种类、配制时间、加入培养瓶中的量等诸多因素的影响,消化过程中应该注意培养细胞形态的变化,一旦胞质回缩,连接变松散,或有成片浮起的迹象就要立即终止消化。

附: EDTA (0.02% 乙二胺四乙酸二钠) 消化液配方:

EDTA 0.20g, NaCl 8.00g, KCl 0.20g, KH₂PO₄ 0.02g, 葡萄糖 2.00g, 0.5% 酚红 4ml, 加入蒸馏水定容至1000ml。10磅20min高压灭菌,使用时调节PH值到7.4。注意EDTA不能被血清中和,使用后培养瓶要彻底清洗,否则再培养时细胞容易脱壁。

细胞的复苏

细胞复苏的原则—快速融化: 必须将冻存在-196℃液氮中的细胞快速融化至37℃,使细胞外冻存时的冰晶迅速融化,避免冰晶缓慢融化时进入细胞形成再结晶,对细胞造成损害。

具体操作

一. 实验前准备:

1. 将水浴锅预热至37℃
2. 用75%酒精擦拭紫外线照射30min的超净工作台台面。
3. 在超净工作台中按次序摆放好消过毒的离心管、吸管、培养瓶等等。

二. 取出冻存管:

1. 根据细胞冻存记录按标签找到所需细胞的编号。
2. 从液氮罐中取出细胞盒,取出所需的细胞,同时核对管外的编号。

三. 迅速解冻:

1. 迅速将冻存管投入到已经预热的水浴锅中迅速解冻,并要不断的摇动,使管中的液体迅速融化。
2. 约1-2min后冻存管内液体完全溶解,取出用酒精棉球擦拭冻存管的外壁,再拿入超净台内。

四. 平衡离心:

用架盘天平平衡后，放入离心机中3000r/min 离心3min

五. 制备细胞悬液：

1. 吸弃上清液。
2. 向离心管内加入10ml培养液，吹打制成细胞悬液。

六. 细胞计数：

细胞浓度以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 为宜。

七. 培养细胞

将复合细胞计数要求的细胞悬液分装入培养瓶内，将培养瓶放入37℃和5%CO₂的培养箱内2-4小时（或者24-48小时）后换液继续培养培养，换液的时间由细胞情况而定。

初学者易犯错误：

1. 水浴锅未预热或者未预热到37℃。
2. 水浴锅内冻存管太多，导致传热不佳，使融化时间延长。
3. 离心前忘记平衡，导致离心机损坏和细胞丢失。
4. 一次复苏细胞过多，忘记更换吸头和吸管，导致细胞交叉污染。

细胞计数

实验原理：当待测细胞悬液中细胞均匀分布时，通过测定一定体积悬液中的细胞的数目，即可换算出每毫升细胞悬液中细胞的细胞数目。

具体操作：

一. 准备工作：

取一瓶传代的细胞，按照《传代细胞培养（消化法）》中的传代方法繁殖细胞，待长成单层后以被使用。

二. 细胞悬液制备：

细胞悬液的制备方法是用0.25%的胰蛋白酶液消化、PBS液洗涤后，加入培养液（或Hanks液或PBS等平衡盐溶液），吹打制成待测细胞悬液。

三. 细胞计数：

1. 盖好盖玻片：取一套血球计数板，将特制的盖玻片盖在血球计数槽上。
2. 制备计数用的细胞悬液：用吸管吸5滴细胞悬液到一离心管中，加入5滴台盼蓝染液（0.4%）或苯胺黑，活细胞不会被染色，加入染液后就可以在显微镜下区别活细胞和死细胞。
3. 将细胞悬液滴入计数板：将待测细胞悬液吹均匀，然后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，也不能让悬液流入旁边槽中。
4. 统计四个大格的细胞数：将血球计数板放于显微镜的低倍镜下观察，并移动计数板，当看到镜中出现计数方格后，数出四角的四个大格（每个大格含有16个中格）

中没有被染液染上色的细胞数目。

5. 计算原细胞悬液的细胞数:按照下面公式计算细胞密度:

$$(\text{细胞悬液的细胞数}) / \text{ml} = (\text{四个大格子细胞数} / 4) \times 2 \times 10^4$$

说明: 公式中除以4因为计数了4个大格的细胞数。

公式中乘以2因为细胞悬液于染液是1: 1稀释。

公式中乘以104因为计数板中每一个大格的体积为:



1. 0mm（长）×1. 0mm（宽）×0. 1mm（高）=0. 1mm³ 而 1ml=1000mm³

四. 细胞计数要点:

1. 进行细胞计数时，要求悬液中细胞数目不低于10⁴个/ml，如果细胞数目很少要进行离心再悬浮于少量培养液中；
2. 要求细胞悬液中的细胞分散良好，否则影响计数准确性。
3. 取样计数前，应充分混匀细胞悬液，尤其时多次取样计数时更要注意每次取样都要混匀，以求计数准确；
4. 数细胞的原则是只数完整的细胞，若细胞聚集成团时，只按照一个细胞计算。如果细胞压在格线上时，则只计上线，不计下线，只计右线，不计左线。
5. 操作时，注意盖片下不能有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中，否则要重新计数。

五. 初学者易犯的错误:

1. 计数前未将待测悬液吹打均匀。
2. 滴入细胞悬液时盖玻片下出现气泡。
3. 滴入悬液时的量太多，至使细胞悬液流入旁边的槽中。

六. 本实验特殊试剂的配制:

4%台盼蓝母液：称取4克台盼蓝，加入少量蒸馏水研磨，加双蒸水至100毫升，用滤纸过滤，4℃保存。

使用液：使用时，用PBS稀释母液至0. 4%即可。

细胞的冻存

1. 先将冻存管放入4℃冰箱，约40min。
2. 接着置于-20℃冰箱，约30-60min。
3. 置于-80超低温冰箱中放置过夜。
4. 置于液氮罐中长期保存。
5. 同时做好冻存记录，在自己的笔记本和冻存记录本上均要记录。

注意事项:

1. 使用DMSO前，不需要进行高压灭菌，它本身就有灭菌的作用。高压灭菌反而会破坏它的分子结构，以至于降低冷冻保护效果。在常温下，DMSO对人体有害，故在配制时最好戴上手套操作。
2. 不宜将冻存细胞放置在0℃~-60℃这一温度范围内过久，低温损伤主要发生在这一温度区内，是“危险温区”。
3. 注意定期检查液氮罐内液氮量，及时添加。



细胞培养技术中的关键因素

细胞操作功夫在手！

一、准备工作对开展细胞培养异常重要，推备工作中某一环节的疏忽可导致实验失败或无法进行。准备工作的内容包括器皿的清洗、干燥与消毒，培养基与其他试剂的配制、分装及灭菌，无菌室或超净台的清洁与消毒，培养箱及其他仪器的检查与调试等。

1.清洁、消毒、液体

直接接触细胞的用品要超净处理——无非必须分子

直接接触细胞的用品要彻底消除微生物

超净和消毒过的样品要绝对密闭保存，标记消毒时间

实验室保持洁净，随时消毒

尽量采用商品化一次性用品

操作者也要清洁和消毒

缓冲液要符合生理渗透压（280~310 mOsm）和 pH（7.2~ 7.4 ）

2.玻璃器皿超净

去污剂煮沸 30min（超声波震荡 30min）温水刷洗 流水冲洗 酸性洗涤液浸泡 流水冲洗 蒸馏水冲洗 纯水漂洗 在洁净温箱中烤干 密封消毒

3.消毒

干热——玻璃器皿 160℃，120min

湿热（高压，120 ℃ ） 10~20 磅，20~30min

紫外线——空气

消毒剂——场面

微孔过滤——液体 0.22um、0.45um

二、细胞生长的条件和培养基要求：选择合适的培养基，保证全过程的无菌

细胞的营养需要：氨基酸、维生素、碳水化合物、无机离子、蛋白质、促生长因子。其中很多成分系用血清、胚胎浸出液等提供，在很多情况下还需加入 10%的胎牛或新生牛血清。

培养基的制备：a..浓度要准—渗透压、b. 酸碱度要适宜—酸度计

细胞的生存环境：a.. 温度、b.气相、 c.渗透压——290mmol/L

三、实验者的操作技术——细胞操作功夫在手！



上皮细胞培养

1) 表皮细胞培养

1. 取材：取外科植皮或手术残余皮肤小块，以角化层薄者为佳，早产流产儿皮肤更好，切成 0.5~1 平方厘米小块。
2. EDTA 处理：先置入 0.02% EDTA 中室温置 5 分钟。
3. 冷消化：换入 0.25% 胰蛋白酶中，置 4℃ 过夜。
4. 分离：取出皮肤，用血管钳或镊子把表皮与真皮层分开。
5. 温消化：取出表皮单独处理，用剪刀剪成更小的块后，置入新的 0.25% 胰蛋白酶中，37℃ 再消化 30~60 分钟。
6. 用吸管轻轻反复吹打，使成细胞悬液。
7. 培养液：通过 80 目不锈钢纱网滤过后，低速离心，吸上清，直接加入 Eagle 液和 20% 小牛血清，制成细胞悬液，接种入碟皿中，CO₂ 温箱培养。

2) 乳腺组织培养

直接培养法：（适于培养含纤维少的软组织）

1. 在含有少量培养液或 Hanks 液的容器中，用锋利刀片将组织反复切割成碎块。
2. 把组织碎块连同液体注入离心管中，再补加少许培养液，用吸管吹打片刻，置试管架 3~5 分钟。吸除上层液可排除非乳腺细胞部分。重复 2~3 次。
3. 末次处理结束后，向沉降管中再补加培养液，用吸管稍吹打，使沉降物重悬。不待细胞团块下降立即通过 3~4 层无菌纱布滤入另管中。
4. 调整好适宜密度，接种入培养瓶中培养。



胶原酶消化法：（适于处理含纤维多的较硬组织）
其过程与培养其它组织相同。

3) 胃上皮细胞培养

1. 取材：取胃溃疡或胃癌手术切除胃标本远端非病变区粘膜少许。
2. 清洗：用含庆大霉素（400 微克/毫升）和二性霉素（2 微克/毫升的 Hanks）液漂洗后，用钝器剥离下粘膜，剪成 1mm³ 大小。
3. 消化：在 I 型胶原酶和透明质酸酶中，于 37℃ 中消化 80 分钟。
4. 离心：收集细胞悬液，800 转/分离心后，Hanks 液漂洗两次。
5. 接种：末次离心后加入含有 1%~2% 胎牛血清的完全培养基，接种入不同孔数的培养板中，接种量依不同实验目的而定。

4) 肝细胞培养

初代组织块培养：

取新鲜肝脏，先剥除被膜和血管等纤维成分，用刀或剪刀把肝脏剪成 1mm³ 左右的小块，采用贴壁培养法。

初代消化法培养：

1. 把肝组织切成 2~4 立方毫米的小块，用不含钙镁的 BSS 液洗两次。
 2. 移入 1: 1 的 0.1% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶（都用无钙镁 BSS 配置）中，4℃ 冷消化 10~12 小时后，通过 250 微米和 64 微米尼龙网或不锈钢纱网滤过。
 3. 收集细胞、BSS 液洗 1~2 次、计数、接种培养。
- 消化培养肝细胞的另一种方法是灌流法；肝脏灌流需用全肝，以较小动物如小鼠和大鼠为好。
1. 无菌解剖动物，取出肝脏，先用 BSS 洗除血污。
 2. 取 5ml 注射器一支，吸取消化液后，把注射器头轻轻插入肝管中，用线绳结扎牢固，以防消化液漏出，轻轻把消化液注入肝管系统，并不时轻揉压肝脏，以便消化液进入肝小叶中；消化液在肝内停留 20~30 分后，在吸出消化液的同时并轻揉压肝脏，以使肝细胞脱落和消化液吸出。
 3. 待吸净消化液后，注入离心管中，低速离心分离，用 RPMI 1640 培养基培养（较其它培养基为好），能获得较纯的肝上皮细胞和获较好的效果。

传代培养：

待细胞生长连接成片后，用 BSS 洗一二次，加 1: 1 的 0.025% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混



合消化 3~5 分钟，待细胞回缩，便停止消化，弃掉消化液，用 BSS 洗一二次，注入营养液，吹打，制成细胞悬液，再接种培养。

5) 内皮细胞培养

1. 取产后的新鲜脐带。如不立即培养可以保存于 4℃ 中，但不宜超过 12 小时。无菌剪取长 10~15 厘米一段。其它如胚胎和幼体动物的大血管，亦可用于培养。
2. 先用三通注射器吸温 PBS 液注入脐带的静脉中，洗除残血，注入口处宜用线绳结扎，以防液体返流。
3. 用血管钳夹紧脐带一端，从另端向脐静脉中徐徐注入最终浓度为 0.1% 的胶原酶，待末端出现液体后结扎之，令充满血管，注入口亦应结扎，以防液体返流，消化 3~10 分钟。
4. 吸出含有内皮细胞的消化液，注入离心管中，为获取更多细胞，可再注入温 PBS 冲洗 2~3 次彻底清除干净残余细胞，一并注入离心管中离心。
5. 吸除上清，加 1640 培养液，制成细胞悬液，接种入瓶皿中培养，顺利时 2~3 天内细胞即可长成单层。

6) 毛细血管内皮细胞培养

肿瘤条件培养基制备：

1. 取 C3H 小鼠的 S-180 实体肉瘤组织。
2. 胰蛋白酶消化，Dulbecco 改良 Eagle 氏培养液 15ml (含 10% 小牛血清)，接种到 T-75 Falcon 产培养瓶中培养。
3. 在细胞生长接近完全汇合时，收集培养液制成条件培养基；再用含 10% 小牛血清的新培养液后，也每隔两天收集一次，可获得多量条件培养基。
4. 4000 转/分离心后，再通过 0.22 μm 微孔滤膜滤过，-20℃ 冻存备用（临用前融解）。

初代培养：

1. 取材：取新鲜牛肾上腺数个，先用 Hanks 液洗除血污。
2. 剥除被膜，分离出皮质，切成 1 立方毫米小块，加 0.5% 胶原酶室温中消化 1 小时，每隔 10 分钟用吸管吹打悬液令消化充分。
3. 通过不锈钢纱网滤过，网眼要求只允许能通过小于 110 微米长的毛细血管小段。
4. 650rpm，4℃，离心 7 分钟后，弃掉上清胶原酶。
5. 沉淀物用培养液重悬并离心，再重悬，再离心，共两次。
6. 末次沉淀物仍用含有 10% 小牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 氏培养液重悬后，稍吹打。
7. 接种于铺有明胶底层的培养皿中，37℃ 培养，在培养头 1~3 小时中，毛细血管小段和内皮细胞最先贴附于底物上，而肾上腺细胞和成纤维细胞却仍在培养液中漂浮。



8. 趁此时, 吸除培养液, 再加入肿瘤条件培养液, 每两天换液一次。毛细血管小段一般成自 1~4 个内皮细胞, 以后每个小段在底物上慢慢展成特殊形态的细胞岛, 能持续 2~5 天。

毛细血管内皮细胞分离培养:

1. 初代培养 2~3 天后, 镜下确认几个毛细血管内皮细胞岛, 在培养皿背面, 用不脱色笔划圈圈起。
2. 镜下检查, 如圈内残有非内皮细胞时, 可用显微细针在倒置显微镜下挑除。此操作用细胞解剖器或用手操作均可, 宜在净化台无菌气流中、打开培养皿盖进行, 但时间不宜过长 (15~20 分钟), 圈内非内皮细胞可用无菌胶刮除。
3. 用培养液漂洗两次, 以去除漂浮细胞。
4. 剩余内皮细胞岛如小 (5~20 个细胞) 而少时, 生长增值变得缓慢或不完全不生长, 此时需加入 3T3 等饲细胞, 饲细胞接种量为 4000 细胞/cm²。
5. 当内皮细胞充满所有饲细胞空间后, 用胰蛋白酶消化、离心、加入肿瘤条件培养基。
6. 接种入明胶底物皿中继续培养 (饲细胞死亡淘汰), 细胞增殖生长汇合后, 按 1: 5 传代。

神经组织细胞培养

1. 获取脑组织后, 先仔细剥除脑膜和血管等纤维成分, 置入 Hanks 液中漂洗 1~2 次后, 置于 30~50 倍的 Hanks 液中, 脑组织比较柔软, 反复吹打即可制成细胞悬液。
2. 为排除脂肪成分和其它碎块, 把悬液注入离心管中, 在室温直立 5~10 分钟后, 细胞或细胞团块自然下沉, 脂肪等杂物易漂浮于悬液表层, 吸除上清, 如此反复二三次可获得较多的细胞成分。
3. 向末次沉淀物中加入适量营养液, 通过纱网或纱布滤过, 计数细胞并调整好细胞密度, 接种入培养瓶或皿中, 置 5%CO₂ 温箱中培养。
4. 细胞生长汇合后, 可用 0.25% 胰蛋白酶消化法做传代处理, 加消化液的量以能覆盖细胞层即可, 待细胞开始从瓶壁脱离 (平均 5~10 分钟), 加入含有血清培养液, 吹打制成细胞悬液。



结缔组织类细胞培养

1) 成纤维细胞培养

用人或动物胚体为好；动物可用小鼠或鸡胚，去头和内脏，剪成小碎块后，用胰蛋白酶消化法培养；如为人胚，可取皮肤培养。幼儿包皮是培养成纤维细胞的很好对象。

2) 巨噬细胞培养

1. 实验前三天，向每只小鼠腹腔内注入无菌硫羟乙酸肉汤 1ml（勿注入肠内）。
2. 引颈杀死动物，手提鼠尾将全鼠浸入 70% 酒精中 3~5 秒。
3. 置动物于解剖台上，用针头固定四肢，双手持镊撕开皮肤拉向两侧，暴露出腹膜，但勿伤及腹膜壁。
4. 再用 70% 酒精擦洗腹膜壁后，用注射器吸 10ml Eagle 液注入腹腔中，同时从两侧用手指揉压腹膜壁，令液体在腹腔内充分流动。
5. 用针头轻轻挑起腹壁，使动物体微倾向一侧，使腹腔中液体集于针头下吸取入针管内。
6. 小心拔出针头，把液体注入离心管中，250g 4℃ 离心 10 分钟，去上清，加 10 ml Eagle 培养基。
7. 计数细胞，每只小鼠可产生 $20\sim 30 \times 10^5$ 细胞，其中 90% 为巨噬细胞。
8. 为获取 3×10^5 个贴附细胞/平方厘米，需接种 2.5×10^6 /ml。
9. 为纯化培养细胞，去除其它白细胞，接种数小时后，去除培养液，用 Eagle 液冲洗 1~2 次后，再加新 Eagle 培养液置 37℃ CO₂ 温箱中培养。

肌组织细胞培养

1) 骨骼肌细胞培养

1. 杀死动物，无菌取大腿肌组织，切成 0.3~0.5 厘米小块。
2. 用不含钙镁离子的 Hanks 液配的 0.25% 胰蛋白酶消化，无菌纱布网或纱布滤过，合成培养



基加 10% 小牛血清培养，为促进分化可加 1% 的胎汁。

3. 细胞接种量为 2×10^6 /皿，接种在胶原或明胶的底物上能促进细胞分化。明胶制备比较简单，常用 Hanks 液配的 0.01% 明胶。

2) 肌细胞培养

1. 选新鲜受精鸡卵，置温箱中孵育（温箱中放有水槽，以维持箱内温度），每日翻动一次（180 度），孵育 9~12 天。

2. 取鸡胎法相间《组织培养和分子细胞学技术》53 页。

3. 用眼科剪剪开胸腔，剥出心脏，置入皿中用 Hanks 液漂洗 1~2 次。

4. 小心剪除大的动静脉，保留心室肌，用组织块或消化培养法均可。

细胞凋亡的几种检测方法

一、形态学观察方法

1、HE 染色、光镜观察：凋亡细胞呈圆形，胞核深染，胞质浓缩，染色质成团块状，细胞表面有“出芽”现象。

2、丫啶橙（AO）染色，荧光显微镜观察：活细胞核呈黄绿色荧光，胞质呈红色荧光。凋亡细胞核染色质呈黄绿色浓聚在核膜内侧，可见细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体。

3、台盼蓝染色：如果细胞膜不完整、破裂，台盼蓝染料进入细胞，细胞变蓝，即为坏死。如果细胞膜完整，细胞不为台盼蓝染色，则为正常细胞或凋亡细胞。此方法对反映细胞膜的完整性，区别坏死细胞有一定的帮助。

4、透射电镜观察：可见凋亡细胞表面微绒毛消失，核染色质固缩、边集，常呈新月形，核膜皱褶，胞质紧实，细胞器集中，胞膜起泡或出“芽”及凋亡小体和凋亡小体被临近巨噬细胞吞噬现象。

二、DNA 凝胶电泳

（一）、检测原理

细

胞发生凋亡或坏死，其细胞 DNA 均发生断裂，细胞内小分子量 DNA 片断增加，高分子 DNA 减少，胞质内出现 DNA 片断。但凋亡细胞 DNA 断裂点均有规律的

发生在核小体之间，出现 180—200bpDNA 片断，而坏死细胞的 DNA 断裂点为无特征的杂



乱片断，利用此特征可以确定群体细胞的死亡，并可与坏死细胞区别。

（二）结果判断

正常活细胞 DNA 电泳出现阶梯状 (LADDER) 条带；坏死细胞 DNA 电泳类似血抹片时的连续性条带。

三、酶联免疫吸附法 (ELISA) 核小体测定

凋亡细胞的 DNA 断裂使细胞质内出现核小体。核小体由组蛋白及其伴随的 DNA 片断组成，可由 ELISA 法检测。

（一）检测步骤

- 1、将凋亡细胞裂解后高速离心，其上清液中含有核小体；
- 2、在微定量板上吸附组蛋白体’
- 3、加上清夜使抗组蛋白抗体与核小体上的组蛋白结合 ‘
- 4、加辣过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体使之与核小体上的 DNA 结合’
- 4、加酶的底物，测光吸收制。

（二）用途

该法敏感性高，可检测 $5 \times 100/\text{ml}$ 个凋亡细胞。可用于人、大鼠、小鼠的凋亡检测。该法不需要特殊仪器，适合基层工作，但是不能精确测定凋亡细胞发生的绝多对量。

四、流式细胞仪定量分析

（一）检测原理

细胞发生凋亡时，其细胞膜的通透性也增加，但是其程度介于正常细胞与坏死细胞之间。利用这一特点，被检测细胞悬液用荧光素染色，利用流式细胞仪测量细胞悬液中细胞荧光强度来区分正常细胞、坏死细胞核凋亡细胞。

（二）应用价值

流式细胞仪检测具有以下特点：

- 1)、检测的细胞数量大，因此其反映群体细胞的凋亡状态比较准确
- 2)、可以做许多相关性分析
- 3)、结合被检测细胞的 DNA 含量的分析，可确定凋亡的细胞所处的细胞周期

■检测形态学及细胞膜完整性的 Hoechs-PI 双染色法

细胞发生凋亡时，其细胞膜的通透性液增加，但其程度介于正常细胞和坏死细胞之间，利用这一特点，被检测细胞悬液用荧光素染色，利用流式细胞仪检测细胞悬液中细胞荧光强度来区分正常细胞、坏死细胞和凋亡细胞。

利用 Hoechs-PI 染色法，正常细胞对染料有抗拒性，荧光染色很浅，凋亡细胞主要摄取 Hoecha 染料，呈现强蓝色荧光，而坏死细胞主要摄取碘化丙啶 (PI) 而呈强的红色荧光。

■DNA 片断原位标记法



凋亡细胞 DNA 片段原位末端检测技术是指在细胞（或组织）结构保持不变的情况下，用荧光素、地高辛或生物素标记的脱氧尿三磷酸

（deoxyuridinetriphate, DUTP）和末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）相反应与凋亡细胞裂解后 3' 的羟基（-OH）端结合，经显色反

应后检测 DNA 裂解点的技术。

DNA 片段原位标记法有二种：

- 1、原位缺口转移（in situ nick-translation, ISNT）技术，它是利用 DNA 多聚酶 I 将标记的核苷酸连接到断裂 DNA 的 3'-OH 端
- 2、原位缺口末端标记技术（in situ end labelling technique, ISEL），即 TUNEL 法，它是利用 TdT 将标记的 DUTP 接到 3'-OH 端。研究证明，TUNEL 法的敏感性远高于 ISNT，尤其对早期凋亡的检测，TUNEL 更为合适。

■检测细胞膜成分变化的 Annexin V 联合 PI 法

1、

原理：在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸（PS）迁移至细胞膜外侧。磷脂结合蛋白 V（Annexin

V）是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白，它于 PS 具有高度的结合力。因此，Annexin V 可以作为探针检测暴露在细胞外侧的磷脂酰丝氨酸。故利用对 PS 有高度亲和力的 Annexin V，将 Annexin

V 标记上荧光素（如异硫氰酸荧光素 FITC），同时结合使用 PI 拒染法（因坏死细胞 PS 亦暴露于细胞膜外侧，且对 PI 高染）进行凋亡细胞双染法后用流式细胞仪即可检测凋亡细胞。

2、结果判断：正常活细胞 Annexin V、PI 均低染；凋亡细胞 Annexin V 高染、PI 低染；坏死细胞 Annexin V/PI 均高染。

3、

应用价值：细胞发生凋亡时，膜上的 PS 外露早于 DNA 断裂发生，因此 Annexin V 联合 PI 染色法检测早期细胞凋亡较 TUNEL 法更为灵敏。又 Annexin V 联合 PI 染色不需固定细胞，可避免 PI 染色因固定造成的细胞碎片过多及 TUNEL 法因固定出现的 DNA 片段丢失。因此，Annexin V 联合 PI 法更加省时，结果更为可靠，是目前最为理想的检测细胞凋亡的方法。



培养细胞染色体显示法

1) 传代培养细胞染色体显示法

1. 培养细胞：取处于指数生长期、用较大瓶皿培养的、80%~90%汇合单层培养细胞。
2. 加秋水仙素：使用最终浓度为 0.02~0.8 微克/毫升营养液，温箱继续培养 6~10 小时；或用低温封闭法：把培养细胞置于 4℃ 条件下 6~12 小时后，再于 37℃ 温箱继续培养 6~10 小时处理（加秋水仙素）。
3. 采集分裂细胞：可利用分裂中期细胞体变圆与底物附着不牢特点，此时手持培养瓶，左右反复横向水平摇动，令培养液在培养细胞表面反复冲刷。应用此法可使 90% 的中期分裂细胞从瓶壁脱落，注意勿用力过猛，以防多量非分裂细胞脱落影响观察。
4. 离心：收集培养液，1000 转/分钟离心 5~10 分钟。
5. 低渗处理：吸除上清液、加入预温至 37℃ 的 0.075M KCl 溶液，在温箱中静置 20~30 分钟。
6. 预固定：向悬液中加入新鲜 1:3 醋酸、甲醇固定液 1ml，用吸管吹打调匀，此措施能起到先使细胞表面轻微固定，可防止固定后细胞粘连成块。
7. 固定：离心，同 4，吸除上清液，加新鲜固定剂 5~10ml；加固定剂时要用一手微斜持离心管，另手用吸管吸取固定剂，把固定剂逐滴滴在离心管壁上，使之慢慢流入离心管中，然后轻轻吹打均匀，置 15~20 分钟。
8. 重复 7，末次离心后，小心吸除大部分上清，据悬液中细胞密度大小，余下固定液 0.5~1ml。
9. 制片：用滴片法制片，按如下步骤：彻底洗净载物片，勿留任何油脂，置冰箱中储备备用。滴片前从冰箱中取出冷载物片 1 片，在载物片表面出现细微水气时，立即向片的一侧滴 2~3 滴细胞悬液，滴片时的距离能保持半米高度才好。滴片后置室温中令其自然干燥，或用吹风机热风吹干亦可。如此制备好的标本可置盒中备用或立即进行染色观察。
10. 染色和封片：一般常用 Giemsa 染色：取干液 Giemsa 1 份加 pH6.8 磷酸缓冲液 9 份混合，染色 10 分钟后，水洗、晾干、可直接观察。如标本需要保存或做长时间观察，可过二甲苯两次后，用中性树胶封片后，再过二甲苯，然后封片亦可。

2) 人末梢血微量全血培养染色体显示法

1. 培养液准备：取 15ml 培养瓶数个，每瓶内分别充入 5ml 培养液（pH 7.2），内含：1640 培养液（含 10%~15% 小牛血清），PHA 0.1ml，青霉素 100 单位和链霉素 100 微克/毫升 培养液
2. 抽血针管准备：取 2~5ml 针管一支，在消毒后的无菌操作台或无菌操作箱中安装好注射器，无菌抽肝素（100 U/ml BBS）少许湿润针管，如动作迅速不用肝素亦可。



3. 采血：用棉签 75%酒精给患者或献血者的皮肤消毒两次，缚止血带，静脉取血 1~2ml。无菌操作迅速向每一瓶培养中加血 0.4~0.5ml，如系外出采血，安装针管及分装血液两步骤亦可在无菌条件略差的环境内操作，但动作要迅速，以减少污染；在采血量不多或不应抽血的情况下，亦可在耳垂、手指肚（无名指）用刺血针采血。
4. 培养和加秋水仙素：37℃温箱中培养到 60~72 小时之间，此时细胞分裂相最多，向每培养瓶内加秋水仙素，最终浓度 0.02~0.08 微克/毫升营养液，再培养 4~6 小时。
5. 低渗：1000 转/分钟离心 10 分钟，吸除上清液，加入预温过的 0.075M KCl 溶液 10ml，置温箱中低渗处理 15~20 分钟。
6. 其余步骤与处理传代细胞法相同。

3) 羊水细胞培养

1. 抽取羊水：无菌抽取羊水 10~20ml，立即注入无菌离心管中。
2. 离心分离：1000 转/分离心 10 分钟，去上清，留 0.5ml。
3. 培养：加培养液 4ml（含小牛血清 1ml），用 NaHCO₃ 调 pH 至 6.8，置 37℃培养，在温箱培养 7~10 天后，可见大量成纤维细胞或上皮样细胞生长；加秋水仙素 0.02~0.8 微克/毫升营养液，作用 10~12 小时。
4. 其余步骤与传代细胞培养染色体制备法相同。

特殊培养法

1) 二倍体细胞培养法

二倍体细胞培养法与一般培养相同，关键在于传代，其传代程序为：

1. 吸除旧培养液注入另瓶中。
2. 用温 BSS 冲洗 1 次。
3. 用 0.25%胰蛋白酶消化，加入消化液量以仅覆盖细胞层即可；作用 1~5 分钟。
4. 待细胞附着松动、细胞质边缘卷起和间隔加大，便终止消化。为防止细胞丢失，可不必再用 BSS 冲洗，直接向瓶中加入培养液（新旧培养液按 2:1 新旧混合）。
5. 轻轻反复吹打制成单个细胞悬液。
6. 按一分为二比例接种培养。



2) 支持物培养法

加支持物培养法与一般培养法相同，只是在培养前需在培养瓶中加入已经消毒的支持物。

1. 支持物制备：如用特氟隆薄膜，无菌条件下启封，用剪刀按需要剪成各种不同大小的块，于培养接种细胞前，先置入培养容器中即可；通常多用盖玻片做支持物，用前先要把盖片用玻璃刀切成一定形态，以便装入培养瓶中，然后按如下顺序处理：自来水浸泡 24 小时—96%酒精 30~60 min—蒸馏水浸泡 30~60 min—用干净软布擦拭干净—装入培养皿中—高压或干热灭菌备用。
2. 培养法：初代消化培养、初代组织块培养、传代培养等皆可应用加支持物培养法。接种细胞后，可在任何时间取出支持物，做各种观察或实验。

3) 细胞分离（克隆）培养

多孔塑料培养板单细胞克隆法：

1. 消化：取健康待克隆细胞，吸出瓶内培养液，加消化液。
2. 低密度细胞悬液的制备：做克隆细胞时首先需先用消化法制备出分散成单个细胞悬液，然后稀释细胞，使之成为 1~2 细胞/毫升悬液，最适宜细胞密度为 1~2 细胞/ml 培养液。
3. 接种：先用吸管轻轻吹打细胞悬液，使混悬均匀，继用加样器向塑料培养板每孔内加 0.5 毫升。接种时要迅速准确，争取在最短时间内加完，以免培养液蒸发，然后迅速盖好盖板，置 CO₂ 温箱培养。
4. 标记：培养 6~12 小时后，待细胞下沉贴附于培养板孔底后，从温箱中取出，置倒置光显微镜台上，观察和标记下含有单个细胞的孔，置 CO₂ 温箱培养。在培养中一般无需换液，只有在细胞增长过于缓慢时才可进行换液。换液时先吸除旧培养基，但不要吸除过多，余少许，以免细胞干涸。然后再迅速补加新鲜克隆培养液，继续培养 3~4 周。待孔内细胞增至 500~600 个时，可进行分离培养。
5. 分离扩大培养：培养 86~96 小时后进行观察。挑选生长良好的单细胞克隆孔，先吸除旧培养液，用 Hanks 洗 1~2 次，继加胰蛋白酶少许，加入量已能覆盖细胞群即可，如过多，应吸除多余消化液。置于倒置显微镜下窥视，待发现细胞变圆时，加入 0.1ml 含 10% 血清的克隆培养基，用吸管轻轻吹打，当细胞离开底物悬浮后，一并吸入管内，移入另瓶或皿中，再补加一定量克隆培养液，置 CO₂ 温箱中继续培养、增殖，使之形成新的细胞群后，即转用常规培养法培养。

必须保证分离出来的细胞确为一个而不是两个或更多。因此必须提高克隆形成率才易克隆成功，为此常采取以下一些措施：

使用适应性培养基或条件培养基（Conditional Medium）。制备方法：

1. 培养同源细胞（未克隆前时的同一细胞）至半汇合状态时，更换一次培养液，再继续培养 24~48 小时后，吸出所有培养液。



2. 离心：3000~4000/分 离心 10 分钟，吸取上清液。
3. 滤过：再经直径 0.22 μ m 滤孔的滤膜过滤，低温冻存贮备用；用时取 1 分适应培养基+2 分培养基混合使用。

使用饲细胞(Feeder Cells)。制备方法：

1. 取原代培养的人或动物胚胎成纤维细胞，90%汇合时制成细胞悬液，再按 105 细胞/毫升重新接种培养。
2. 在细胞半汇合时，准备 0.25 μ g/ml 的丝裂霉素 C，按 2 μ g/106 细胞的量加入到培养瓶中过夜；或用射线单次照射，剂量 30~50 戈瑞。
3. 细胞经上述处理后，Hanks 液漂洗两次、更换培养液、再培养 24 小时，胰蛋白酶消化细胞制成悬液，按 5×10^4 (10^4 细胞/cm²) 接种入新培养基中。
4. 48 小时后，即可用于细胞克隆之用。

底物特殊处理：

1. 制备浓度为 1 mg/ml 的多聚右旋赖氨酸的水溶液，用以湿润培养瓶底。
2. 倒出多聚赖氨酸溶液，用 5ml PBS 冲洗一次后，可立即使用，或存数周内使用。

4) 球体细胞培养

1. 琼脂铺底的培养瓶：30ml 无菌培养瓶，每瓶加 5 ml 2%琼脂培养基，冷却，形成平坦底层后备用。
2. 取生长状态良好已连接成片的细胞，用弯头吸管伸入瓶内，把细胞纵横割划成若干小区后，倒出培养液。
3. 加入 0.25%的胰蛋白酶液，在倒置显微镜下边消化边观察，当细胞小区边缘微卷起后便立即终止消化，倒出消化液，用 Hanks 轻轻漂洗一次，加入新培养液 3~5 ml，用吸管把已松动的细胞片吸打下来，分装入 1~3 个含 2%琼脂培养基底层的培养瓶中，置温箱继续培养，数日后便可生长成细胞球体。
4. 换液：培养 1~2 日后，如需换液，微倾斜培养瓶，令培养液集于培养瓶底角，停片刻，待球体细胞下沉后，吸除部分培养液，再补充新培养液。

5) 微载体细胞培养法

1. 微载体选择：先用利用三种小量微载体做培养实验，观察细胞在一定时间内细胞的吸着率和计算细胞数，以得到最大量细胞为佳。
2. 水化：称一定量的微载体放入容器中，按每克微载体加 50~100ml 的比例，加入无 Ca²⁺和 Mg²⁺的磷酸缓冲液 (PBS)，室温下放置应不少于 3 小时，并不时轻微搅动，然后



再用新鲜 PBS 洗一次。

3. 消毒：可采用高压蒸汽消毒，也可在水化后用 70% 酒精浸泡消毒，再用无菌的 PBS 漂洗一二次。

4. 传代培养：在连续进行微载体培养时，可以不必把细胞从微载体分离下来，可将带有细胞的微载体和新的微载体混合进行培养细胞能移动到新载体上。如果进行其它实验或需要分离细胞进行传代培养时，和常规培养相同，先用 EDTA+胰蛋白酶溶液作用使细胞脱离微载体表面。细胞脱离微载体后，可用自然沉降法，即在室温下静止 5 分钟，微载体将先自沉在底部，细胞大部分仍在上清中，然后离心上清即可得到细胞。如果需要分离程度较高时，需用孔径为 100 微米的尼龙网或不锈钢网过滤后，再离心滤过液，就可得到较纯净的细胞。

6) 悬浮培养法

悬浮培养是使贴壁细胞呈悬浮状态生长。如所需培养的细胞本身属悬浮生长型，则无须做任何处理；在传代时先做离心处理去除旧培养液，添加新培养液即可。但在培养贴附型细胞时，必须进行干扰细胞不能贴附，方法有二：

1. 用大培养瓶增加含有铁芯的无毒的聚苯乙烯棒，在培养中进行电磁搅拌，使细胞不能贴壁而成悬浮培养。
2. 用试管培养细胞，把试管置入带有旋转鼓的特制温箱中进行培养，旋转鼓不停徐缓转动，干扰细胞贴壁遂成悬浮培养。

实验室常用细胞目录

3T3 swiss	Swiss 小鼠胚胎成纤维细胞
A549	人肺癌细胞(能产生 Keratin)
CHOdhfr	二氢叶酸缺陷型中国仓鼠卵巢细胞
CHO-K1	中国仓鼠卵巢细胞
Cyc-tAg	小鼠 T 淋巴细胞瘤 (SV40T 抗原转染)
DU145	人前列腺癌细胞
FDC-P1	小鼠正常骨髓细胞



GH3	大鼠垂体瘤细胞
GT1.1	人垂体瘤细胞（分泌促生长激素分泌激素）
HEK-293	人胚肾细胞
Hela	人宫颈癌细胞
MC3T3-E1	小鼠胚胎成骨细胞
MCF7	人乳腺癌细胞
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞
MDA-MB-435s	人乳腺癌细胞
MDA-MB-453	人乳腺癌细胞
NG108-15	小鼠神经细胞瘤/大鼠神经胶质细胞瘤杂交瘤细胞
NIH3T3	小鼠胚胎成纤维细胞
NTERA-2	人恶性多发性畸胎瘤细胞
P19	小鼠畸胎瘤细胞
PA-1	人卵巢畸胎瘤细胞
PA12	小鼠成纤维细胞
PANC-1	人胰腺癌细胞
PC-12	大鼠嗜铬细胞瘤
SaOS-2	人骨肉瘤细胞
SH-SY5Y	人骨髓神经母细胞瘤
SK-OV-3	人卵巢腺瘤细胞



U-2 OS	人骨肉瘤细胞
WEHI-3	小鼠血液细胞
Y2	小鼠成纤维细胞
A-204	人横纹肌肉瘤
CaLu-3	人肺腺癌细胞
COS-7	非洲绿猴肾细胞
G-401	人肾癌 Wilms
Hep G2	人肝癌细胞
HFF	人前皮肤成纤维细胞
HL-60	人白血病细胞
HOS	人骨肉瘤细胞
K562	人红白血病细胞
LNCaP	人前列腺癌
MCF7B	人乳腺癌细胞
MEL	小鼠红白血病细胞
MOLT-4	人淋巴细胞白血病细胞
MRC-5	人胚肺成纤维细胞
NCI-H209	人小细胞肺癌
RAJI	黑人 Burkitt 淋巴瘤
RAMOS	人 B 淋巴细胞瘤



RAMOS (RA. 1)	人 B 淋巴细胞瘤
SF126	人脑瘤
SF763	人脑瘤
SF767	人脑瘤
SK-HEL-1	人皮肤黑色素瘤细胞
SMC	兔主动脉平滑肌细胞
SP2/0-AG14	小鼠骨髓瘤
SW13	人肾上腺皮质瘤
T84	人结肠癌细胞
THP1	人单核细胞型淋巴瘤
U251	人神经胶质细胞瘤
U-937	人淋巴瘤细胞
Vero	猴肾细胞
BaF3	小鼠原 B 细胞 (B 类)
BGC-823	人胃腺癌细胞
BV-2	小鼠小胶质细胞
CC801	人宫颈鳞状上皮癌细胞
CRL	人胰腺癌细胞
CV-1	猴肾细胞
GLC-82	人肺腺癌细胞



Hep-2	人喉癌细胞
HSF	人皮肤成纤维细胞
JEG-3	人绒毛癌细胞
Jurkat E6-1	人 T 细胞淋巴瘤
LA795	小鼠肺腺癌细胞
M17	人神经母细胞瘤
MDCK	狗肾细胞
MEF	小鼠胚胎成纤维细胞
MG-63	人骨肉瘤细胞
MMQ	大鼠垂体瘤细胞
NCI-H446	人小细胞肺癌
RPMI-8226	人多发骨髓瘤细胞
SF17	人脑瘤
SK-BR-3	人乳腺癌细胞
SMMC-7721	人肝癌细胞
UT-7	人类原巨核细胞白血病细胞 (B 类)
WISH	人羊膜细胞
Yac-1	小鼠淋巴瘤细胞
HT-1080	人纤维肉瘤
AtT-20	小鼠垂体瘤



FOX-NY	小鼠淋巴瘤细胞
SK-N-SH	人神经母细胞瘤
MDA-MB-157	人乳腺癌细胞
ZR-75-1	人乳腺导管癌细胞
PC-3	人前列腺癌细胞
293T	人胚肾 T 细胞
HCT-8	人结肠腺癌
JEG-3/VP16	人绒癌细胞 VP16 耐药株
JEG-3/VP16-IL-2	人绒癌细胞 VP16 耐药株 IL-2 转染
JEG-3/VP16-TNF α	人绒癌细胞 VP16 耐药株 TNF α 转染
HESF	人胚胎皮肤成纤维细胞
HEPF	人胚肺成纤维细胞

细胞目录大全

人类组织正常及永生化细胞

细胞代号 细胞名称

293E E 转化人胚肾 293 细胞

293ET ET 转化人胚肾 293 细胞

293KB KB 转化人胚肾 293 细胞



293T 人胚肾 T 细胞

A7d 野生型人 C-KIT 受体细胞株

AMS3 (SCF3) 人干细胞因子单克隆抗体细胞株

APP-PS1 人 APP-PS1 双基因转染细胞株 (HEK293)

CCC-ESF-1 人胚胎皮肤成纤维细胞

CCC-HPF-1 人胚肺二倍体细胞

DMF7 双位点 HC-KIT 受体细胞株

FC33 ASP2 人胚胎肾细胞转化细胞

FIP293 FIP293 (来源于 HEK293)

HEK-293 人胚肾细胞

HFF 人前皮肤成纤维细胞

HFSF 人胚胎眼巩膜成纤维细胞

HFTF 人胚胎眼 Tenon's 囊成纤维细胞

HK-2 人肾小球上皮细胞

HKC 人胚肾上皮细胞

HSF 人皮肤成纤维细胞

MRC-5 人胚肺成纤维细胞

TALL104 IL-2 依赖株

WISH 人羊膜细胞

CCC-HEL-1 人胚胎肝正常细胞

CCC-HEK-1 人胚胎肾正常细胞

CCC-HHM-2 人胚胎心肌组织来源细胞

CCC-HPE-2 人胚胎胰腺组织来源细胞

CCC-HB-2 人胚胎膀胱组织来源细胞

CCC-HIE-2 人胚胎肠粘膜细胞

CCC-HBE-2 人胚胎气管细胞



人类组织肿瘤细胞

A-204 人横纹肌肉瘤
A375 人皮肤黑色素瘤细胞
A431 人皮肤基底细胞癌
A549 人肺癌细胞
A875 人黑色素瘤细胞
BeWo 人胎盘绒毛癌细胞
BGC-823 人胃腺癌细胞
BT474 人乳腺导管瘤
CACO-2 人结肠癌细胞
CaLu-3 人肺腺癌细胞
CASKI, 人宫颈癌
Colo205 人结肠癌
Colo320DM 人结肠癌
D341 Med 人髓母细胞瘤
Daudi 人B淋巴细胞瘤
DU145 人前列腺癌细胞
G-401 人肾癌 Wilms
GLC-82 人肺腺癌细胞
HCT116 人结直肠癌
HCT-8 人结肠腺癌
HEC-1B 人子宫内膜癌细胞
Hela 人宫颈癌细胞
Hep G2 人肝癌细胞
Hep-2 人喉癌细胞
HL-60 人白血病细胞



HOS 人骨肉瘤细胞

HT-1080 人纤维肉瘤

HT-29 人结肠腺癌细胞

HuTu-80 人十二指肠腺癌

JEG-3 人绒癌细胞

JEG-3/VP16 人绒癌细胞 VP16 耐药株

JEG-3/VP16-IL-2 人绒癌细胞 VP16 耐药株 IL-2 转染

JEG-3/VP16-TNF α 人绒癌细胞 VP16 耐药株 TNF α 转染

Jurkat D,E 人 T 淋巴瘤细胞转基因细胞

Jurkat E6-1 人 T 细胞淋巴瘤

Jurkat77 人 T 淋巴瘤细胞亚系

K562 人红白血病细胞

KB 人口腔上皮癌

LNCaP 人前列腺癌

LoVo 人结肠癌

M-07e 人巨细胞白血病细胞

M17 人神经母细胞瘤

M2 待查

MCF7 人乳腺癌细胞

MCF7B 人乳腺癌细胞

MDA-MB-157 人乳腺癌细胞

MDA-MB-231 人乳腺癌细胞

MDA-MB-435s 人乳腺癌细胞

MDA-MB-453 人乳腺癌细胞

MG-63 人骨肉瘤细胞

MOLT-4 人淋巴细胞白血病细胞



NCI-H157 人非小细胞肺腺癌
NCI-H209 人小细胞肺癌
NCI-H446 人小细胞肺癌
NTERA-2 人恶性多发性畸胎瘤细胞
PA-1 人卵巢畸胎瘤细胞
PANC-1 人胰腺癌细胞
PC-3 人前列腺癌细胞
RAJI 黑人 Burkitt 淋巴瘤
RAMOS 人 B 淋巴细胞瘤
RAMOS (RA. 1) 人 B 淋巴细胞瘤
RPMI-8226 人多发骨髓瘤细胞
SaOS-2 人骨肉瘤细胞
SF126 人脑瘤
SF17 人脑瘤
SF17 人脑瘤
SF763 人脑瘤
SF767 人脑瘤
SH-SY5Y 人骨髓神经母细胞瘤
SK-BR-3 人乳腺癌细胞
SK-MEL-1 人皮肤黑色素瘤细胞
SK-N-SH 人神经母细胞瘤
SK-OV-3 人卵巢腺瘤细胞
SMMC-7721 人肝癌细胞
SW 13 人肾上腺皮质瘤
SW480 人结直肠癌
T84 人结肠癌细胞



TF1 人红系白血病细胞
THP1 人单核细胞型淋巴瘤
U-2 OS 人骨肉瘤细胞
U251 人神经胶质细胞瘤
U-937 人淋巴瘤细胞
UACC812 人乳腺导管瘤
UT-7 人类原巨核细胞白血病细胞
ZR-75-1 人乳腺导管癌

动物组织正常及及永生化细胞

3T3 swiss swiss 鼠胚胎成纤维细胞
3T3L1 小鼠胚胎成纤维细胞(前脂肪)
3T6swiss 小鼠胚胎成纤维细胞
7WCY1.0 人 APP-PS1 双基因转染细胞株(CHO)
7WD10 人 APP 基因转染细胞株(CHO)
7WML6.0 人 APP-PS1(M146L) 双基因转染细胞株(CHO)
7WPS1 人 APP-PS1 双基因转染细胞株(CHO) (B 类)
BA/F3 小鼠原 B 细胞
BHK-21 金黄地鼠肾
BS-C-1 非注洲绿猴肾
C2C12 小鼠成肌细胞
C3H 10T1/2 2A6 小鼠成纤维细胞
CH0dhfr 二氢叶酸缺陷型中国仓鼠卵巢细胞
CHO-K1 中国仓鼠卵巢细胞
COS-1 非洲绿肾



COS-7 非洲绿猴肾细胞

CV-1 猴肾细胞

FDC-P1 小鼠正常骨髓细胞

IAR20 小鼠肝细胞

IEC-6 大鼠小肠隐窝上皮细胞

LL-PK1, 猪肾细胞

MC3T3-E1 小鼠胚胎成骨细胞

MDCK 狗肾细胞

MEF 小鼠胚胎成纤维细胞

NBLE 新生牛眼晶体上皮细胞

NBTF 新生牛眼 Tenon's 囊成纤维细胞

NIH3T3 小鼠胚胎成纤维细胞

P815 小鼠肥大细胞

PA12 小鼠成纤维细胞

RCBBF 兔角膜后基质层成纤维细胞

RCFBF 兔角膜前基质层成纤维细胞

RTE 大鼠气管上皮细胞

RYTF 兔眼 Tenon's 囊成纤维细胞

SF9 昆虫卵巢细胞

SMC 兔主动脉平滑肌细胞

Vero 猴肾细胞

WEHI-3 小鼠血液细胞

Y2 小鼠成纤维细胞



动物组织肿瘤细胞

10104 人淋巴瘤细胞

AtT-20 小鼠垂体瘤

BC3H1, 鼠脑瘤

BV-2 小鼠小胶质瘤细胞

C6 大鼠脑胶质瘤

Cyc-tAg 小鼠 T 淋巴细胞瘤 (SV40T 抗原转染)

DCS 小鼠树突状细胞肉瘤

EL-4 鼠 T 淋巴细胞瘤

FOX-NY 小鼠淋巴瘤细胞

GH3 大鼠垂体瘤细胞

GT1.1 小鼠垂体瘤细胞 (分泌促生长激素分泌激素)

HEPA1-6 小鼠肝癌细胞

MEL 小鼠红白血病细胞

MFC 小鼠前胃癌细胞

MMQ 大鼠垂体瘤细胞

NG108-15 小鼠神经细胞瘤/大鼠神经胶质细胞瘤杂交瘤细胞

P19 小鼠畸胎瘤细胞, 小鼠畸胎瘤细胞

PC-12 大鼠嗜铬细胞瘤细胞, 大鼠嗜铬细胞瘤

RAW264.7 小鼠巨噬细胞瘤

SP2/0-AG14 小鼠骨髓瘤

Yac-1 小鼠淋巴瘤细胞