

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）、储品规（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, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56g, KH_2PO_4 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°C 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 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和血清、蛋白质会降低胰酶的活性，所以配制胰酶溶液时应选用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 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°C 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°C 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哌嗪乙硫磺酸（N'-a-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfanic 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较大量的谷氨酰胺，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）——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 5×10^5 /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使用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。