



实验九 动物贴壁细胞的复苏




思维导图



预习问题

- (1) 类比东北冬天的冻梨，如果直接将细胞冷冻会出现什么样的效果？
- (2) 你如何看待人体冷冻技术？如果将来科技足够发达，你会选择该项服务么？
- (3) 目前活体冻存与复苏技术的最大缺陷，你认为是什么？
- (4) 冷冻保护剂在细胞冻存中的作用是什么？
- (5) 利用《沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台》了解动物贴壁细胞的冻存与复苏过程。



一、实验目的

- (1) 掌握细胞复苏的基本原理；
- (2) 熟练进行细胞复苏的操作；



玻璃化冻存

阿尔科于1972年成立，是全球最早从事人体冷冻技术研究和实践的机构之一。据其介绍，该项技术的核心理念是，通过极低温度保存人体，以便在未来医学科技进步到足以恢复人体健康时，能够“复活”人体。詹姆斯·阿罗伍德在接受红星新闻采访时表示：“死亡是一个过程性的事件，并不是一瞬间的事。人体冷冻技术就是目前为止‘按下死亡进程暂停键’的最好方式。”



1963年，一位名叫贝德福德的70岁富豪被确诊了晚期肺癌。
1967年1月19日，首例成功冷冻保存于零下196° C的液氮罐中。
1972年，转移到阿尔科生命延续公司继续保存。
2017年，解冻，血液置换药剂导致脑死亡。尽管身体其他部位都得以完好保存。



杜虹是重庆知名儿童文学作家，2015年5月30日因胰腺癌去世。在去世之前，杜虹以及家人，辗转联系到了一个专门从事人体冰冻研究的科研机构——美国阿尔科生命延续基金会（英文名称Alcor）。

该基金会是目前世界上最大的人体冷冻机构之一。杜虹一家选择了花费12万美金（约75万元人民币）大脑冷冻。

按Alcor科学家的乐观估计，50年后的科学技术也许就能让杜虹解冻头部、再造身体，也就是——复活。



李泽厚，旅居美国的我国著名思想家、哲学家、美学家；

于2021年11月2日在美国科罗拉多州博尔德小镇家中因病去世。

美国“阿尔科生命延续基金会”（简称“阿尔科”）履行了李先生的生前遗嘱——“**我不会有墓志铭。但我准备将来把脑袋留下来，冷冻，过300年或者500年，再拿出来。**”90岁生日前夕接受采访时，他重申了此事，并说“我不是随便讲句空话而已”，已向“阿尔科”捐赠8万美元，每年还付几百美元的会员费。

“我是想证明文化是不是影响了大脑，几百年后，是不是可以从我的大脑里发现中国文化的残迹，证明我的积淀理论。如果证明有影响（文化影响大脑），我觉得比我所有书加起来的贡献都要大。”



为什么不能保持原样？



细胞内水的状态？

- 理论上讲，细胞外水的冻结温度为 $-5\sim-15^{\circ}\text{C}$ 。
- -30°C 时，细胞内几乎没有非冻结状态的游离水存在；
- 结合水在 -100°C 温度下也不冻结。
- 任何一个冰晶对细胞都会是致命的伤害。



二、实验原理

细胞冷冻及复苏技术的关键：

尽可能地减少细胞内水分，减少细胞内冰晶的形成。

1. 冷冻保护剂
2. 降温速度
3. 复温速度
4. 保存温度



1、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。

分为渗透性和非渗透性两类。

对大多数有核哺乳类动物细胞来说，在不加冷冻保护剂的情况下，无最适冷冻速率可言，也不能获得活的冻存物。



✂ 具有渗透性的冷冻保护剂：一般是一些小分子的物质，主要有甘油、DMSO、乙二醇、丙二醇、乙酰胺、甲醇等

✂ 非渗透性冷冻保护剂：一般是些大分子物质，主要有聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、蔗糖、聚乙二醇、羟乙基淀粉等。

2、 冷冻速率

冷冻速率是指降温的速度；

- 缓慢降温，尽量减少细胞内的自由水

不同细胞最适冷冻速率的值也有所不同，如小鼠骨髓干细胞、酵母、人红细胞最适冷冻速度分别是 1.6°C 、 $7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 。

所以一种细胞冷冻保存之前要测试出其最适冷冻速度，以保证获得最高冷冻存活率。



3、复温速率

复温速率是指细胞复苏时温度升高的速度。

复温速度越快越好， 37°C 水浴中，1~2min内要完成。复温速率不当也会降低冷冻存活率。



4、冷冻保存温度

冷冻保存温度是指能长久保存细胞的一个深低温度。


在这样的温度下，细胞生化反应极其缓慢或停止，但经长期保存和复苏后仍能保持正常的结构和功能。液氮温度（？）是目前最佳冷冻保存温度。

精子银行
卵子银行
胚胎银行



实验原理

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。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。



三、实验器材

1. 材料：人肺癌细胞A549，冻存管；
2. 试剂：DMEM基本培养液、胎牛血清、胰酶、DMSO，PBS。
3. 仪器：倒置显微镜，二氧化碳培养箱，压蒸汽灭菌锅，超净工作台等。

那么，如何复苏细胞呢？



冻存管



四、实验步骤

细胞复苏

1. 冷冻管由 -80°C 转入到 37°C 水浴中，加速解冻 **1-2min** ；
2. 将解冻后细胞转移到**装有培养液的离心管**中；
3. 800转离心10min；
4. 弃上清，将细胞重新悬浮在新鲜培养液中；
5. 将细胞转移到细胞培养瓶；
6. 倒置显微镜检查细胞存活率以及细胞密度；
7. 隔天换液

要求

- 每组每个实验提交2分钟的**操作**视频，及时采集细胞图片。
- **无菌室非必要不要说话**：提醒一次，下一次请离开无菌室。
- 尽量穿戴利落，不能脱鞋，女生扎头发。

腾讯会议

- 实时联系。
- 每组进一个人，勿开语音。
- 需要显微镜观察的时候，腾讯会议打开视频即可。
- 每次四组到观察室，其它人等候。

- **进入房间：**

- 1.一次进一组，所有房间**快进快出**，随手关门。
- 2.进入每个房间都要先关注**紫外灯**是否关闭。
- 3.每进入一级房间，手及物品都需要经酒精擦拭消毒。

操作前：

1. 饭盒（切勿开盖）和酒精棉球瓶（各2个），在缓冲间擦拭干净再移入操作间，乃至操作台。
- 2.检查备品（**酒精灯**），稍安勿躁，坐定，摆台，物品尽量远离边台。

操作的琐碎

- **酒精**棉球捏干，注意手和台面酒精，挥发干净！酒精棉球瓶盖好。
- **滴管**：不要碰废液缸，滴管的拿法，立起来，灼烧到位吹凉。滴管漏气或过紧适当处理，节省使用。
- **瓶管**：不要拿瓶（管）口，擦拭先擦瓶（管）口，瓶（管）竖立，不可斜度过大。
- **消化**：每个地方都要吹打到，不要怼到瓶壁，有效吹打。
- **手**：不能触碰任何容器（饭盒、瓶盖）的内部。

操作结束

- 台面清理干净，所有盖儿都该严，废液缸不用带出。
- 操作台面酒精擦拭干净，超净台和房间紫外灯打开，排风关闭。
- 培养瓶酒精擦拭，瓶底标记组名。
- 无菌室任何位置，不要留任何垃圾（鞋套），一律自己带走，扔到卫生间垃圾桶，而不是实验室。
- 无菌室带出物品，全部清洗干净，分类放置。

作业

- 拍照记录复苏的细胞状态；
- 在下一次实验，拍照记录细胞贴壁的状态，对冻存效果进行评估；