



PBS、刀剪镊、抗生素、血清、细胞培养箱、三蒸水、胰蛋白酶、离心机、DMEM、老鼠体表、96孔培养板、操作台、实验室地面、离心管、手、地面、显微镜、Hank's液

消毒方式	擅长	不擅长	尽量避免	例
紫外消毒	表面	不能穿透的物体	活的、有活性的	桌面，空气，地面，水？
湿热灭菌	不怕水的、不怕热的	怕水的、怕热的	有活性的	水，布，玻璃，塑料
干热灭菌	不怕热的，不怕干燥的	怕热的、怕干燥的	有活性的	玻璃，某些塑料
过滤除菌	液体	固体，空气	贵的，哈哈哈	



回

顾

模拟
细胞的
生存环境



实验室的设置

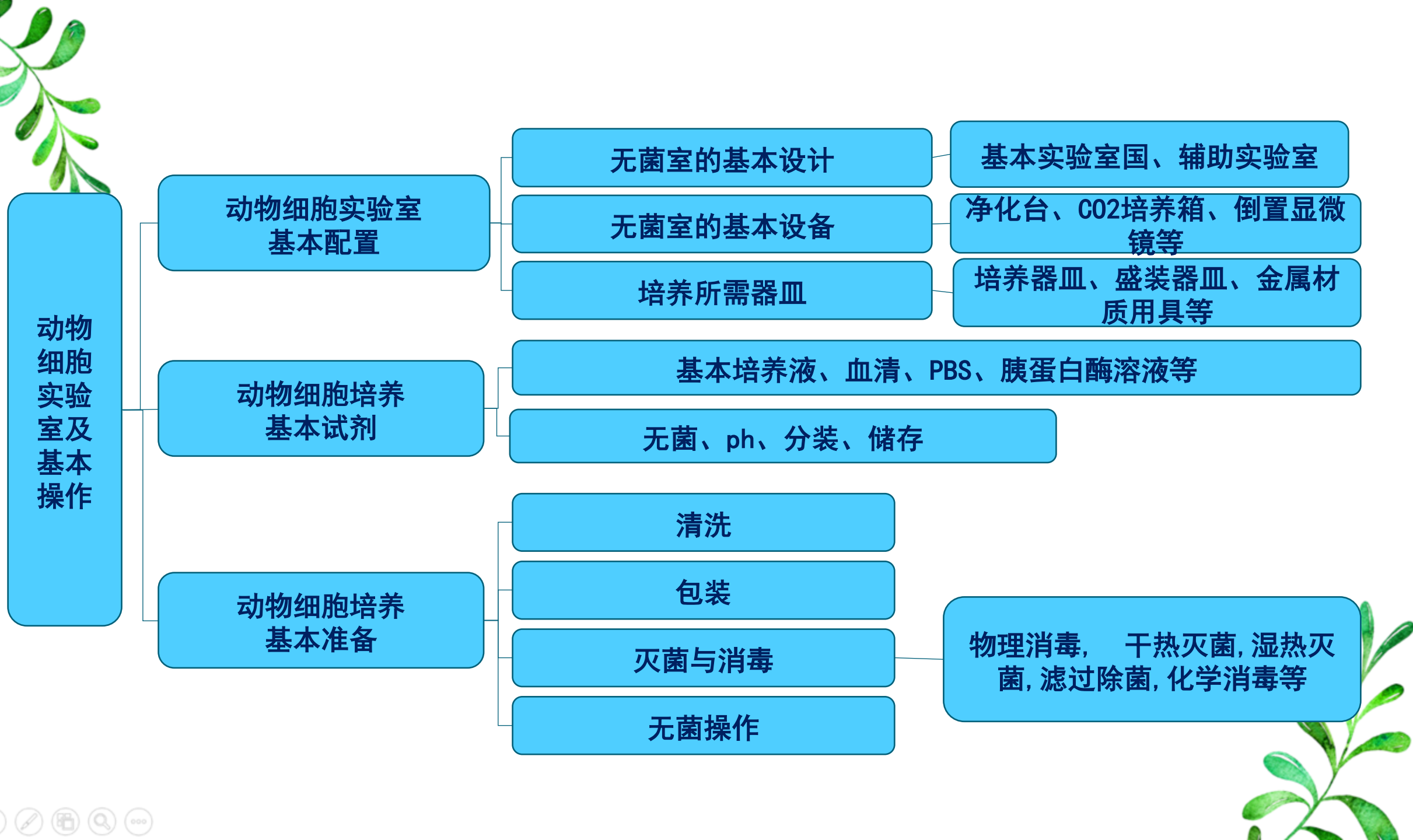


体外培养条件



无菌环境的营造

- DMEM、老鼠体表、操作台、培养瓶、离心管、解剖器械、实验室地面、胰蛋白酶，PBS、离心机



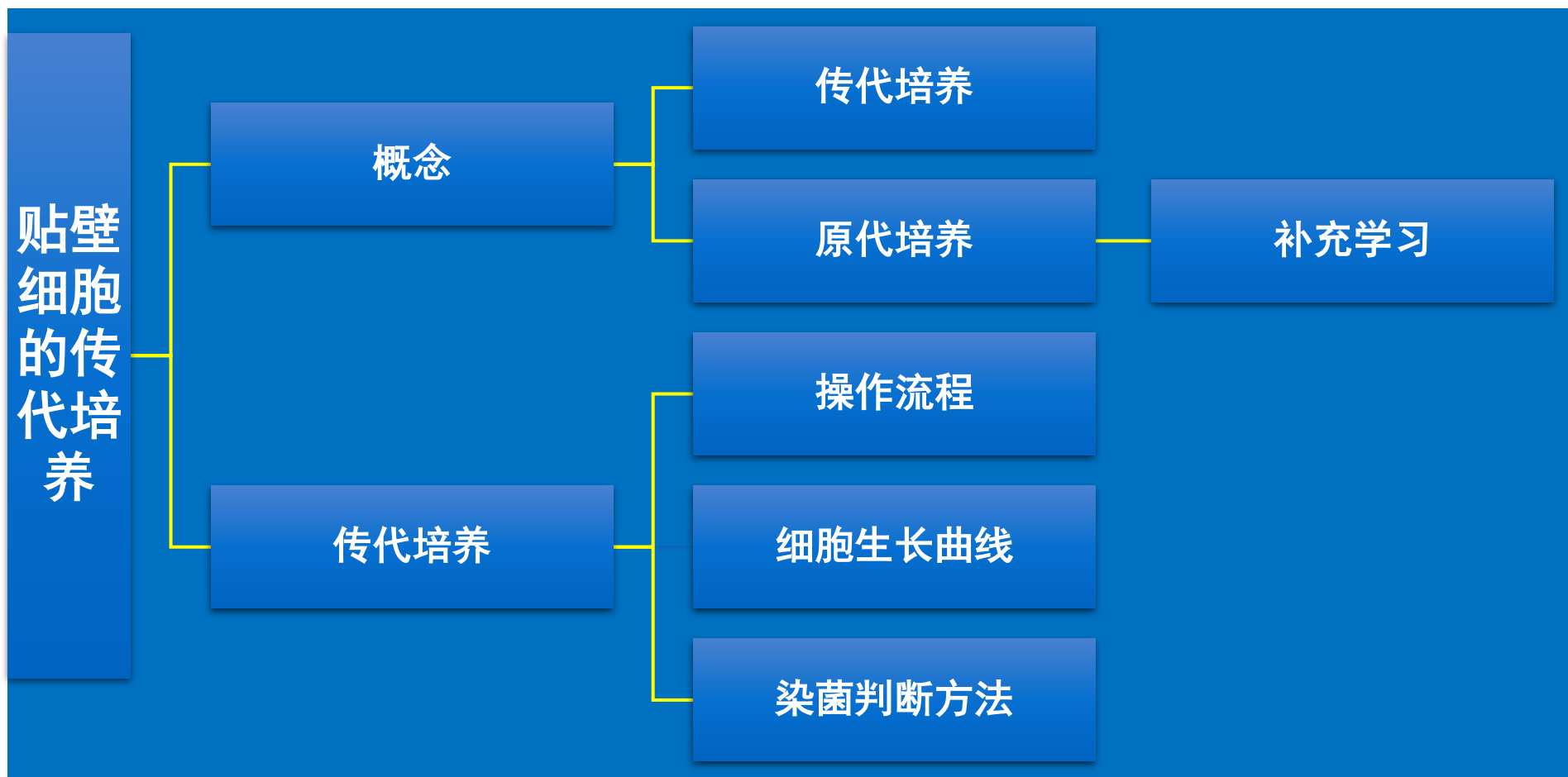


实验八 动物细胞传代培养的 虚拟仿真实训

实验十 动物贴壁细胞的传代 培养



思维导图





预习问题

- (1) 细胞依靠什么机制贴附在培养瓶壁上的？
- (2) 贴壁的细胞和非贴壁的细胞形态上有什么区别？
- (3) 所谓的“消化细胞”是什么意思，胃消化食物么？
- (4) 如何判断细胞已经不在贴壁状态？
- (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传代过程。



一、原代培养

- **概念：** Primary Culture, 细胞、组织或器官开始的培养。
- **特点：** 最接近生物体的生活状态（遗传物质）。

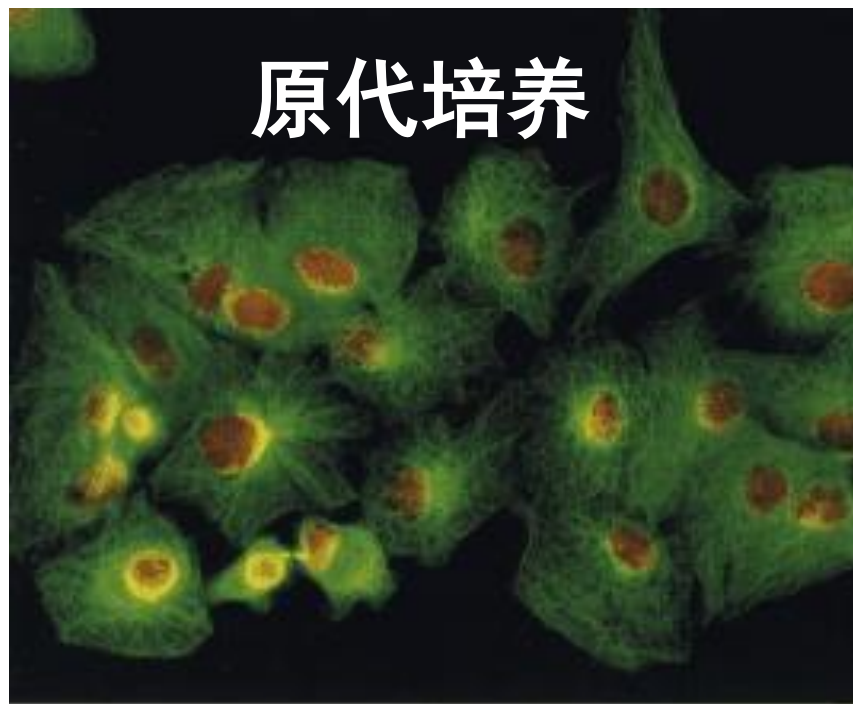


鸡胚



试管动物

嵌合动物

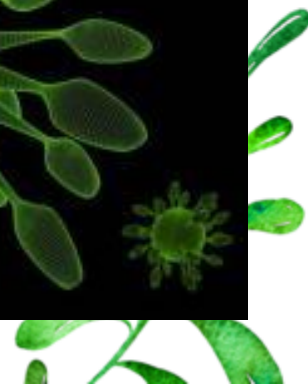


原代培养



克隆动物

HIV抗体

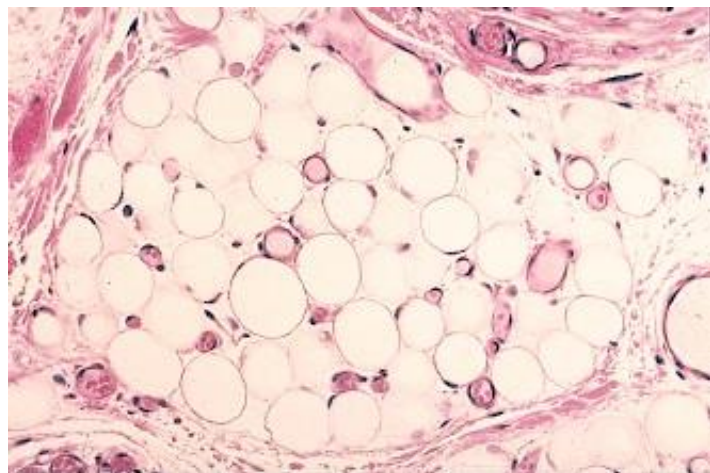




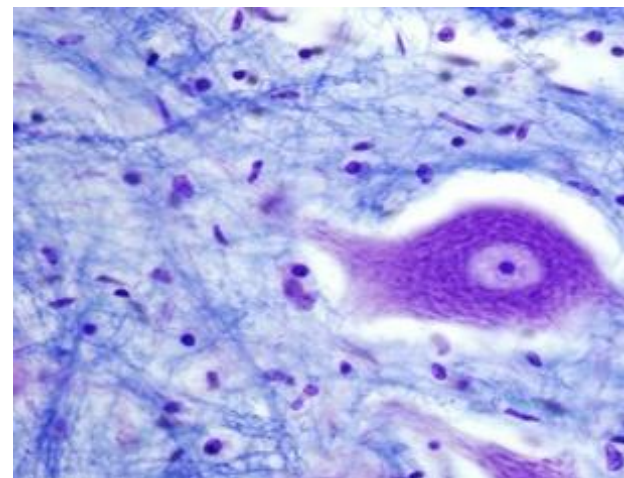
动物培养层次

- 器官培养：三维结构和功能（干细胞）。
- 组织培养：基本不存在
- 细胞培养：细胞在体外条件下的生长，但不再形成组织的过程。

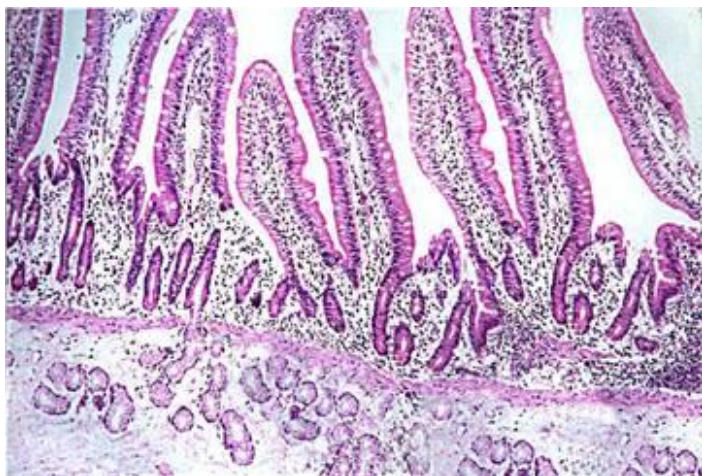




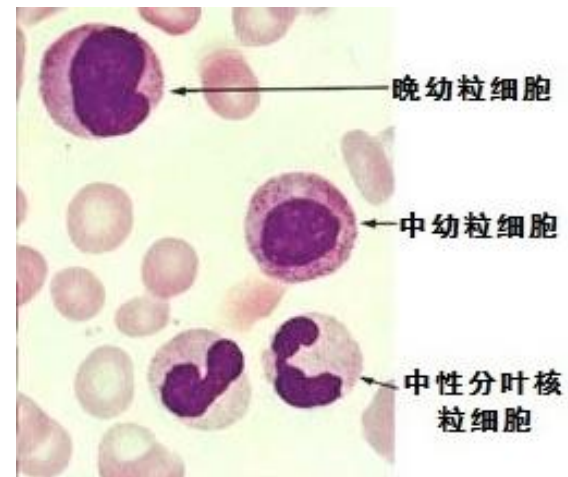
脂肪的组织切片



中枢神经的组织切片



十二指肠组织切片



不同发育阶段的粒细胞



二、动物细胞体外培养的**形态学**特征

根据其生长方式主要分为：

1. **贴壁依赖性细胞**：贴附生长，接触抑制；
2. **非贴壁依赖性细胞**：悬浮生长，密度抑制；

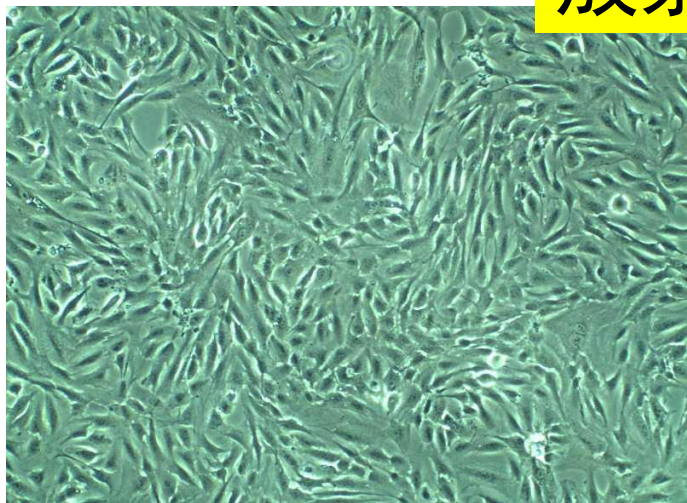


1、贴壁依赖性细胞（贴壁细胞）

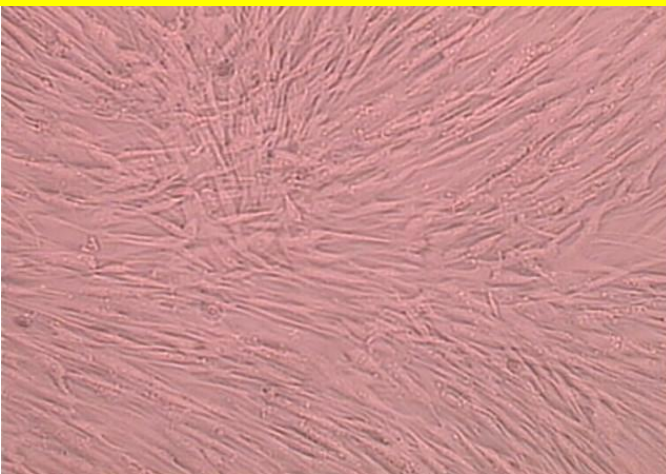
(1) 成纤维型细胞：梭形或不规则形，“柳叶形”。

中胚层来源细胞，如心肌细胞，血管内皮细胞等。

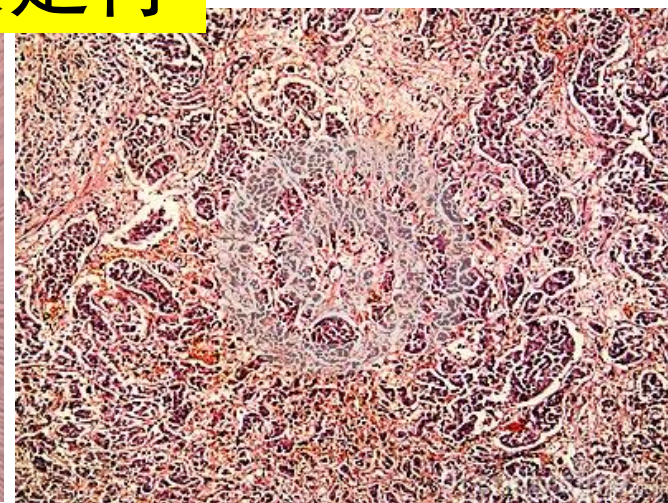
放射状，漩涡或火焰状走行



鸡胚成纤维细胞



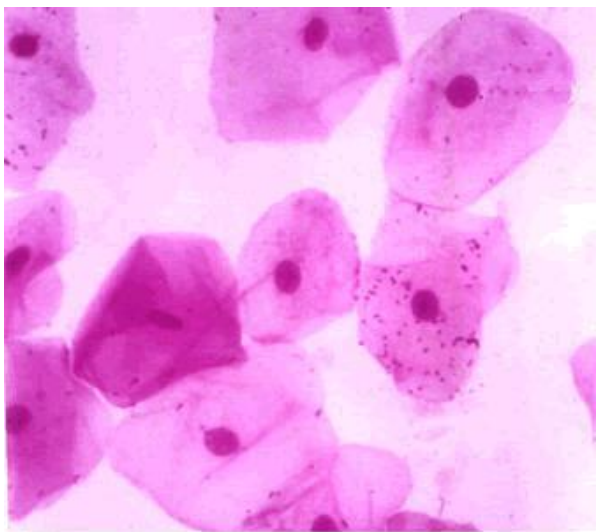
肝癌细胞HEPG-2



人肝癌组织切片

(2) 上皮型细胞：扁平多角形，“铺石路状”

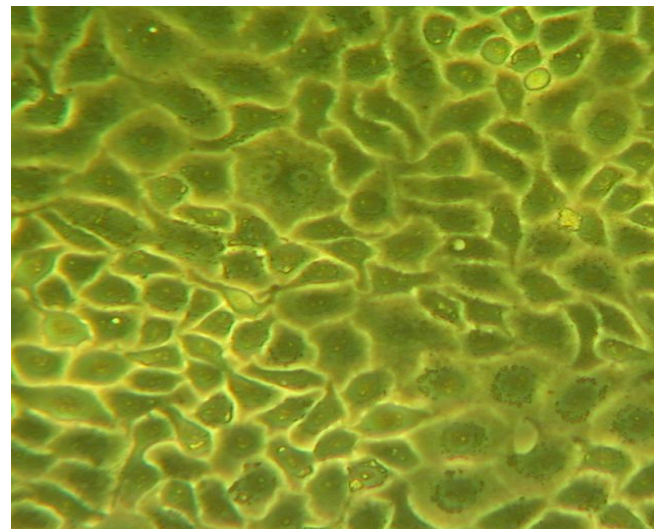
内、外胚层的细胞，如消化管外皮细胞，肝脏上皮细胞，hela等。



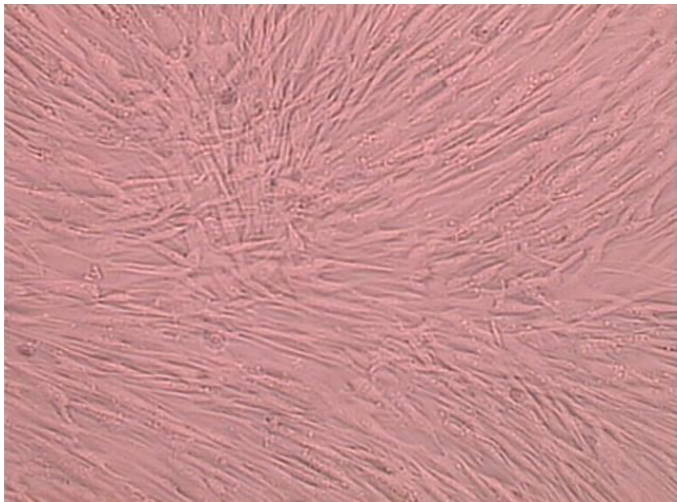
人口腔上皮细胞



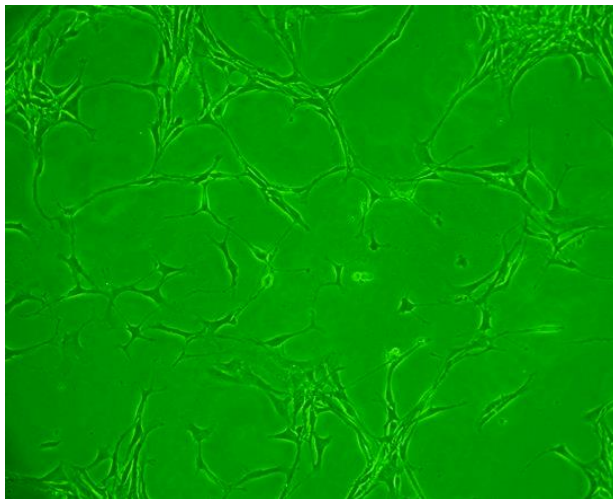
真正的铺石路



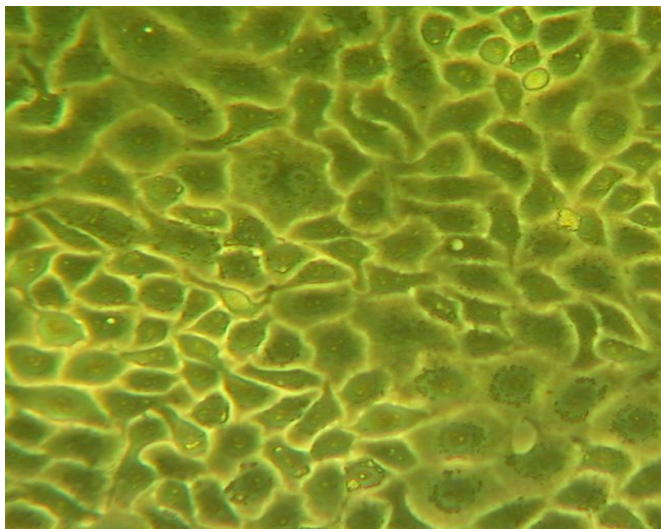
人肝癌细胞 BEL-7402



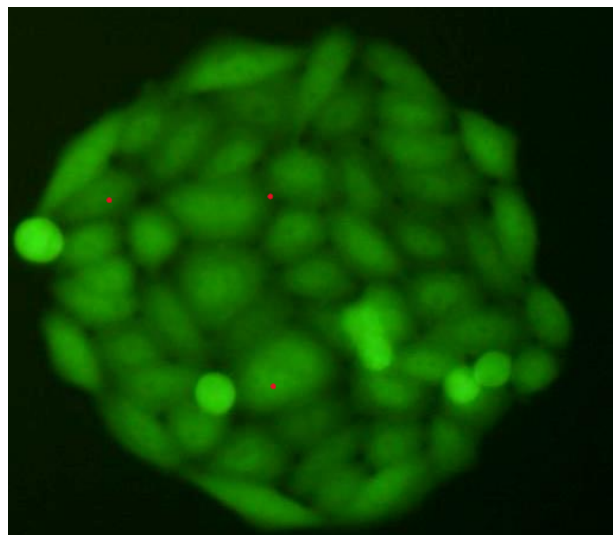
人肝癌细胞HEPG-2



单独活动 “拉网”



人肝癌细胞 BEL-7402

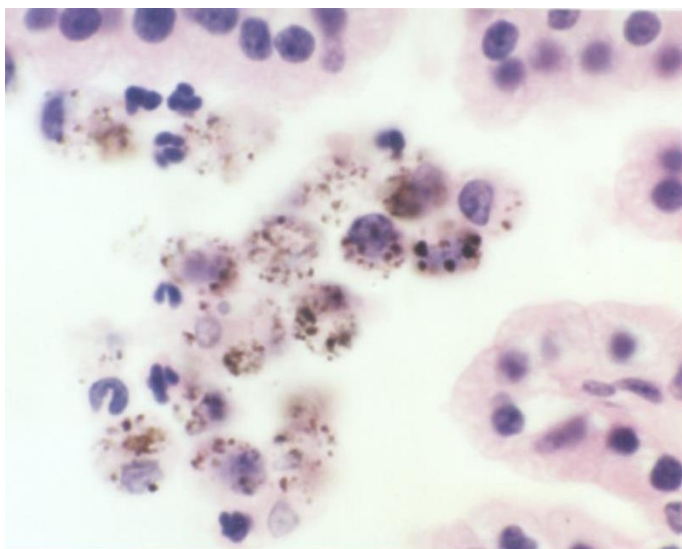


紧密 “相连” 生长

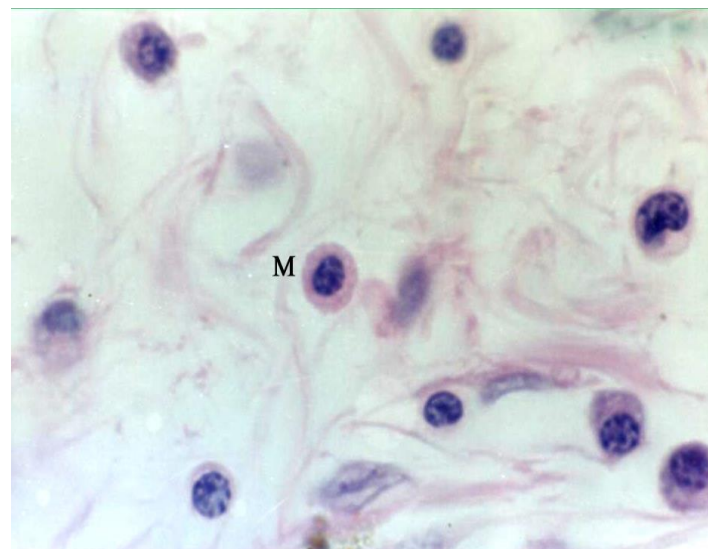


(3) 游走型细胞：形态不稳定，散在生长，不定向变形运动；

单核-巨噬细胞系统,网状内皮系统起源的细胞。

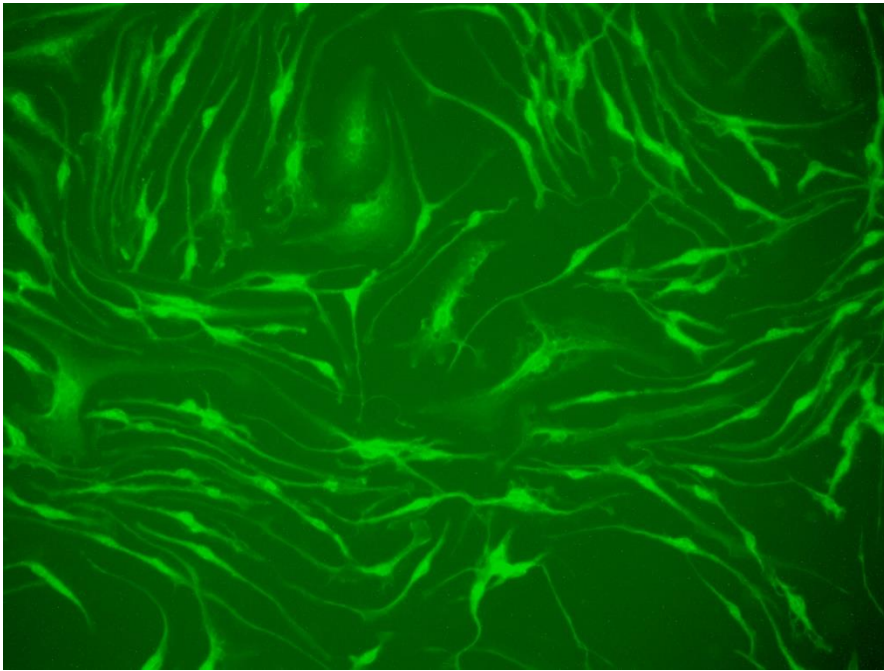


肺部的尘细胞切片

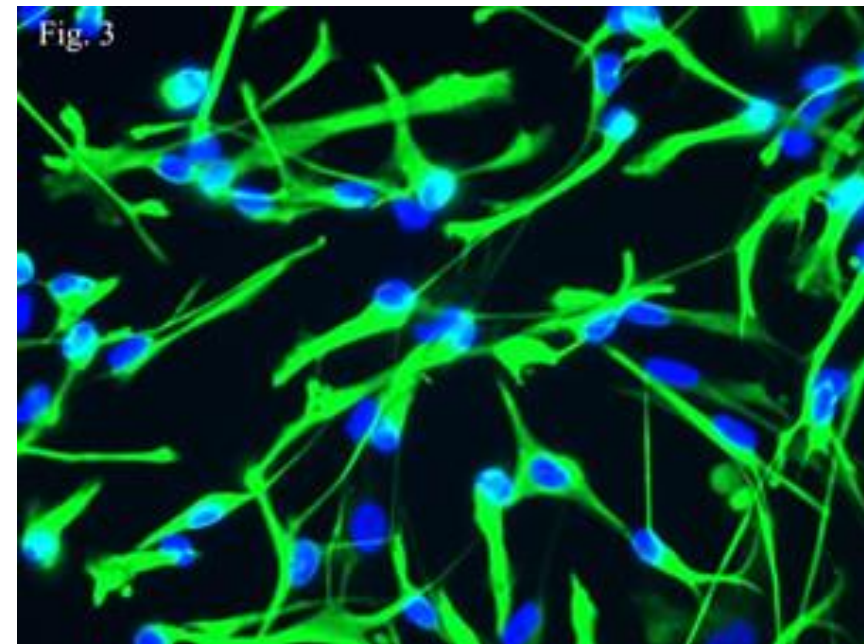


体外培养的人巨噬细胞

(4) 多形型细胞：形态不规则，胞突明显，难以确定形态。 神经元及神经胶质细胞。



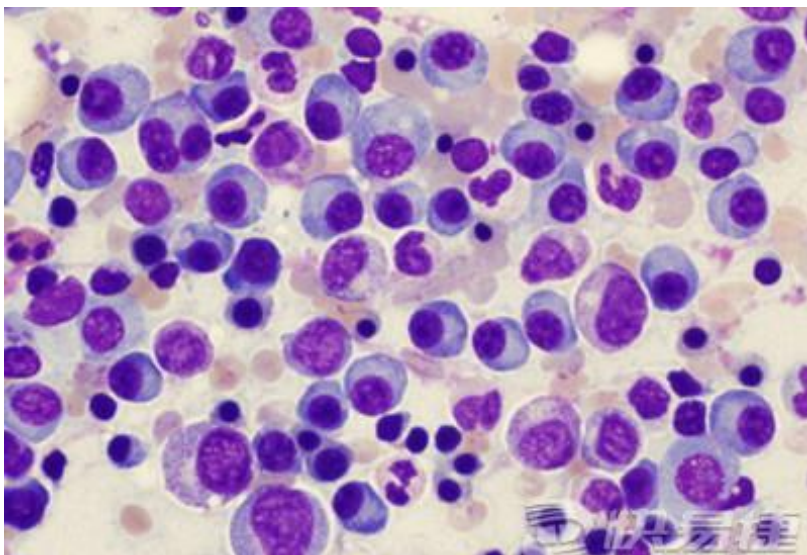
体外培养的大鼠巨噬细胞



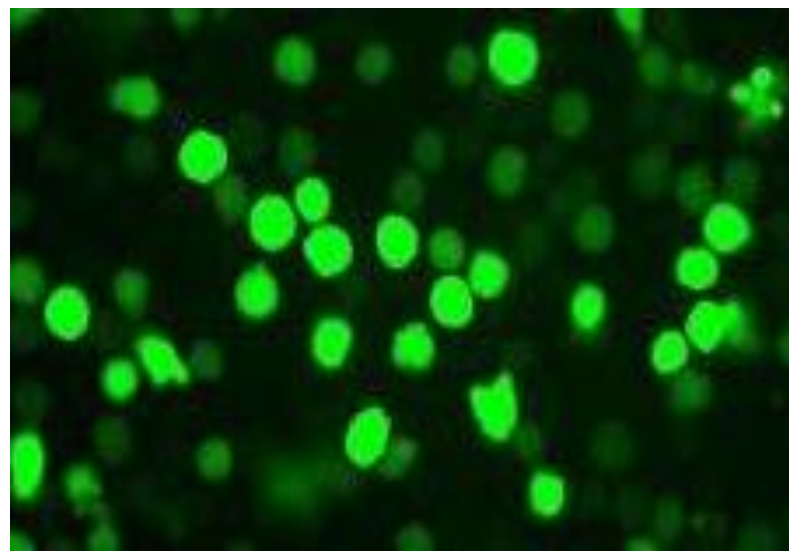
体外培养的人神经胶质细胞

2.非贴壁性细胞（悬浮细胞）

细胞始终为球体，如：白细胞，淋巴细胞，红细胞，杂交瘤细胞。



体内的人骨髓瘤细胞



体外培养的人淋巴细胞



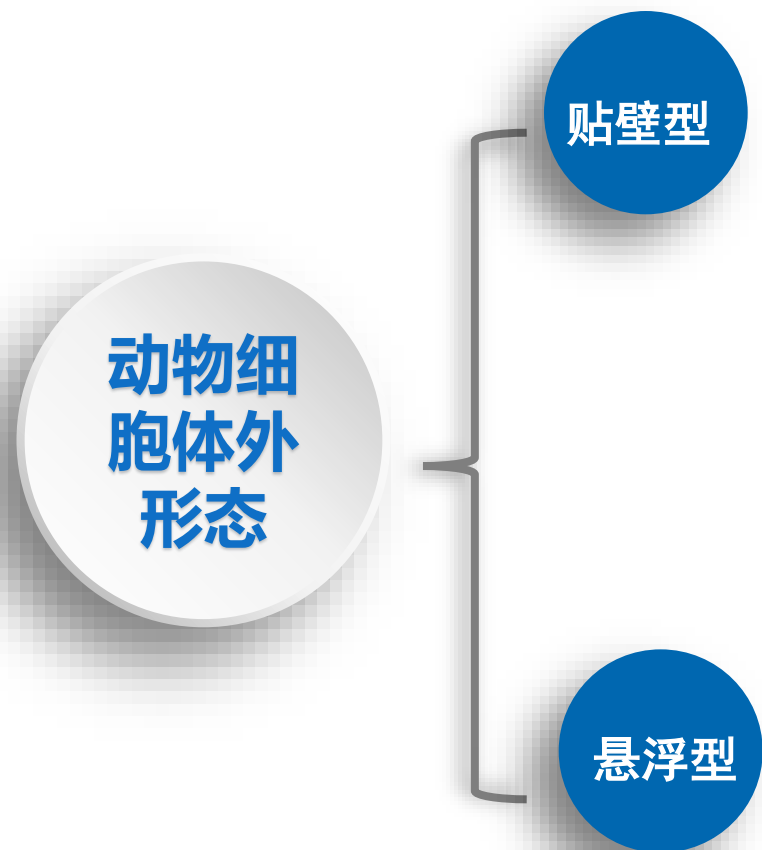
推测：

**贴壁细胞在非贴壁
状态，将是什么形状？**



小

结



成纤维型

上皮型

游走型

多行型

- **强调：**细胞的一般形态是一项并**不可靠的可靠**鉴定指标



三、动物细胞体外培养的基本操作



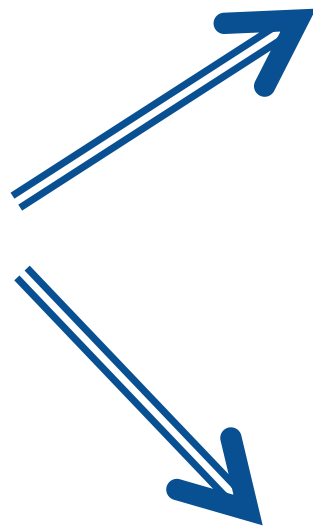


原代培养（Primary Culture）和传代培养（subculture）是动物细胞体外培养两种核心的培养技术及阶段。





(一) 换液



换液

- 概念： 更换培养液；
- 标准：
 - ① 原代培养24h；
 - ② 营养耗竭等；
- 操作：
 - ① 悬浮细胞；
 - ② 贴壁细胞；



过程分析:

换液



弃: 旧培养液

①贴壁细胞

②悬浮细胞

离心

添: 新培养液

①贴壁细胞

②悬浮细胞

吹打




标准操作：

悬浮细胞

- 1、吸取细胞悬液至离心管；
- 2、离心；800rpm，离心8min
- 3、弃掉旧培养液；
- 4、添加新鲜培养液；
- 5、轻轻吹打成细胞悬液；
- 6、移入培养瓶，常规培养；

贴壁细胞

- 1、吸取并弃掉旧培养液；
 - 2、PBS轻轻吹打细胞，弃掉PBS；
 - 3、添加新鲜培养液；
 - 4、常规培养；
- 



修正操作：

悬浮细胞

- 1、吸取细胞悬液至离心管；
- 2、离心；800rpm，离心8min
- 3、弃掉旧培养液；
- 4、添加新鲜培养液；
- 5、轻轻吹打成细胞悬液；
- 6、移入培养瓶，常规培养；

措施：静置5min



离心对于动物细胞膜造成损伤；



完全改变细胞的生存环境；

措施：更换2/3-1/2





(二) 细胞搬家——传代培养





一、实验目的

- (1) 通过虚拟实验室，对动物贴壁细胞的培养过程形成感性认知；
- (2) 完成动物贴壁细胞传代培养的实训操作；

- (1) 掌握动物贴壁细胞传代培养的基本操作过程；
- (2) 观察体外培养细胞的形态及生长状态；
- (3) 熟练无菌操作技术；

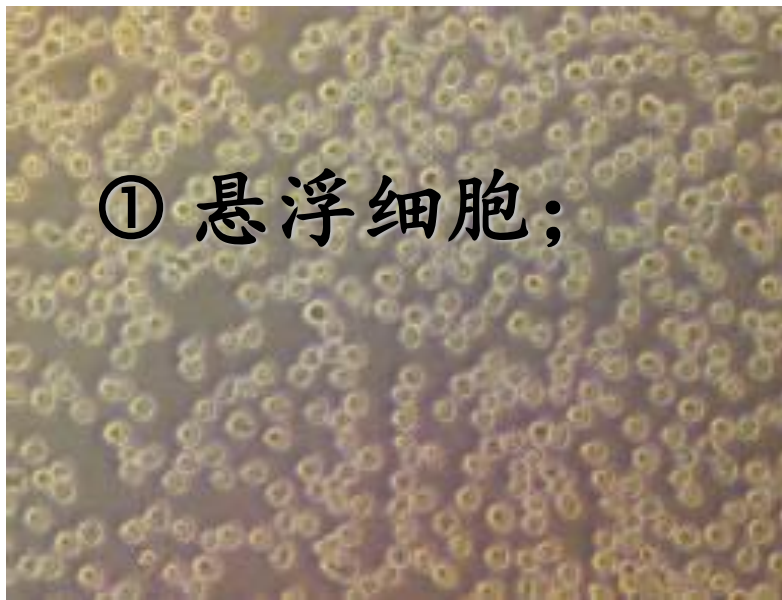


二、实验原理

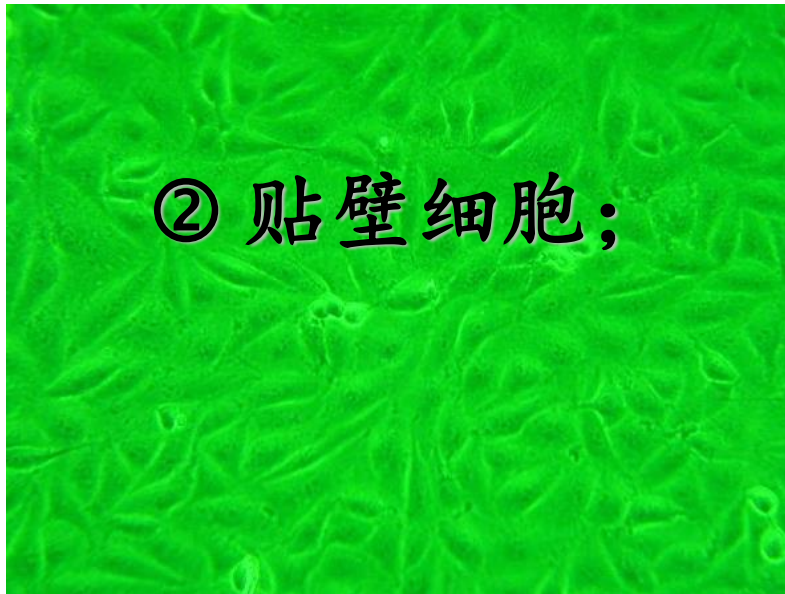
• **概念：** 无论是否稀释，将细胞从一个培养瓶转移或移植到另一个培养瓶，称为传代或传代培养。

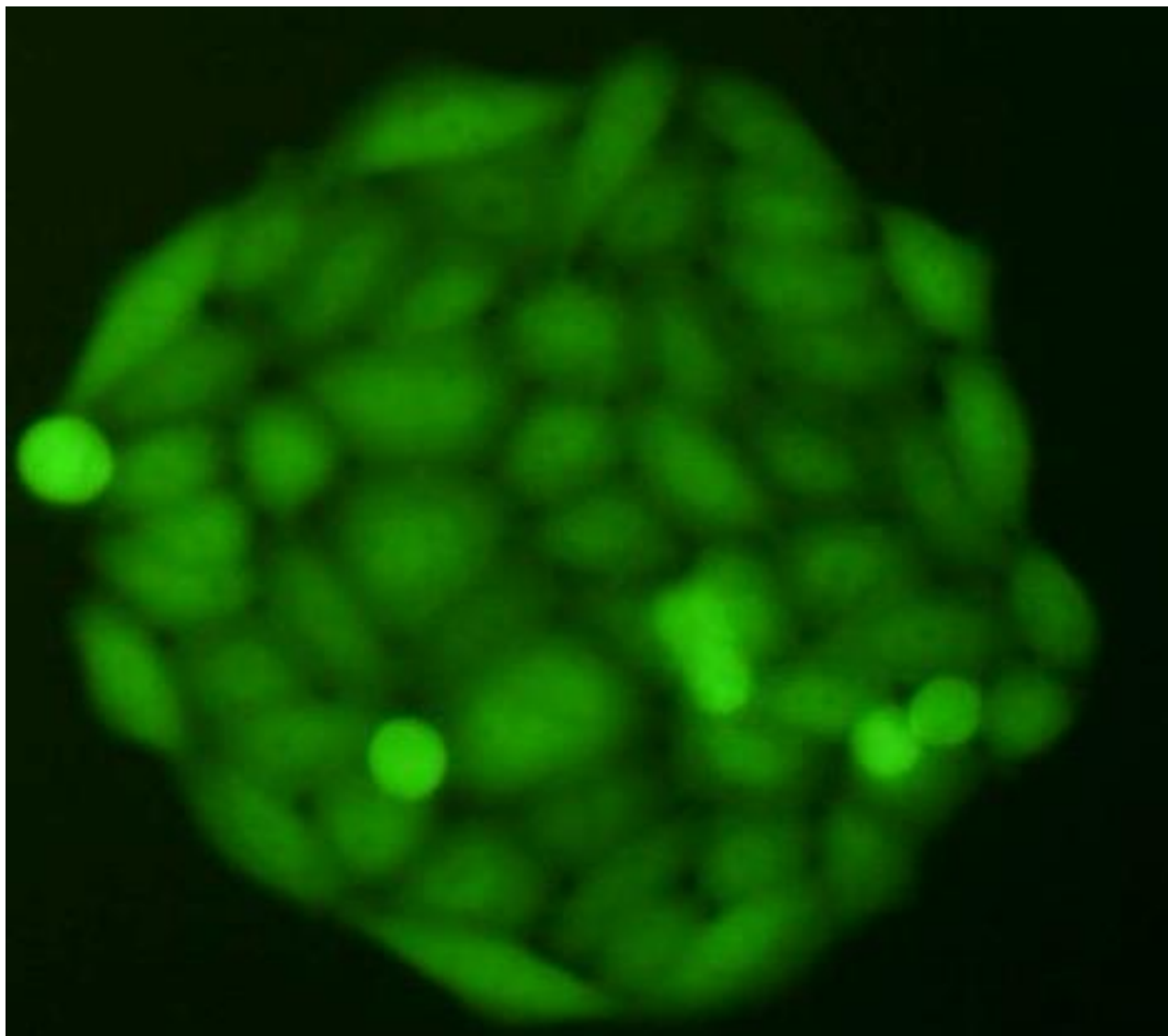
• **标准：** ① 接触抑制； ② 密度抑制；

• **操作：** ① 悬浮细胞；



② 贴壁细胞；





例：贴壁细胞的传代

过程分析：

现状：细胞贴壁状态



？

胰蛋白酶液

目的：分成两瓶培养





三、实验器材

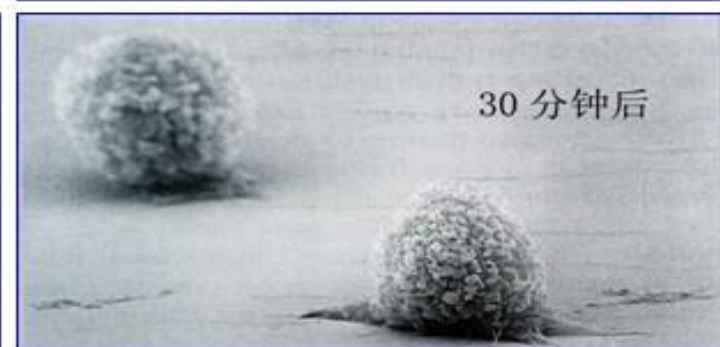
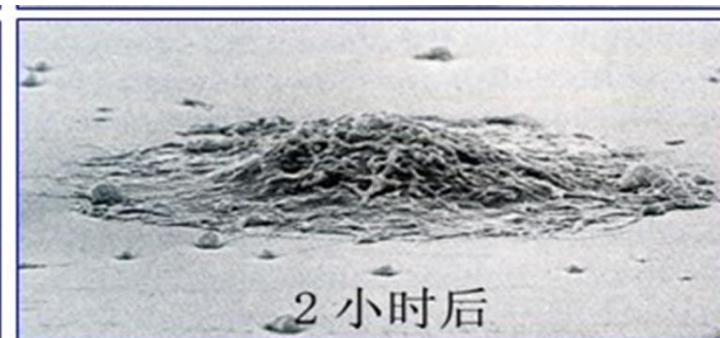
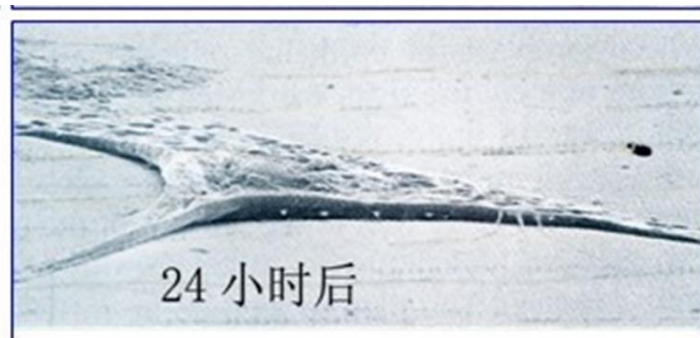
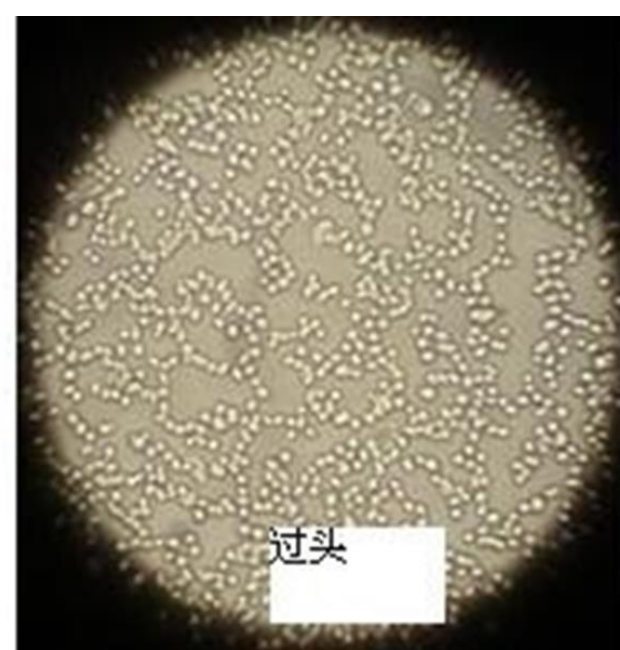
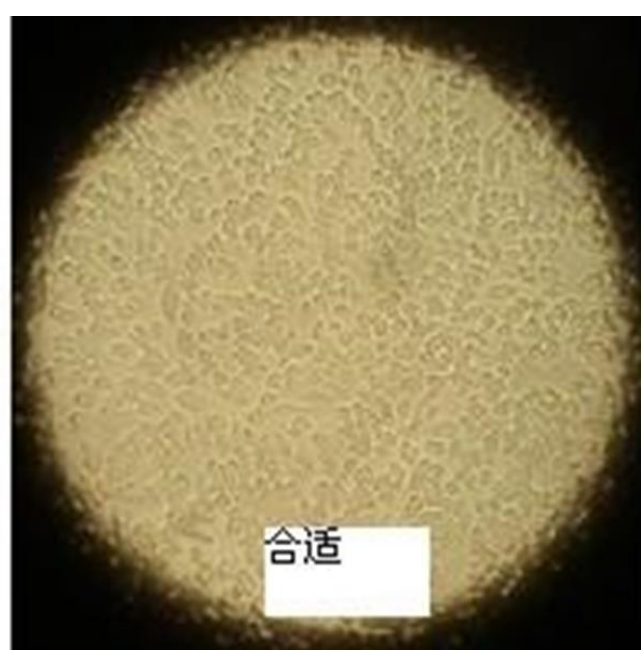
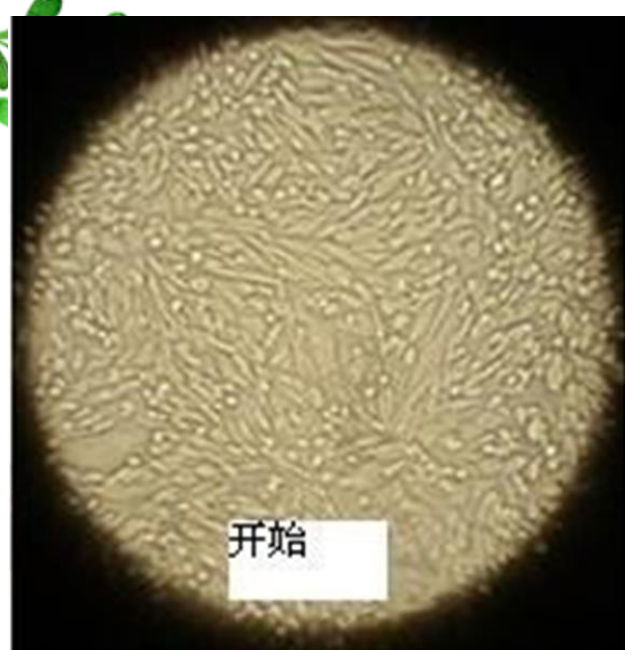
1. 材料：人肺癌细胞A549，冻存管；
2. 试剂：DMEM基本培养液、胎牛血清、胰酶、DMSO，PBS。
3. 仪器：倒置显微镜，二氧化碳培养箱，压蒸汽灭菌锅，超净工作台等。





四、实验步骤

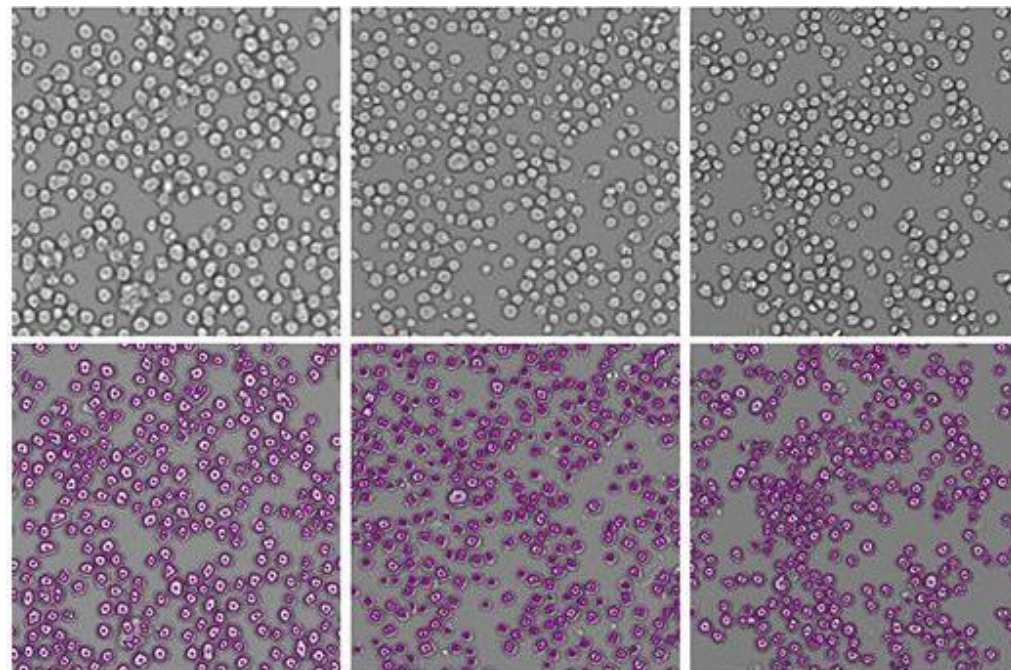
1. 吸光培养瓶中的培养液，（？）清洗
2. 加入1-2ml 0.25%的胰蛋白酶液（以消化液能覆盖整个瓶底为准），静置2-10 min（显微镜下动态监测）。
3. 吸去胰蛋白酶液，加入培养液。
4. 用吸管吸取瓶内培养液，反复吹打瓶壁细胞，形成细胞悬液。
5. 吸取1/10—1/40细胞悬液，接种于新的培养瓶内。
6. 加适量新鲜培养液于接种了细胞悬液的新培养瓶内，培养。





那么，悬浮细胞怎么传代呢？

- 1. 离心：800rpm，离心8min；
- 2. 去上清；
- 3. 加新鲜培养液，吹打成细胞悬液；
- 4. 移至培养瓶，培养。





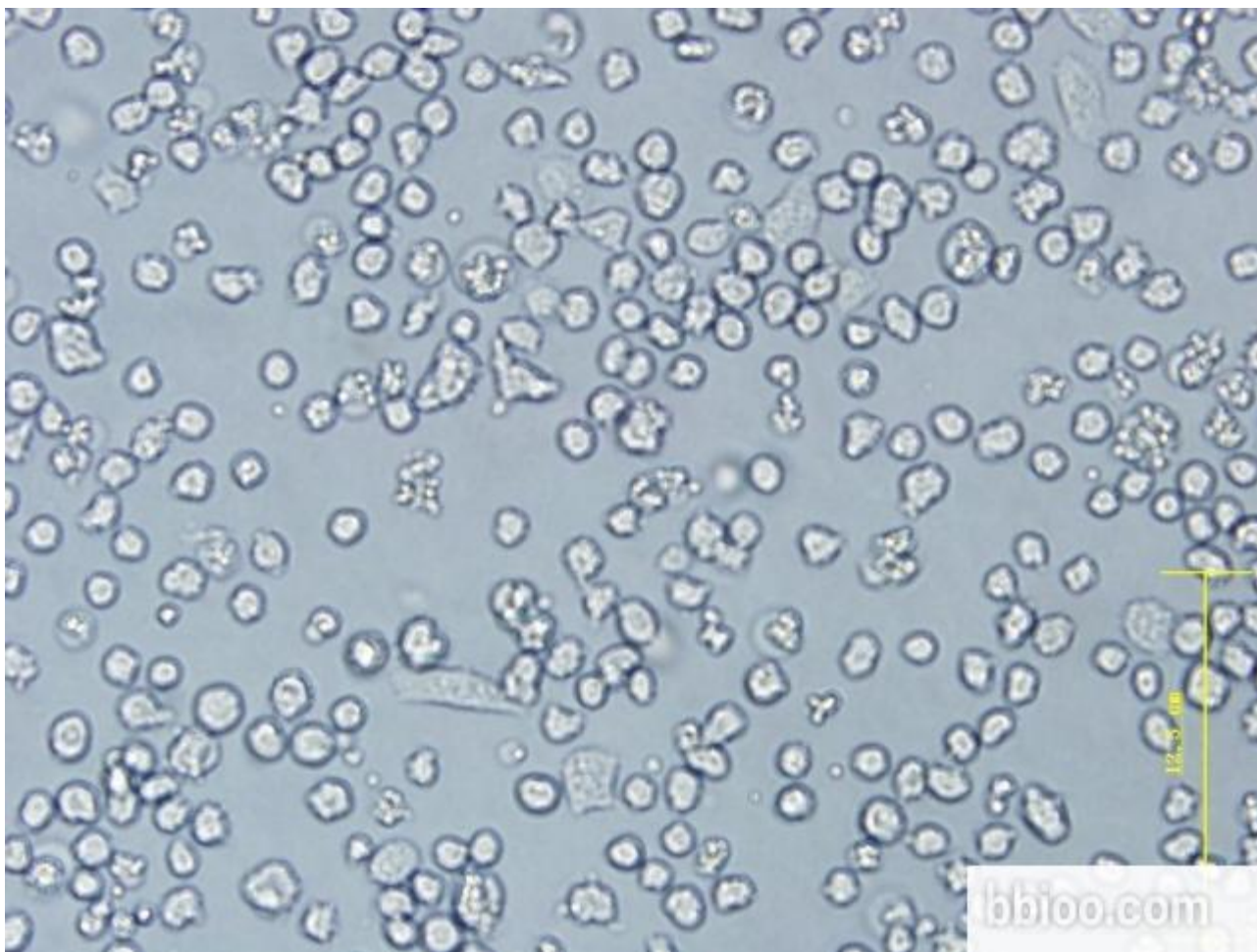
悬浮生长细胞的传代

① 离心法传代：离心（800转/分）去上清，沉淀物加新培养液后再混匀传代。

② 直接传代法：悬浮细胞沉淀在瓶壁时，**将上清培养液去除1 / 2—2 / 3**，然后用吸管直接吹打形成细胞悬液再传代。



其实，还有半悬浮细胞



- 1、贴壁不牢，
- 2、直接吹打法使细胞从瓶壁脱落下来，进行传代。



注意！

- 所谓细胞“一代”，即传代1次；不等同于一个细胞周期。
- “某一细胞系为50代，即该细胞已传代50次”。
-

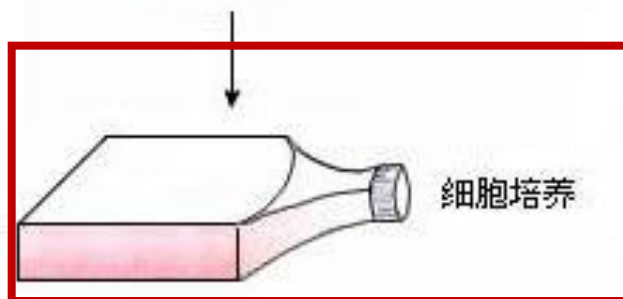
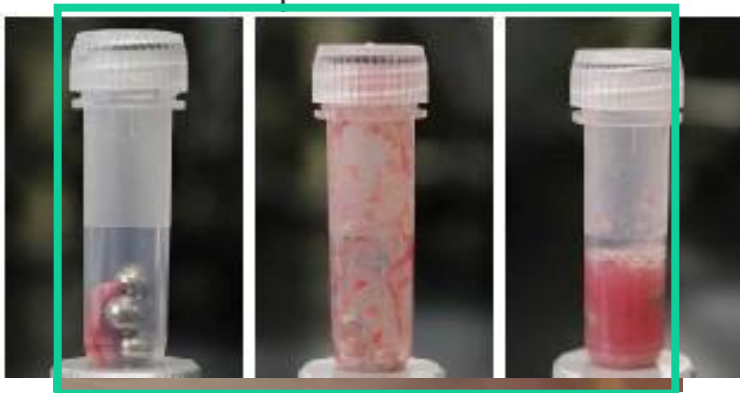
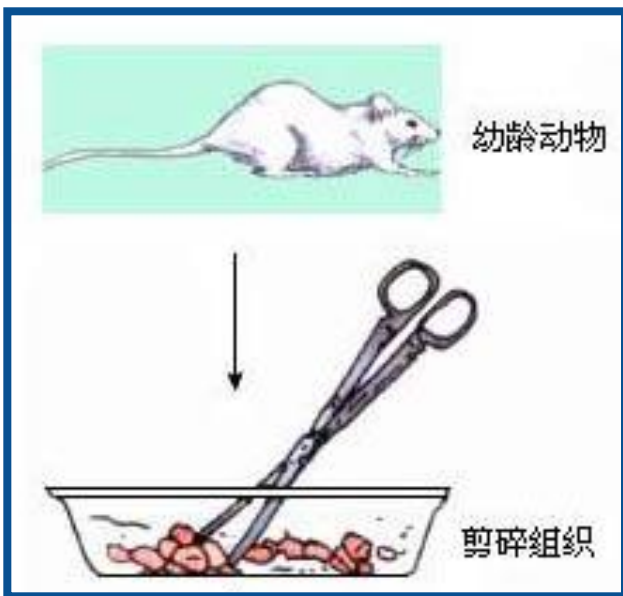
传代的频率或间隔：与培养液的性质、接种细胞的数量和细胞增殖速度有关。

细胞代数学说（亦称细胞分裂次数学说）：

人体细胞相当于每2.4年更新一代。

人体细胞在培养条件下平均可培养50代，每一代相当于2.4年，称为弗列克系数。据此，人的平均寿命应为 $2.4 \times 50 = 120$ 岁。





动物机体组织

剪碎 酶解

单个细胞

分装

原代培养

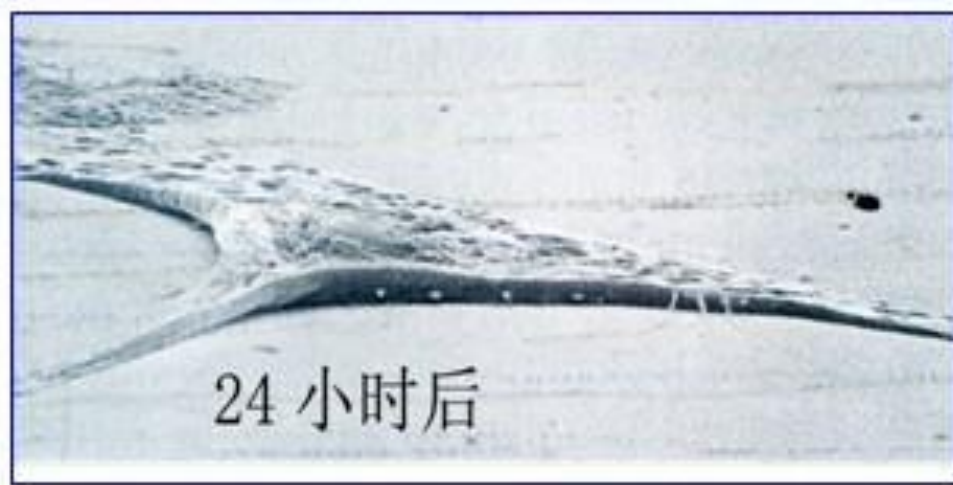
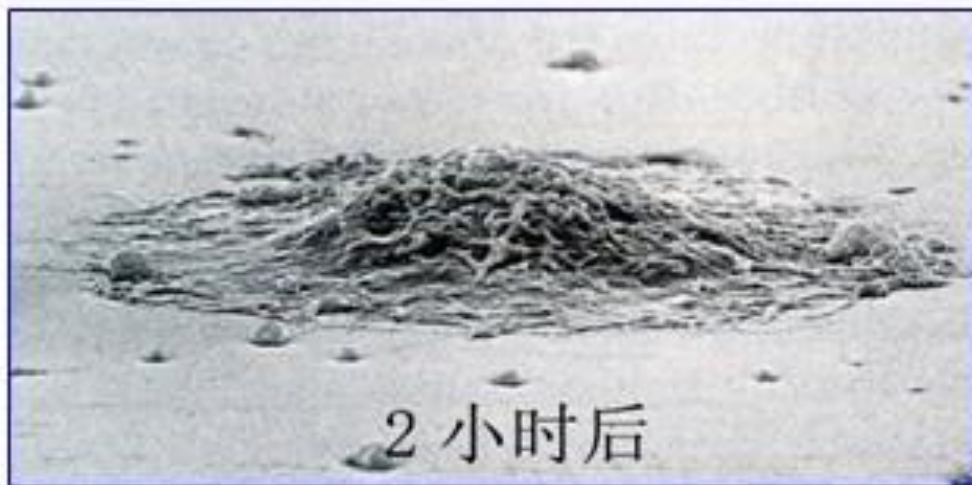


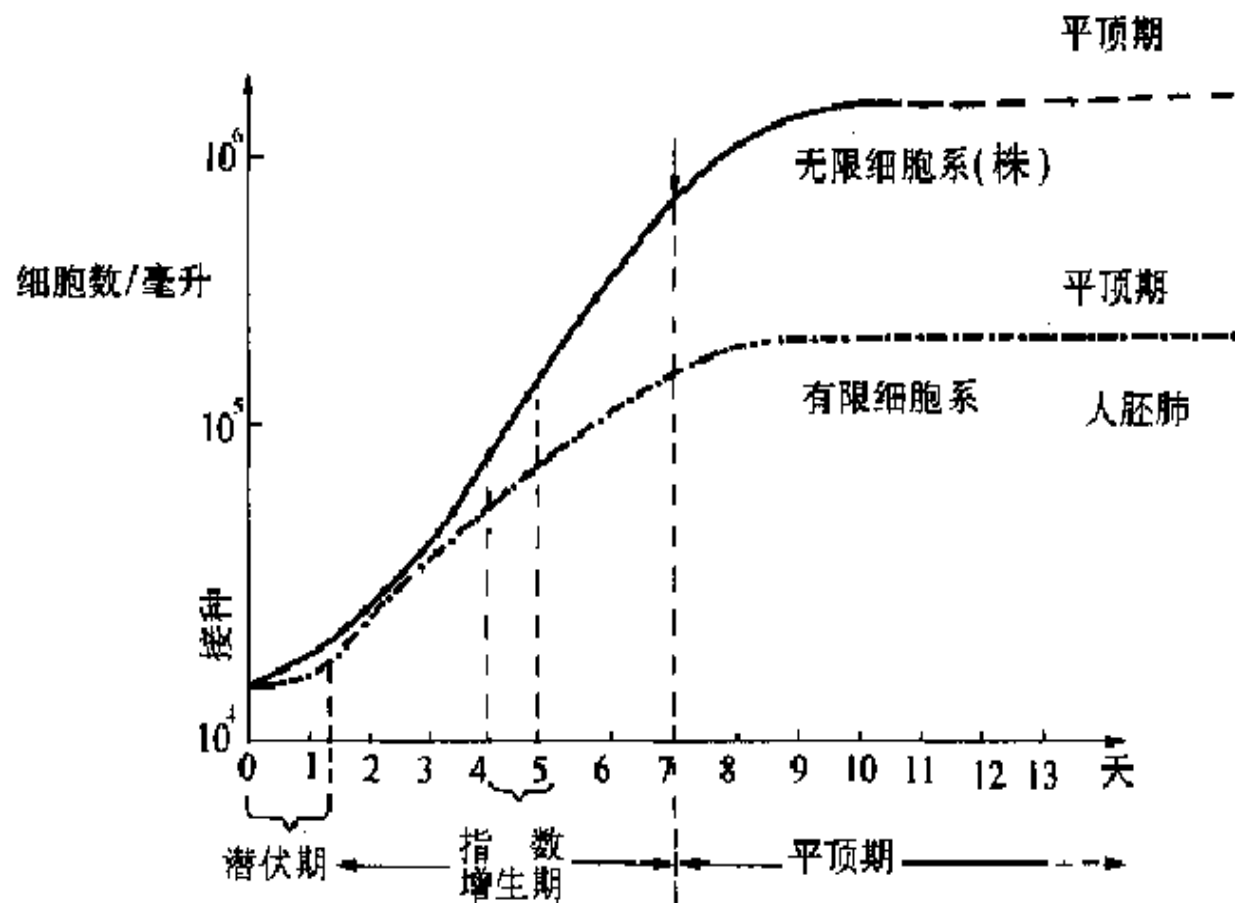
传代培养





2、传代后贴附生长细胞的生长过程

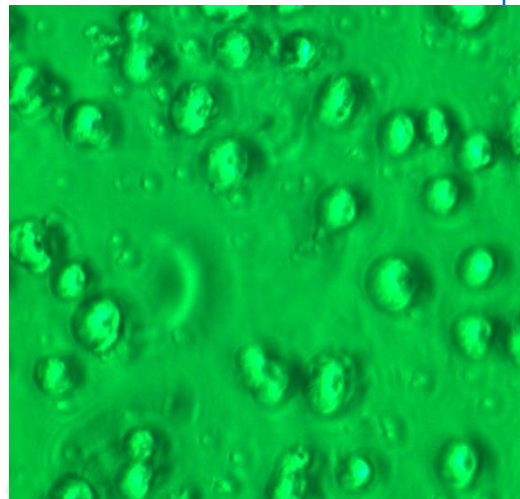




- 游离期
- 贴壁期
- 潜伏期
- 对数生长期
- 停止期 (平台期)

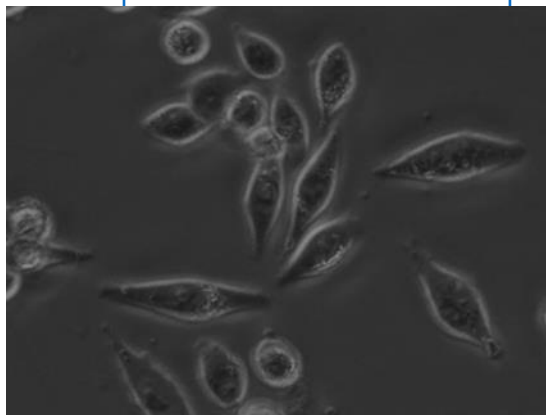
游离期

- 悬浮期；细胞呈悬浮状态，此时细胞质回缩，胞体呈**圆球形**。
10min-4h；



贴壁期

- 细胞附着于底物（胶原、玻璃、塑料）。
10min-4h。



潜伏期

- 此期之前的细胞**有生长活动，而无细胞分裂**。
- 二倍体细胞该期时间长：(24~96h)；
- 连续细胞系时间短：(10~30min)。





④ (4) 对数生长期 (Logarithmic growth phase)

细胞增殖最旺盛时期；

一般用细胞分裂指数 (Mitotic index, MI) 表示，即细胞群中每1000个细胞中的分裂相数。

体外培养细胞分裂指数介于0.1~0.5%，且受细胞种类培养液成分、pH、温度等影响。

活力最佳，最适合进行实验研究。



② (5) 停滞期（平台期）（Stagnate phase）：

细胞虽有活力但不再分裂。

原因？

接触抑制（Contact inhibition）、

密度抑制（Density inhibition）



分散生长



接触抑制




接触抑制消失

注意：在此时应及时**进行换液或传代**，否则因细胞中毒受损，大量细胞出现死亡，至少再传1-2代后，细胞才能恢复。




3、无菌操作的注意事项






【操作野消毒】 无菌培养室每周都要用0.2%的新洁尔灭拖洗地面一次(拖布要专用)。超净工作台台面每次实验前要用**75%酒精擦洗**。然后**紫外线消毒**30min。

注意事项：在工作台面消毒时**切勿将培养细胞和培养用液**同时照射紫外线，消毒时工作台上用品不要过多或重叠放置。否则会遮挡射线降低消毒效果。一些操作用具如移液器、废液缸、污物盒、试管架等用75%酒精擦洗后置于台内同时紫外线消毒。





【培养前准备】 在开始实验前要制定好**实验计划**和**操作程序**。**有关数据的计算要事先**做好。根据实验要求，准备各种所需器材和物品、清点无误后将其放置操作场所（培养室、超净台）内，然后开始消毒。

注意事项：避免开始实验后，因物品不全往返拿取而增加污染机会。



【洗手和着装】原则上和外科手术相同。穿装细胞培养室内紫外线照射30min的清洁工作服。


开始操作前要用75%酒精消毒手。

如果实验过程中手触及可能污染的物品和出入培养室都要重新用消毒液洗手。

进入原代培养室需彻底洗手还要戴口罩、着消毒衣帽。







【操作】 进行培养时，动作要准确敏捷，但又不必太快，以防空气流动，增加污染机会。

不能用手触及已消毒器皿，如已接触，要用火焰烧灼消毒或取备品更换。

为拿取方便，工作台面上的用品要有合理的布局，原则上应是右手使用的东西放置在右侧，左手用品在左侧，酒精灯置于中央。



组织或细胞在未做处理之前，勿过早暴露在空气中。





【火焰消毒】 在无菌环境进行培养或做其它无菌工作时，首先要**点燃酒精灯或煤气灯**。以后一切操作，如按装吸管帽、打开或封闭瓶口等，都需在**火焰近处并经过烧灼进行**。




- 
- 注意事项：**金属器械不能**在为焰中烧的时间过长，以防退火，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。
 - 吸取过营养液后的**吸管**不能再用火灼烧，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。
- 



- 开启、关闭长有细胞的**培养瓶时**，火焰灼烧时间要短。防止因温度过高烧死细胞。
- 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






培养液在未用前，**不要过早开瓶**；用过之后如不再重复使用，应立即封闭瓶口，直立可增加落菌机会。


吸取营养液、PBS、细胞悬液及其它各种用液时，均应**分别使用吸管，不能混用**，以防扩大污染或导致细胞交叉污染。





工作中不能面向操作野讲话或咳嗽，以免唾沫把细菌或支原体带入工作台面发生污染。

操作前用酒精擦拭超净台面及双手。手或相对较脏的物品不能经过开放的瓶口上方，瓶口最易污染，加液时如吸管尖碰到瓶口，则应将吸管丢掉





- 随时检查培养物的**健康状况**，学会肉眼初级判断培养物是否染菌，及时有效的处理染菌物品，培养物。





注意事项

- (1) 实验中用到的培养液及其他溶液先于37℃温育一段时间。
- (2) 向培养有细胞的培养瓶中加入液体时，一般沿着生长细胞的对面瓶壁注入，然后慢慢转动培养瓶。
- (3) 操作过程中要尽量轻拿轻放。
- (4) 酶解消化过程中要不断观察，消化过度会对细胞造成损害，消化不够则难于将细胞解离下来。





【课后作业】

- (1) 完成超星泛雅平台有关细胞操作的视频观摩。
 - (2) 记录独立开展传代培养的操作心得和体会；
 - (3) 拍照记录细胞传代后的形态，通过对比贴壁前后细胞的状态，对细胞的活性和无菌操作情况进行判断；
- 两次实验（8学时），一个报告册。**





补充学习内容：原代培养





原代培养（Primary Culture）和传代培养（subculture）是动物细胞体外培养两种核心的培养技术及阶段。



(一) 原代培养

- **概念：** Primary Culture, 细胞、组织或器官开始的培养。
- **特点：** 最接近生物体的生活状态（遗传物质）。



鸡胚

1、原代培养的原理

如何
分离
外细



机械法



酶解法



组织块法



1.1 机械法



0.3克心脏组织, 0.3克1.6mm不锈钢珠, 0.6mL缓冲液



十字组织研磨器



150目 铜网 （1平方英寸内的孔数）



1.1 机械法

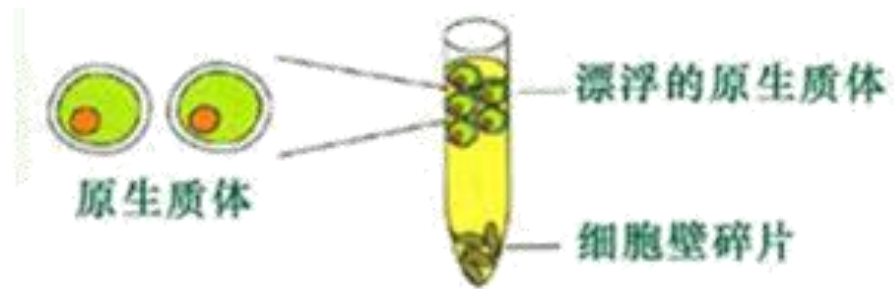
- § 机械法，即物理的方法！
- § 手段：研磨之类的力破碎组织；
- § 特点：速度快，效率低，细胞损伤大。



1.2 酶解法



纤维素酶,
半纤维素酶
果胶酶



细胞间质：动物、植物





1.2 酶解法

- § 酶解法，即化学的方法！
- § 手段：胰蛋白酶，胶原蛋白酶；
- § 特点：速度较慢，细胞损伤较小。

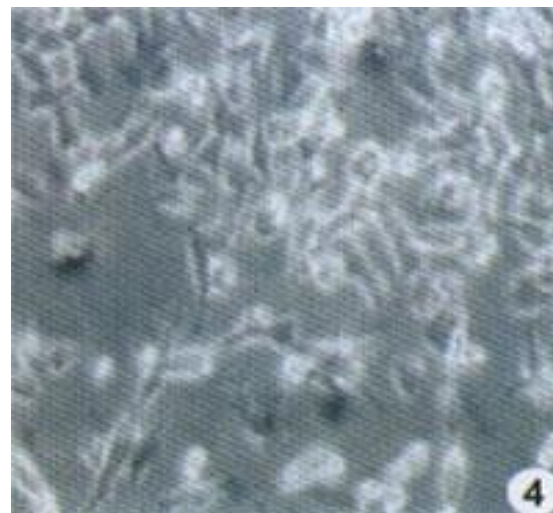
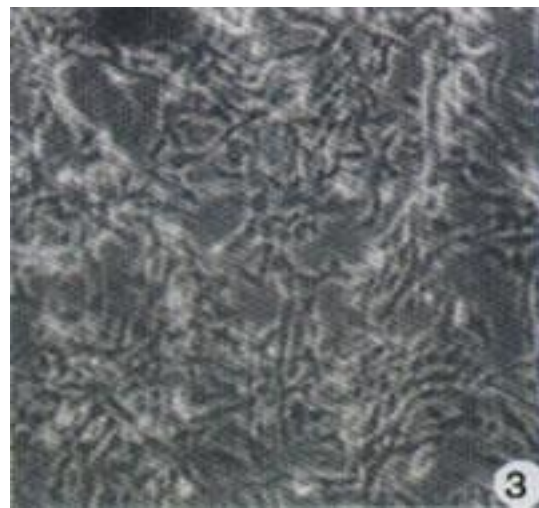
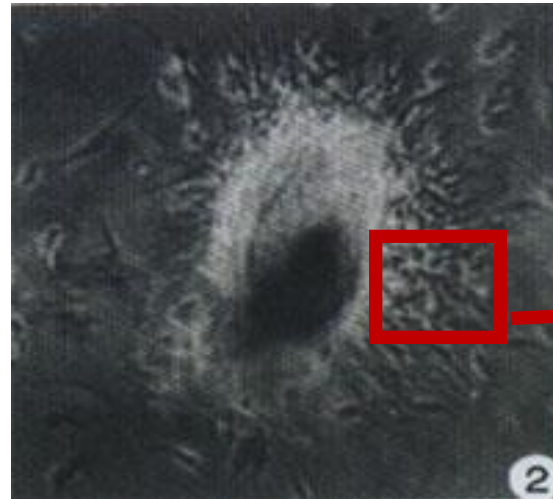
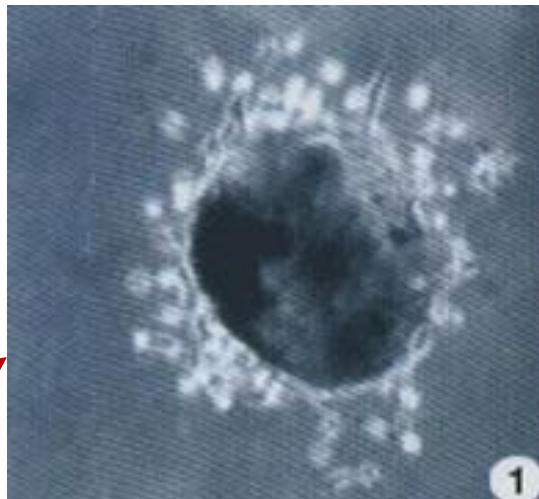




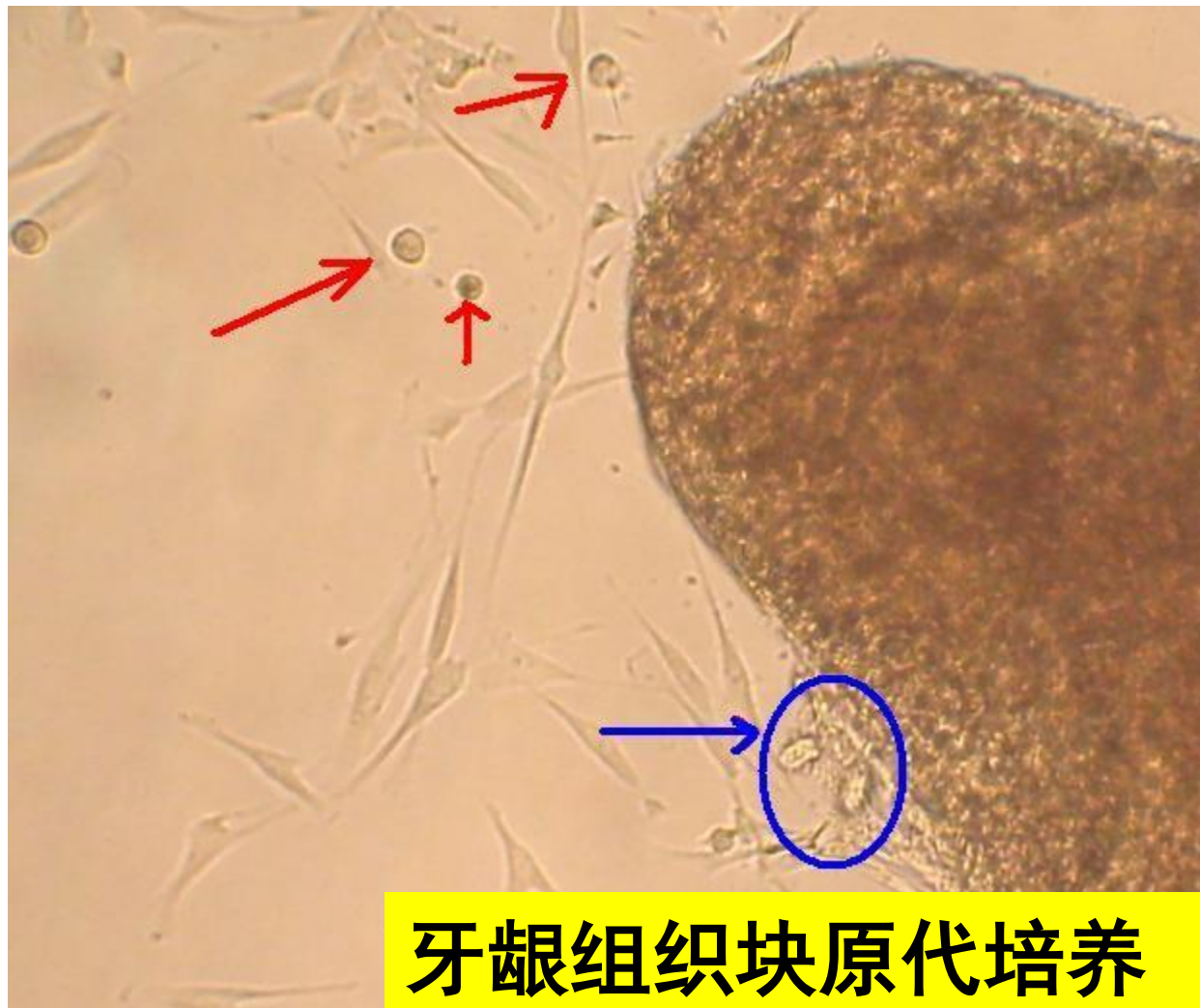
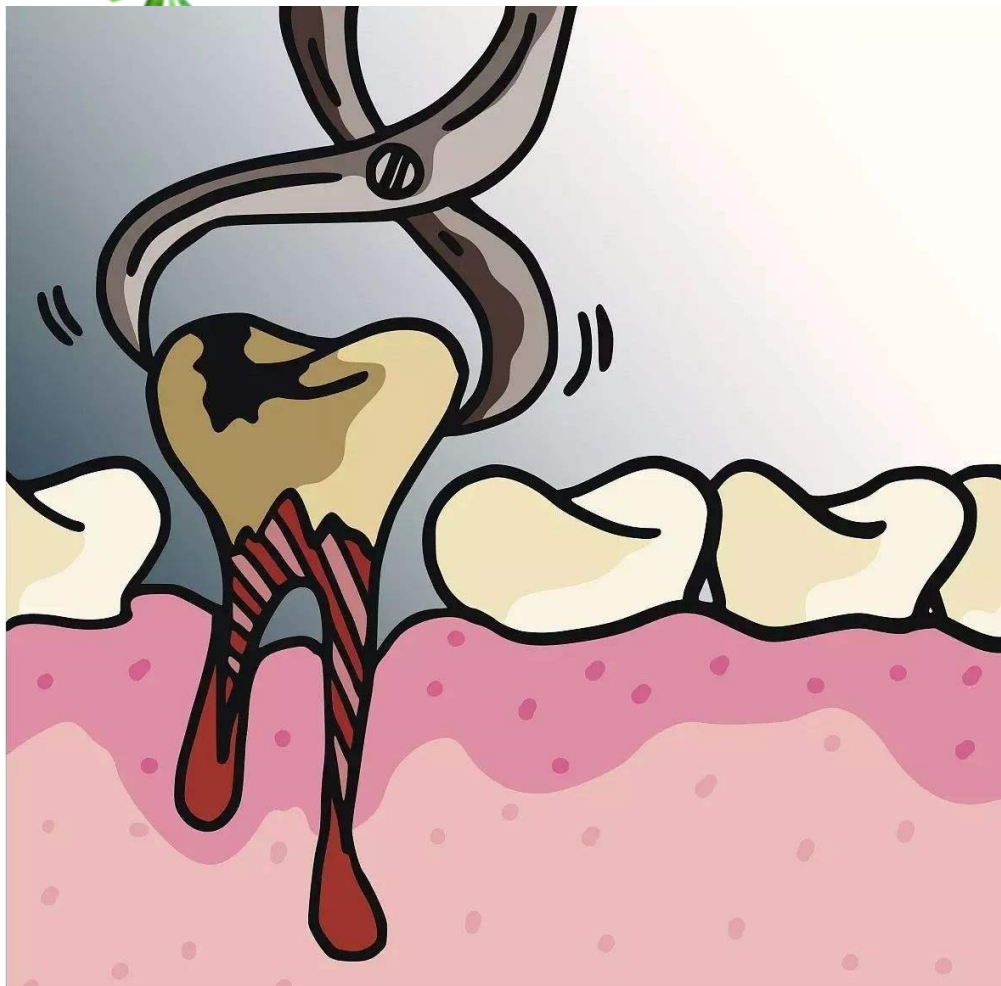
伤口为什么会愈合？



1.3 组织块法



单层细胞汇合形成生长晕



牙龈组织块原代培养



1.3 组织块法

- § 组织块法，即生物的方法！
- § 手段：细胞的分裂生长；
- § 特点：速度最慢，细胞几乎无损伤。





实验任务：

请对小鼠肝脏细胞进行原代培养。





实验原理



实验步骤



为什么

可以获得单个的
小鼠肝脏细胞。



怎么做

获得小鼠的肝
脏细胞。





2、原代培养的基本操作

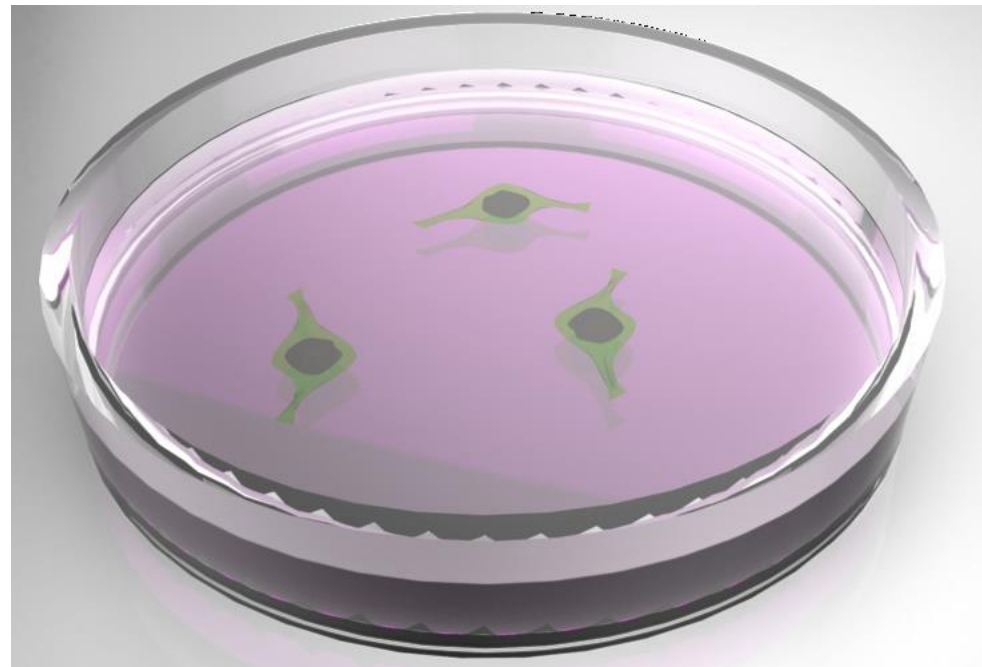
——以酶解法为例，获得小鼠的肝脏细胞

任务：酶解法获得小鼠的肝脏细胞



处死

酶解法

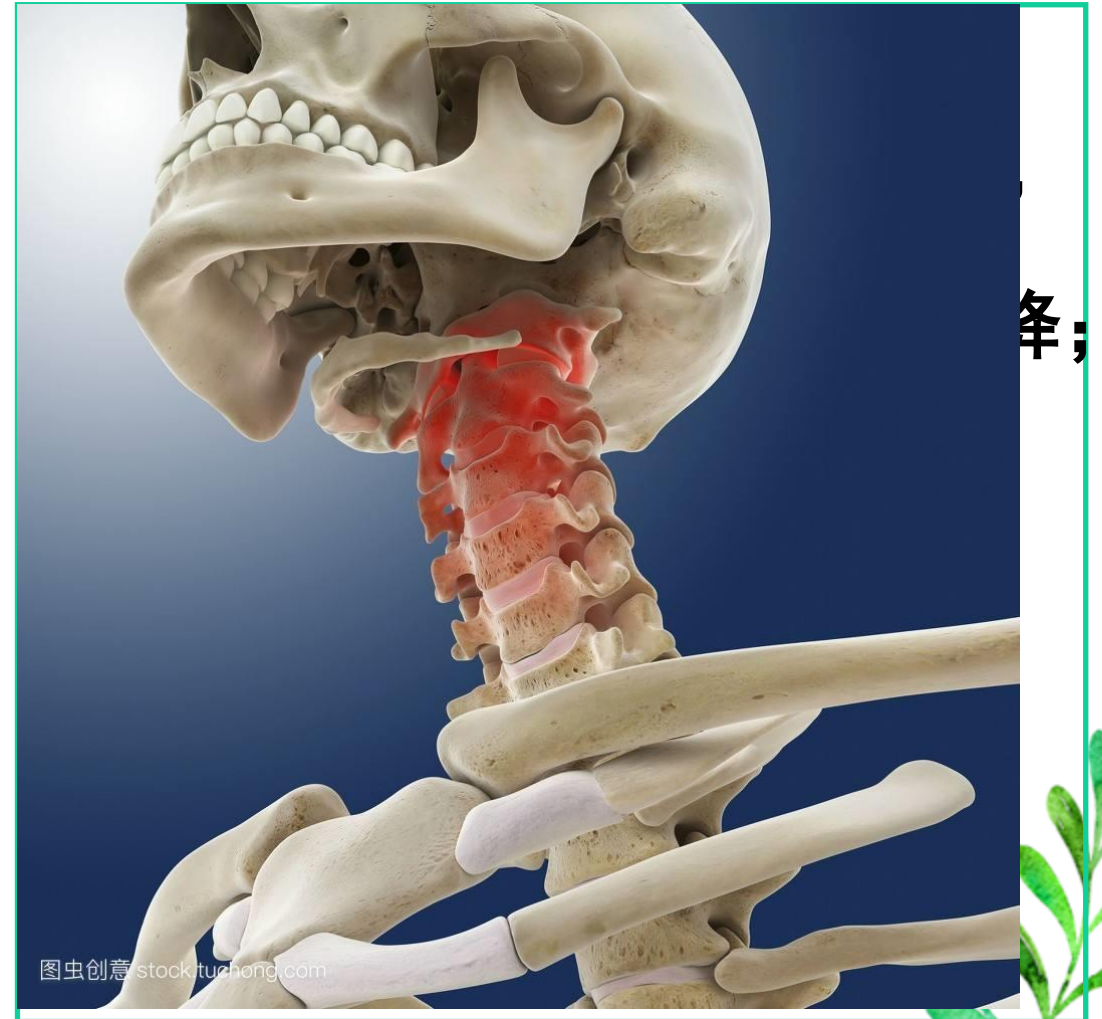


酶解

培养

酶解法获得小鼠肝脏细胞

- 1、**处死**：颈椎脱臼；
- 2、**消毒**：70%酒精处理 Time；
- 3、**解剖，取肝脏**；
- 4、**清洗**：hank's，3次；
- 5、**剪碎**；
- 6、**清洗**：hank's，3次；



备；



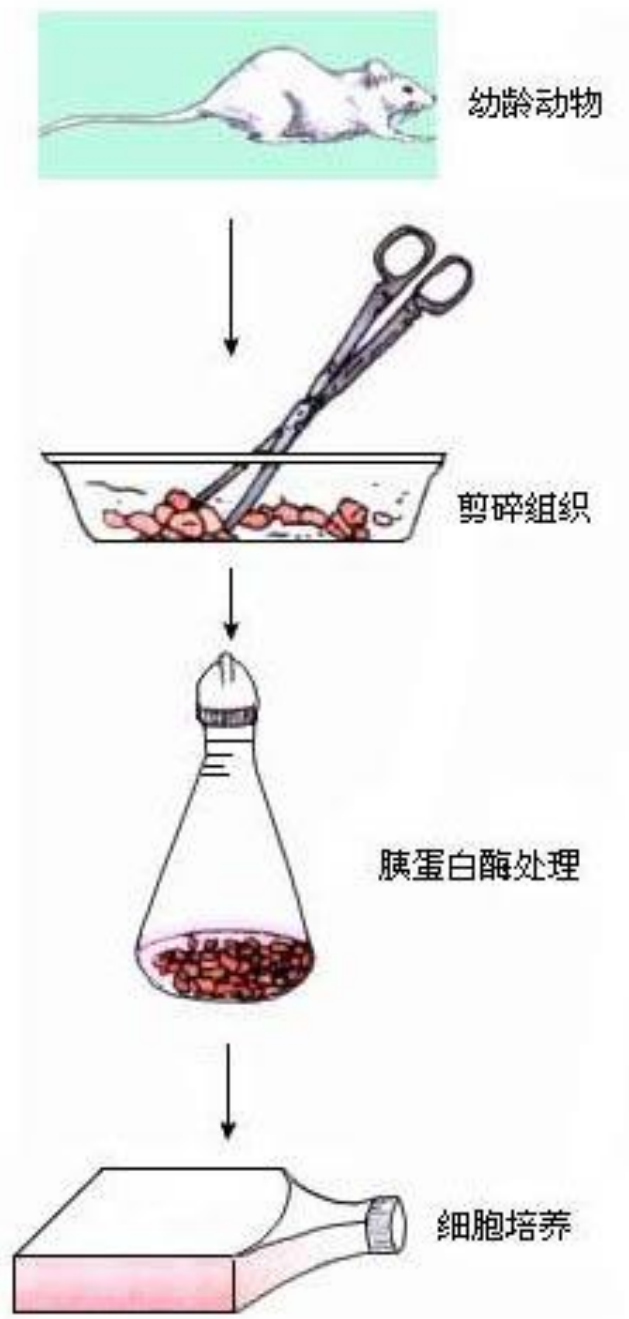
机械法获得小鼠肝脏细胞操作步骤

- 1、处死，脱臼；
- 2、酒精消毒；
- 3、解剖取小鼠肝脏；
- 4、Hank's液清洗血污，3次；
- 6、剪碎；
- 7、洗涤，3次；
- 8、800目铜网上，滴加培养液，轻轻研磨过滤；
- 9、吸取细胞悬液；
- 10、800rpm，离心8min，完全培养液清洗3次；
- 11、细胞调整到 5×10^5 个/ml左右；
- 12、37℃, 5%CO₂, 无菌培养。

组织块法获得小鼠肝脏细胞操作步骤



- 1、处死，脱臼；
- 2、酒精消毒；
- 3、解剖取小鼠肝脏；
- 4、Hank's液清洗血污，3次；
- 6、剪碎；
- 7、洗涤，3次；
- 8、**正置：薄层培养法；**
倒置：翻转干涸培养法；
- 9、37℃, 5%CO₂, 无菌培养。



小结

1、以**酶解法**为例，详细讲解了原代培养的操作步骤。

2、演绎了**机械法及组织块法**的操作步骤。

3、**作业：**请写出淋巴细胞的原代培养操作步骤，上传至网络教学平台。



回顾

细胞培养基本技术

原代

传代

冻存

复苏

检查

真实，机械法，酶解法，组织块法的原理及操作

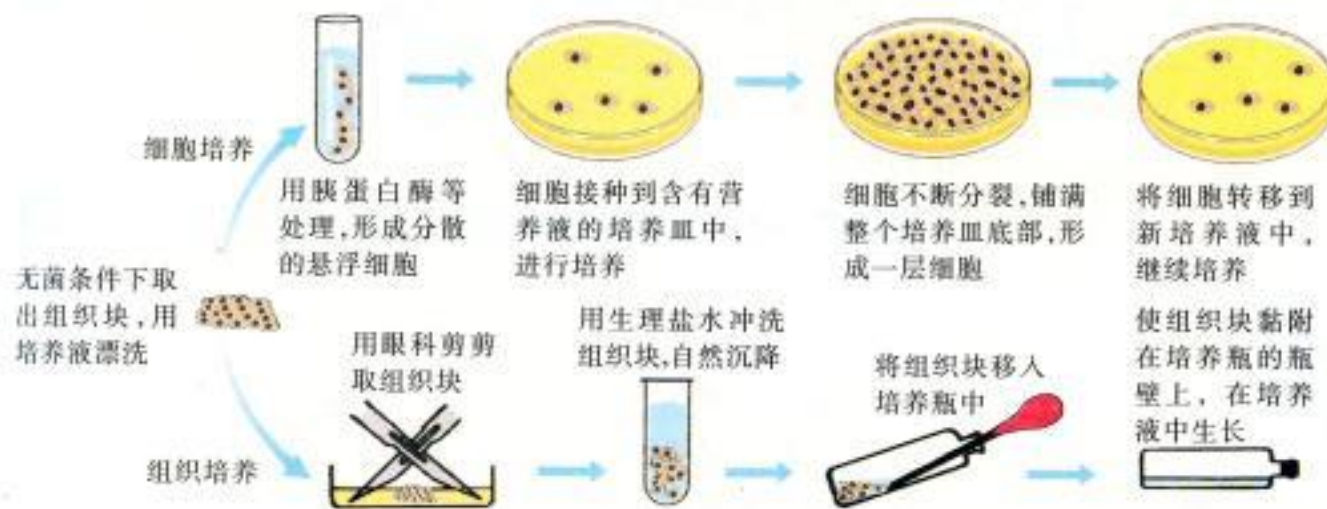


图 2-10 动物细胞与组织培养过程示意图