

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



实验十一 动物贴壁细胞的冻存

一、实验目的

- (1) 掌握细胞冻存的基本原理；
- (2) 熟练进行细胞冻存的操作；
- (3) 熟练掌握无菌操作技术；

那么，如何冻存细胞呢？



冻存管

二、实验步骤

以DMSO为例介绍贴壁细胞的冻存方法

- 1、预先配制冻存液：含20%血清培养基，10% DMSO，70%基本培养液，4℃ 预处理
- 2、收集对数期细胞，获得单细胞悬液？
- 3、台盼蓝拒染，计算细胞存活率（至少应该在90%以上）；
- 4、细胞悬液在4℃条件下800转离心10分钟；
- 5、将沉淀的细胞重新悬浮在冷冻液中（大约 5×10^6 细胞/0.5 ml冷冻液）；
- 6、密封后标记冷冻细胞名称和冷冻日期。

- 4 °C , 30-60分钟
- -20 °C , 1-2h
- -80 °C , 短期存放 (3个月)
- -196 °C , 长期存放 (1年)



程序降温仪

标准的冻存程序：**降温速率 $-1 \sim -2^{\circ}\text{C}/\text{min}$** ；当温度达 -25°C 以下时，可增至 $-5^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；到 -100°C 时，则可迅速浸入液氮中。

三、注意事项

1. 保证慢冻快融的原则。
2. 水浴锅内冻存管太多，导致传热不佳，使融化时间延长。
3. 常温下DMSO对细胞存在伤害，冻存液需要预降温至4℃，细胞接触冻存液后要迅速移至低温冰箱内降温。
4. 离心前切记平衡，避免导致离心机损坏和细胞丢失。
5. 一次复苏细胞过多，更换吸头和吸管，避免导致细胞交叉污染。



四、作业

- (1) 完成并分析你所做的细胞冻存实验。
- (2) 对于细胞培养三个操作的心得体会。