

### 1. 如何选择培养基?

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，各种目的无血清培养的首选是 AIM V 培养基（SFM）。

### 2. 为什么要热灭活血清?

加热可以灭活补体系统。激活的补体参与溶解细胞事件，刺激平滑肌收缩，细胞和血小板释放组胺，激活淋巴细胞和巨噬细胞。在进行免疫学研究、培养 ES 细胞、昆虫细胞和平滑肌细胞时，推荐使用热灭活血清。

### 3. 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确定。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。

### 4. 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 L-谷氨酰胺的衍生物，将其不稳定的  $\alpha$ -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。

### 5. 为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。

### 6. 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。

### 7. 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。

#### 8.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。

#### 9.Hank's 平衡盐溶液(HBS)要在空气中使用,不需要 CO<sub>2</sub> 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,碳酸氢钠的含量在 Eagles (2.2g/L)中比在 Hanks (0.35g/L)中高。碳酸氢钠需用高水平的 CO<sub>2</sub> 平衡,以维持溶液的 PH 值。Eagles 液在空气水平的 CO<sub>2</sub> 中,溶液会变碱, Hanks 液在 CO<sub>2</sub> 培养箱中会变酸。如果希望在 CO<sub>2</sub> 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。

#### 10.Qualified 和 Certified 胎牛血清有什么差别?

Certified 胎牛血清包括了 Qualified 胎牛血清执行的所有的标准检验程序,而且除了这些标准检测,Certified 胎牛血清还有如下一些附加的检测:

#### End-Point Determination of Endotoxin Content

噬菌体检验

生物化学检测

激素的检测

血红蛋白检测

11.二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？

二价离子确实抑制胰蛋白酶活性。EDTA 用来螯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。

12.制备 lipid-DNA 的方法会影响转染效率吗？

是的。对于 LIPOFECTAMINE Reagent，稀释试剂在 100 $\mu$ l OPTI-MEM 中，稀释 DNA 在 100 $\mu$ l OPTI-MEM 中。混合两种溶液在室温下孵育 15 分钟。对于 LIPOFECTIN Reagent，在加入 DNA 溶液前允许稀释的试剂和培养基孵育至少 30 分钟可以增加 3 倍的效率。确保复合物在没有血清的情况下形成。孵育 15 分钟后，在复合物中加入含有血清的培养基(800 $\mu$ l)。(注意以上是 35mm 培养皿使用体积)。对于 LIPOFECTAMINE Plus Reagent DNA 应该在与脂质体混合之前首先与 Plus Reagent 混合。LIPOFECTAMINE 2000 的操作步骤允许在一个很小的体积下混合 DNA 和脂质体，接下来可以不需要换培养基的情况下直接加入。

13.我使用 SF900 II 时，细胞生长良好，但是为什么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。

14.如何检测内毒素(热源)水平？

LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 试验是可用的最敏感和特异的检测细菌内毒素的方法。Levin 和 Bang 发现细菌可引起鲎 (Limulus polyphemus) 血管内的凝集作用。内毒素启动一个细胞内酶原系统(丝氨酸蛋白酶级联反应系统)，通过修饰凝集素，产生一种透明的胶，LAL 中的凝固蛋白，从而，形成不可溶的基质。LAL 试剂缓冲的鲎(血细胞)裂解物。

胎牛血清的内毒素检测是在 Grand Island，按照手册上 Gel-clot 方法进行的。在对血清产品进行内毒素检测前，用无热源的水 1: 10 稀释样品。稀释样品沸水育 5 分钟，以消除抑制剂。(通常，血液中的内毒素结合成份的出现会抑制凝胶过程，使内毒素不能与 LAL 反应。样品预先热处理可以消除这种抑制作用。)

15.我可以使用固体形式的 Murashige Skog 培养基吗？

如果使用固体形式的培养基，需要加入琼脂。琼脂加入前要先灭菌。应该避免 MS 培养基的直接灭菌，应该高压灭菌琼脂溶液，然后把融化的琼脂溶液加入到 MS 培养基中。

16. 20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 时，PH 值的变化情况

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

17. 室温下(25°C)配制的 Tris-HCl 溶液, 在 37°C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°C, 25°C, 37°C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

18. 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 值对细胞的增值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。

19. 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。

20.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。

21.High Five 细胞用多大的密度冻存?

3.0x10E6 cells/ml

22.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。

23. 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。通过使用巴氏德吸液管，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。

24. 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。

25. 如何评估 ES 细胞合格的胎牛血清？

使用 D3 ES 细胞。这是一个对于胎牛血清中生长促进、生长抑制和分化因子非常敏感的细胞系。相关生长效率分析：

当 ES 细胞以非常低的密度传入包含 10% 胎牛血清的生长培养基中，检测开始和支持 ES 细胞克隆的能力。

细胞毒分析：

当以非常低的密度传入包含 30% 胎牛血清的生长培养基中，检测 ES 细胞和 feeder 细胞的生长能力。

相关形态学和分化分析：

检测胎牛血清支持未分化 ES 细胞克隆的能力。通过碱性磷酸酶活性评估分化程度。未分化的 ES 细胞小颜色深红粉红，分化的细胞较大，丰满，颜色较浅。

所有的分析在没有 ESGRO 的情况下进行的，培养基中出现 ESGRO 会掩盖由胎牛血清所导致的问题。（ESGRO 或 LIF 经常用来保持 ES 细胞处于未分化状态。）

经过培养发现，大约 8 批中有 1 批可以用来培养 ES 细胞。

26. 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。无论什么时候记数时，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是有有效的。

### 移液器的选择

移液器的选择，一般注意从以下几个方面进行考虑：

#### 1. 产品性能，即移液器的准确性和重复性

对于绝大多数用户而言，购买前检测产品性能既有难度又无必要。因此，主要还是依据制造厂商提供的技术数据。但在这里还是要说明两点：

其一，不要轻易相信卖家的口头承诺，一定要查阅制造商提供的书面材料；

其二，在全球移液器市场上影响较大的品牌，如 RAININ, EPPENDORF 和 GILSON 等，其提供的技术数据可信度更高。

#### 2. 产品的可靠耐用

这一方面，主要取决于移液器所用的材料。对于外壳，应当有较高的耐冲击性、耐腐蚀性和较低的导热性（如 PVDF 材质）；对于活塞，目前市场上主要有不锈钢、陶瓷和塑料三种材质。不锈钢机械性能好、寿命长，只是不太适用于强酸强碱的移液；陶瓷则有很高的耐腐蚀性，但机械性能较差。当然，优质的材料往往意味着更高的价格，所以需要综合考虑购买价格和寿命的因素。

#### 3. 产品的人体工程学设计

主要可以考虑以下几点：

第一，完成一个移液循环拇指的移动距离短，意味着舒适度更高；

第二，比较相同量程的移液器完成一次排液（一定要按到底）所需的拇指用力，这是影响舒适性的关键，用力越少意味着长期使用造成手指损伤的风险越小；

第三，装卸吸头，同样是越省力越好；

第四，移液器的重量适中，过重会增加手的负担，但过轻也往往意味着材质可能差强人意；

第五，其它的辅助设计，如壳体的磨砂设计以及指钩设计，有助于进一步提高舒适性。

我们不得不说，RAININ 在人体工程学方面，是全球移液器市场的领导者，在以上几点都有完美的表现。

## 细胞培养操作规程

### 一 清洗与消毒

#### 1. 玻璃器皿的清洗

清水浸泡——洗衣粉刷洗——自来水冲洗——晾干，浸酸过夜——自来水冲洗 10 次以上——蒸馏水洗 2-3 次——烘干，包装——灭菌，贮存备用。

#### 2. 培养板的清洗

用后立即浸入水中——洗衣粉清洗——自来水冲洗——晾干，浸酸（强酸）过夜——自来水冲洗 10 次以上——蒸馏水洗 2-3 次——烘干，浸入 70%乙醇（盖盖以防乙醇挥发。临用前取出，在空气中干燥，置干净盒内备用。

\*注意不宜用毛刷刷洗，如残留有附着物，可用脱脂棉蘸水拭掉，流水冲洗干净。

### 3. 载玻片的洗涤

#### 新玻片

自来水冲洗——晾干，洗液中浸泡数小时——流水冲洗数小时——蒸馏水冲洗数遍——浸入 70%乙醇（盖盖以防乙醇挥发）。临用前取出，在空气中干燥，置盒内备用。

#### 旧玻片

肥皂水煮沸——温肥皂水洗——流水冲洗——晾干，洗液中浸泡数小时——流水冲洗——蒸馏水冲洗数遍——浸入 70%乙醇（盖盖以防乙醇挥发）。临用前取出，在空气中干燥，置盒内备用。

\* 注意不要彼此紧贴在一起

### 4. 胶塞的清洗

自来水浸泡——2% NaOH 煮沸 10~20 分钟——自来水冲洗——1%稀 HCl 浸泡 30 分钟——自来水冲洗——蒸馏水冲洗 2~3 次——晾干，备用。

## 灭 菌

#### [原理]

使用电热手提式压力蒸汽灭菌器，利用在密闭容器内加热，水就能生成压力蒸汽，蒸汽的温度随着压力的增高而上升，具有良好的穿透性，能使容器内的物品迅速潮润和加热的原理，使微生物迅速被杀灭，最终达到灭菌的效果。

#### [方法]

1. 使用前，先检查主体内水位是否超过电热管。
2. 在加热开始时，放气阀垂直，使空气随加热由桶内逸出。待有较急的蒸汽喷出时，即将放气阀拨回水平位置。
3. 瓶皿 121-126℃ 15min  
器械 121-126℃ 10min  
橡胶 121℃ 15min  
溶液 121-126℃ 20-40min
4. 当压力到达所需的范围时，开始计算时间。124-126℃ 灭菌时，安全阀能使之维持恒压；低于 124℃ 时，则应在蒸汽压力到达所需范围时，适当调节开关使之维持恒压。
5. 灭菌完，要迅速使之干燥者，将灭菌器内的蒸汽通过放气阀迅速排出。等压力为 0 时，再稍等 1-2 分钟，然后将盖打开，继续加热 10-15 分钟，使物品上残留的水蒸汽得到蒸发，随后关掉；灭菌液体时，应将液体灌装在玻璃瓶中，以不超过 3/4 体积为好，瓶口用棉花纱布塞好，并用绳子扎在瓶颈上，

使瓶内的空气能自然泄出，而又不致使瓶塞落入瓶内。灭菌完，先关电源，等压力为 0 时，再稍等几分钟，打开放气阀，排出余气后，才能将盖开启。

**[注意]**

1. 在加热液体时，切勿使用未打孔的橡胶或软木塞。
2. 液体灭菌终了时，切勿立即释放蒸汽，否则，由于液体的温度未能迅速下降，而压力蒸汽突然释放，会使液体剧烈沸腾，造成溢出或容器爆裂等危险事故。
3. 经常清洗主体，以保证电热管的正常工作。

### 溶液配制

#### 1. 洗液的配制

重铬酸钾先溶于水中，然后，将浓硫酸缓慢加入。

[强液] 重铬酸钾 63 g

浓硫酸 1000 ml

蒸馏水 200 ml

#### 2. 泡烧结玻璃滤器

$\text{NaNO}_3$  10 g

水 470 ml

浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  28.6 ml

#### 3. 培养液的配制

1. 把干粉加入 15-30℃（室温）三蒸水中，缓慢搅拌令之溶解，并将袋中微量粉末冲下。
2. 加  $\text{NaHCO}_3$  2.0g / L 1640 培养液 或 3.7g / L DMEM 培养液。稀释至 1 L。
3. 用 1N HCl 或 1N NaOH 将 pH 调低于正常 pH<sup>\*</sup> 0.2-0.3。（在正常情况下，培养液 pH 介于 7.2-7.4 间，呈桃红色。）
4. 立即过滤消毒。

**\* 通常过滤后 pH 升高 0.1-0.3**

#### 4. 消化液的配制

0.25%胰蛋白酶



1. 将 pH 7.2 的 PBS 液高压消毒灭菌。
2. 称取胰蛋白酶粉末 0.25g, 先用少许消毒的盐溶液调成糊状, 然后再补足盐溶液, 搅拌混匀, 置室温 4 小时或冰箱内过夜, 并不时搅拌振荡。

3. 过滤灭菌, 分装入瓶,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

#### 5. BSS 的配制

PBS (克/升)

1. 准确称量试剂。(含有水份的水化物, 与不含水份者的称量不同, 应加以换算。)

KCl 0.2

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2

NaCl 8.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.56

2. 依次溶解在 750 ml 水中, 待前一种试剂完全溶解后, 再溶解下一种成分。
3. 补足水分。
4. 分装瓶中, 高压灭菌 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

#### 6. Hank's 液

KCl 0.4g

NaCl 8.0g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g

$\text{NaHCO}_3$  0.35g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06g

D-葡萄糖 1.0g

酚红 0.01g

$\text{CaCl}_2$  0.14g

1. 以上成分依次溶解于三蒸水中, 并不时搅动 (注意应待前一种试剂完全溶解后再溶解下一种成分)。
2. 将配好的溶液移入容量瓶中, 补足水至刻度, 充分均匀。

3. 分装瓶中，高压蒸气灭菌，4℃保存。

## 7. D-Hank's 液

KCl 0.4g

NaCl 8.0g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06g

NaHCO<sub>3</sub> 0.35g

NaHPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.06g

酚红 0.01g

1. 以上成分依次溶解于三蒸水中，并不时搅动（注意应待前一种试剂完全溶解后再溶解下一种成分）。
2. 将配好的溶液移入容量瓶中，补足水至刻度，充分均匀。
3. 分装瓶中，高压蒸气灭菌，4℃保存。

## 细胞培养技术

### 1. 细胞计数法

1. 悬液制备：取待测细胞，向培养瓶内加 1ml 0.25%胰蛋白酶液，37℃温箱中消化，至细胞接近脱离瓶壁前吸出消化液，加新的培养液 5.0ml，轻轻吹打制备成细胞悬液。
2. 染色：取吸管 1 支，伸入培养瓶中，轻轻反复吹打细胞悬液使细胞重悬均匀后，立即吸细胞悬液少许，向离心管中滴入 9 滴，再滴入 0.4%的台盘蓝染料 1 滴，混匀，置 2-3min。
3. 镜检：把计数板平放在显微镜台上，从边缘滴 1-2 滴已染色的细胞悬液。镜下观察可见细胞分散各处，健康细胞胞体完整，透明不着色，凡着色细胞均为不健康者。
4. 计数：细胞数/ml 悬液 = (4 大格细胞总数/4) \* 10<sup>4</sup> \* 毫升数
5. 接种：一般接种量在 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>细胞/ml 范围。00

### 2. 细胞传代

- a. 将瓶中的培养液倒出，加入约 2ml 的消化液，平放 3-5 分钟，镜检，细胞变圆时将消化液倒去。加入一定量的培养液，用吸管将瓶壁上的细胞吹打下来，尽量吹散。
- b. 培养中的细胞分瓶，并加入培养液 8-10ml，置培养箱中培养。

c. 悬浮细胞传代时，只需吸出少量细胞转入新瓶，并补足营养液即可。

### 3. 冻存

a. 将瓶中的培养液倒出，加入约 2ml 的消化液，平放 3-5 分钟，镜检，细胞变圆时将消化液倒去。

b. 加入一定量的冻存液（约为 20 万细胞/ml 冻存液），用吸管将瓶壁上的细胞吹打下来，尽量吹散。

## 细胞传代培养

### 一、原理

细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就必须进行传代（再培养）。

传代培养也是一种将细胞种保存下去的方法。同时也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。悬浮型细胞直接分瓶就可以，而贴壁细胞需经消化后才能分瓶。

### 二、材料和试剂

1、细胞：贴壁细胞株

2、试剂：0.25%胰酶、1640 培养基（含 10%小牛血清）

3、仪器和器材：倒置显微镜，培养箱、培养瓶、吸管、废液缸等

### 三、操作步骤

1、将长满细胞的培养瓶中原来的培养液弃去。

2、加入 0.5—1ml 0.25%胰酶溶液，使瓶底细胞都浸入溶液中。

3、瓶口塞好橡皮塞，放在倒置镜下观察细胞。随着时间的推移，原贴壁的细胞逐渐趋于圆形，在还未漂起时将胰酶弃去，加入 10ml 培养液终止消化。

观察消化也可以用肉眼，当见到瓶底发白并出现细针孔空隙时终止消化。一般室温消化时间约为 1—3 分钟。

4、用吸管将贴壁的细胞吹打成悬液，分到另外两到三瓶中，实践培养液塞好橡皮塞，置 37℃ 下继续培养。第二天观察贴壁生长情况。

附：消化液配制方法：

称取 0.25 克胰酶蛋白酶（活力为 1：250），加入 100ml 无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的 Hank' s 液溶解，滤器过滤除菌，4℃ 保存，用前可在 37℃ 下回温。

胰酶溶液中也加入 EDTA，使最终浓度达 0.02%。