



齐齐哈尔医学院附属第三医院
The Third Affiliated Hospital Of Qiqihar Medical University
齐齐哈尔市肿瘤医院
Qiqihar Cancer Hospital

细胞培养的操作流程

中心实验室
池涛

细胞培养

从机体内取出组织或细胞，在体外模拟体内的生理环境，在无菌、适当温度和一定营养条件下进行孵育培养，使之生存、生长，并维持其结构和功能的方法。



一、细胞培养的基本条件

实验室条件：

二氧化碳培养箱、

倒置显微镜、

超净工作台、

离心机、

水浴锅、

普通冰箱、

超纯水设备、

高压灭菌锅、

低温冰箱、

液氮罐



一、细胞培养的基本条件

培养用品：

培养瓶

培养板

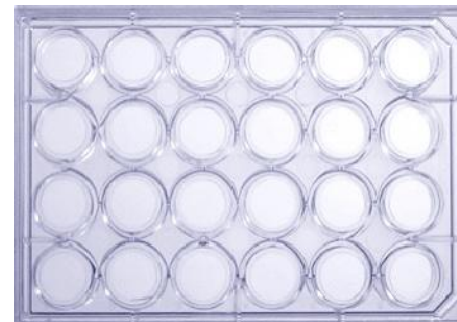
培养皿

离心管

枪头

冻存管

试剂瓶等。



一、细胞培养的基本条件

细胞培养用试剂:

基础培养基

α -MEM、DMEM、DMEM/F12、RPMI1640

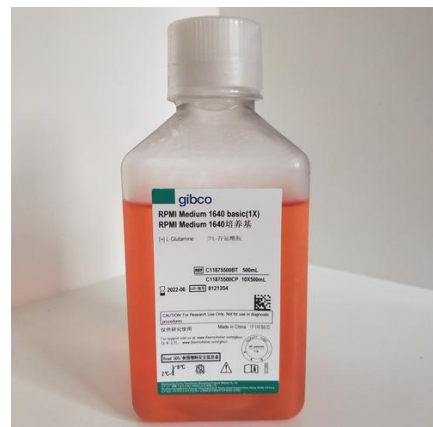
血清

胎牛血清、新生牛血清、小牛血清

青链双抗

胰蛋白酶 (0.125-0.25%)

PBS



二、细胞培养的操作步骤

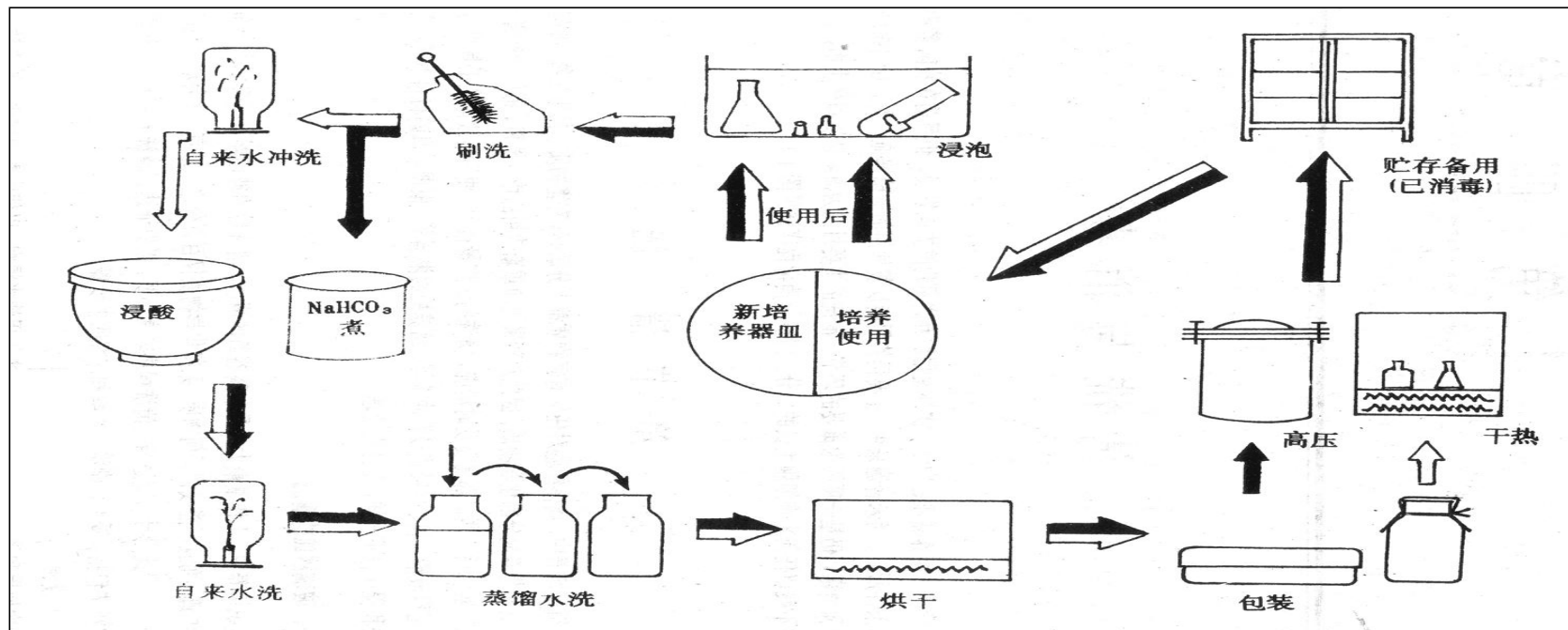
实验前准备

清洗:

玻璃、塑料、橡胶、金属类等

消毒:

无菌室、培养用液、培养器皿（玻璃、塑料、橡胶、金属）等

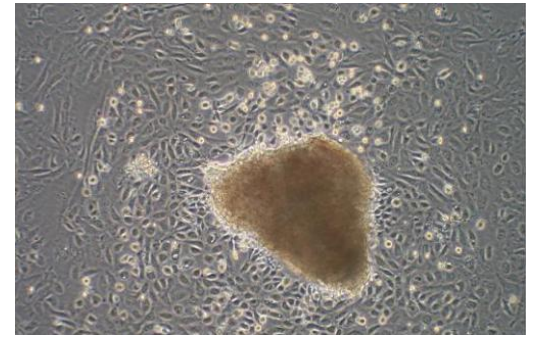


白箭头：玻璃制品 黑箭头：橡胶制品

二、细胞培养的操作步骤

(一) 原代培养

从机体上取下细胞、组织或器官，让它们在体外维持与生长。（实际中，传10代以内的细胞用作原代培养细胞）特点：表现来源组织或细胞特征。



组织块培养法

从机体上取下组织，使其在体外维持与生长，细胞从组织块边缘向外长出，铺满培养瓶（皿），即可进行传代。

二、细胞培养的操作步骤

1)动物处死：将出生2~3d乳鼠，用脱颈方法处死。用酒精棉球擦拭解剖部位。

2)取材及剪切：在无菌条件下将组织取出，置于无菌培养皿中，剪去多余的组织（脂肪等），用PBS液洗涤1-2次；放入另一培养皿中，将组织剪成 1mm^3 大小的块。

3) 消化及分散组织块：将上述清洗过的组织放入无菌试管内，加入5~6倍量的0.25%胰蛋白酶液（pH7.4 ~ 7.6），置 37°C 水浴中消化20 ~ 40min，每隔10min摇动一次，直到组织块变得疏松，粘稠，且颜色略变为白色为止。取出试管，加入5ml培养液，用吸管反复吹打组织块，使其分散成细胞悬液，将细胞悬液用两层灭菌纱布过滤至另一烧杯中。

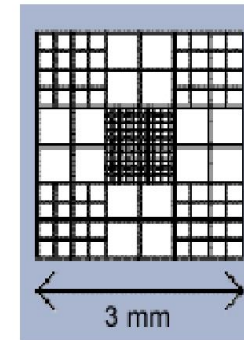


二、细胞培养的操作步骤

4)计数与稀释:从过滤的细胞悬液中取出适量滴于血细胞计数板上,按白细胞计数法进行计数;计数后用培养液稀释,稀释后的浓度一般以每毫升含 $3 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞为宜。



5)分装与培养:将稀释好的细胞悬液分装于细胞培养瓶 or 培养皿中,盖好,做好标记,置于 37°C CO_2 培养箱中培养。



6)观察:逐日检查培养物是否污染,观察细胞生长情况。待细胞已基本长成致密单层时,即可进行传代培养。

二、细胞培养的操作步骤



二、细胞培养的操作步骤

视频演示

细胞复苏及传代



二、细胞培养的操作步骤

视频演示

细胞冻存



一



二



三

结语

- 细胞培养是一件繁琐、细致的实验！需要实验者具有缜密的思维及足够的耐心！
- 谢谢聆听，共同学习！