

细胞培养

主讲人：罗素慧

电话：13920830786

邮箱：suhui12345@126.com

培训的目的

- ❖ 让实验者对细胞培养有初步的认识，了解细胞室的环境和管理制度，以便顺利开展实验。
- ❖ 合理配置实验资源，提高实验室的利用效率，增进彼此了解，相互沟通交流。



主要内容

- ❖ 细胞培养
- ❖ 细胞培养室
- ❖ 仪器设备使用及注意事项
- ❖ 常见问题及解决方法



细胞培养

细胞培养是指离散细胞的培养，这些细胞是经酶学的、机械的或化学的方法从来源组织、原代培养物、细胞系或细胞株中获得的。



细胞培养的分类

原代培养：

是指细胞分离之后至第一次传代之前的细胞培养阶段。

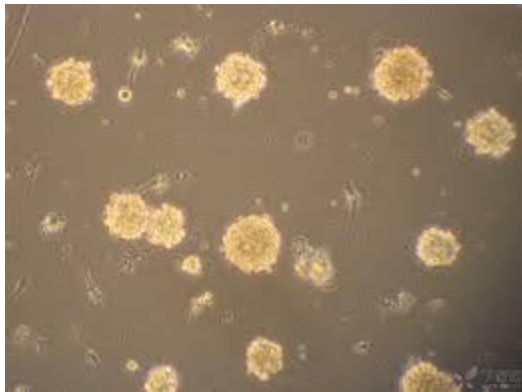
但通常把第一代到第十代的细胞统称为原代培养。

传代培养：

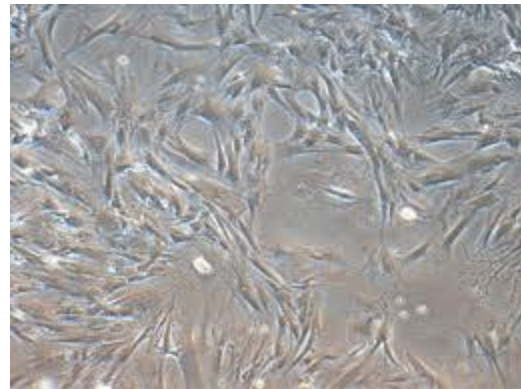
当原代培养成功以后，随着培养时间的延长和细胞不断分裂，**接触性抑制或营养物质不足和代谢物积累**。需要将培养物分割成小的部分，重新接种到另外的培养器皿内，再进行培养。



传代和细胞系



悬浮培养



贴壁培养



技术方法

细胞分离

组织块剪切，消化法或机械分离法使组织进一步分散，过细胞筛，获得细胞悬液

原代培养

细胞悬液计数后，加入培养液，按一定浓度接种到培养瓶，放入孵箱中进行培养

传代培养

将原代培养细胞用胰酶和EDTA消化处理后，收集洗涤，再分装至含有新鲜培养液的培养瓶中继续培养



细胞冻存

- 贴壁细胞用胰蛋白酶消化后，以 1×10^6 个细胞/ml的浓度用培养基重悬
- 加入10%V/V的细胞保护剂DMSO或甘油
- 将细胞加入到预先标记好的冻存管中
- 将冻存管置于隔热的泡沫管中，于 -70°C 至少存放4h
- 转移至液氮罐中
- **注意：冻存时间，细胞经5代倍增生长，获得足够量的细胞再进行冻存。缓慢冷冻，梯度降温。**



细胞复苏

- 从液氮中取出冻存管，转移至37 °C水中
- 细胞复苏后，用70%酒精擦拭冻存管，将细胞移至培养瓶中
- 用培养基缓慢稀释，放入培养箱
- 培养24h后，弃去旧培养基，加入新培养基
- **注意：从液氮中取出冻存管，温水中迅速复苏；复苏时，如果冻存管保存在液相中，应避免爆破的危险。**



细胞培养室环境



准备区 (308)



缓冲区 (308)



1号细胞室 (308)



2号细胞室 (308)



3号细胞室 (201)



预约申请和培训考核

预约申请：

提前一个星期进行预约，并填写细胞培养室申请表，导师签字，中心主任签字。

培训考核：

每个学生进入细胞室之前都要经过培训，并通过考核后，才可以进入细胞培养室进行实验。



细胞室实验流程

培训

参加细胞培养培训（每年9月份），完成考核试题



开卡

填写申请表，导师和中心主任签字



申请实验所需用品

找主管老师申请生物安全柜、培养箱，冰箱、储物柜，拖鞋、鞋柜



准备实验耗材

准备细胞室专用白大衣、口罩、手套，准备细胞培养实验耗材



开始实验

实验过程中注意保持实验室卫生，根据值日安排做好值日



紫外灭菌



更换拖鞋



风淋



更换白大衣



实验



紫外灭菌



细胞培养室使用规范

1、准备工作

- a. 进入培养间之前应洗净双手，准备间**更换专用拖鞋并登记**
- b. 风淋5s（**不能随意关闭**）
- c. 进入缓冲间后更换细胞室专用白大衣，戴无粉尘无菌手套、口罩；
- d. 进入超净室后将所带物品放入传递窗中紫外灯照射灭菌；
- e. 预热培养基、PBS、胰酶等溶液；



2. 实验过程

- a. 关闭生物安全柜内紫外灯，打开通风开关；
- b. 等待大约5min后，双臂缓慢进入前窗口，再对物品进行处理；
- c. 擦拭工作面，所有操作应在离前窗10cm以外的工作区进行；
- d. 小心取用无菌实验物品，勿碰触吸管尖头部或是容器瓶口，亦不要在打开容器的正上方操作实验；打开的容器盖应口向下，放在干净的区域。



无菌技术

- 细胞培养的成功很大程度上取决于无菌技术。
- **无菌技术**的作用是在环境微生物与无菌的细胞培养物之间形成一道屏障，它通过一套操作流程来降低培养物被污染的可能。
- 无菌技术的组成要素包括：**无菌环境、无菌试剂和培养基以及灭菌操作**



无菌环境

❖ 安静的工作区域

禁止喧闹，说笑

❖ 工作面

工作面保持整洁，只放置所需物品；不能用作储存区。

❖ 个人卫生

操作前后应洗手，穿戴个人防护设备

❖ 试剂和培养基

商品化试剂或采用适当的灭菌方法（如：高压、无菌过滤）

❖ 培养物

细胞系或细胞株没有发生生物污染



无菌操作

- **擦拭**：工作前、后和过程中，特别是有溢出物后，要擦拭工作面。各种瓶子，特别是从冰箱取来的瓶子，进入生物安全柜前要用酒精擦拭
- **加盖**：购买密封性好的瓶子，暂时不用的液体，在盖子与瓶颈结合部用封口膜封住
- **试剂瓶和培养瓶的操作**

培养瓶平放，试剂瓶可直立放置，但不能让手或其他物品在开口的容器或无菌吸管上方往来
- **移液**：购买一次性无菌塑料吸管和枪头，避免用嘴吹吸管
- **倒出液体**：倾倒的主要危害是产生了连接试剂瓶内外的液体“桥”，这样可能会使污染物进入试剂瓶。



3. 实验结束

- a. 将生物安全柜继续运行5 min来完成“净化”过程；
- b. 将柜内物品移出前，应使用有效的消毒剂擦拭；
- c. 将废液缸内废液及垃圾倒入细胞间外的医疗垃圾桶内；
- d. 用75%酒精对生物安全柜的台面进行擦拭；
- e. 等待5min后，关闭前窗，关灯，关风机；
- f. 物品收拾摆放整齐、及时将废物清理干净并拿出细胞室。



注意

1. 进入细胞室后必须穿白大衣，戴口罩，手套，长头发的女生要将头发绑起来。
2. 每次限操作一种细胞，并且一种细胞对应一瓶培养基，避免细胞交叉污染。
3. 每间细胞间禁止同时进入4个人操作，不可在细胞间大声喧哗谈笑和打闹。
4. 如果发生污染请报告管理员，以便及时处理。
5. 非本实验室的人员未经允许不得进入细胞间。



细胞室值日规定

1. 每位需要在细胞室培养细胞的实验人员必须参加值日，由管理员统一安排；
2. 每周彻底打扫一次细胞间（时间为每周五下午4:30-5:30），包括：实验桌面、地板、缓冲间等。
3. 用消毒水擦拭全部仪器和物品表面，包括门、墙壁、桌面、生物安全柜外表面、培养箱外表面；
4. 用消毒水清洗地板，清洗拖鞋；
5. 观察细胞培养箱的温度和CO₂浓度是否正常，需补充CO₂时及时报告管理员。
6. 更换细胞培养箱中水槽的水，加入1000-1500ml灭菌后的蒸馏水；
7. 清洗水浴锅，更换水浴锅中的水，加入蒸馏水；



细胞培养主要用品

细胞室

1. 净化级工作室、风淋室、传递窗、生物安全柜、紫外灯
2. CO₂培养箱、倒置显微镜、离心机、水浴锅
3. 液氮罐、超低温冰箱（管理老师分配）
4. 移液器（中心借用）

细胞培养所需其它仪器：

灭菌锅（308）、送风干燥箱（317）、细胞计数仪（310）、
纯水仪（314）

消耗性物品：

酸液、吸管、培养皿、无菌容器、消毒剂



❖ 空调机组和紫外

每天进入细胞间人员需先打开细胞间和生物安全柜的紫外灯20-30分钟灭菌，然后进行操作。空调机组房间**非管理人员严禁进入**，如有问题需与实验室管理人员联系。

❖ 生物安全柜 注意：无需使用酒精灯

- a. 使用前紫外灯照射20分钟，之后通风5分钟
- b. 实验前后均要用75%的酒精清洁台面
- c. 实验结束后，关闭电源开关，下一人使用前仍需照射紫外灯20分钟。
- d. 柜内实验物品**分区域**摆放，禁止放置过多物品以免影响紫外线照射效果。



生物安全柜

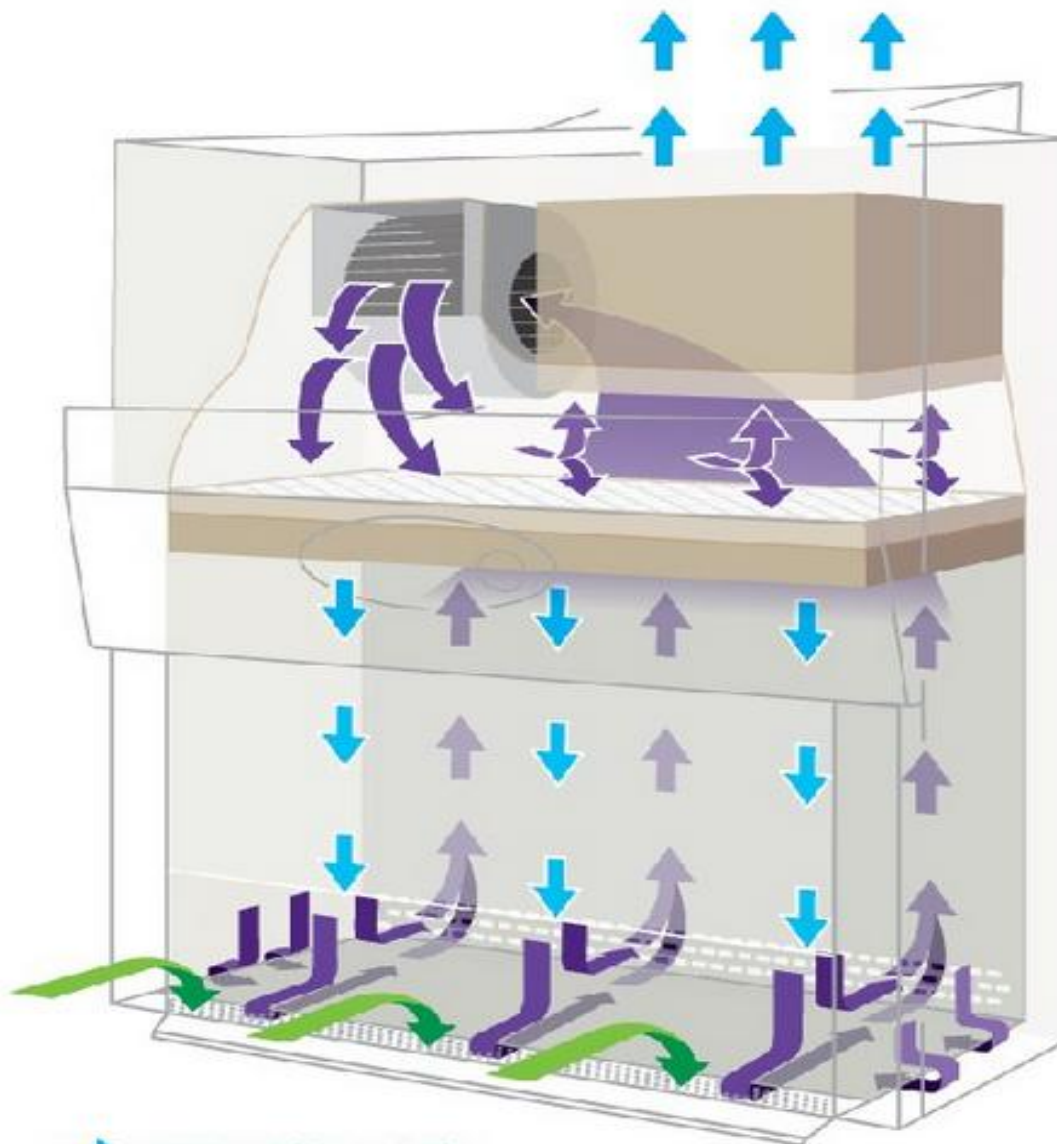




Class II, Type A2

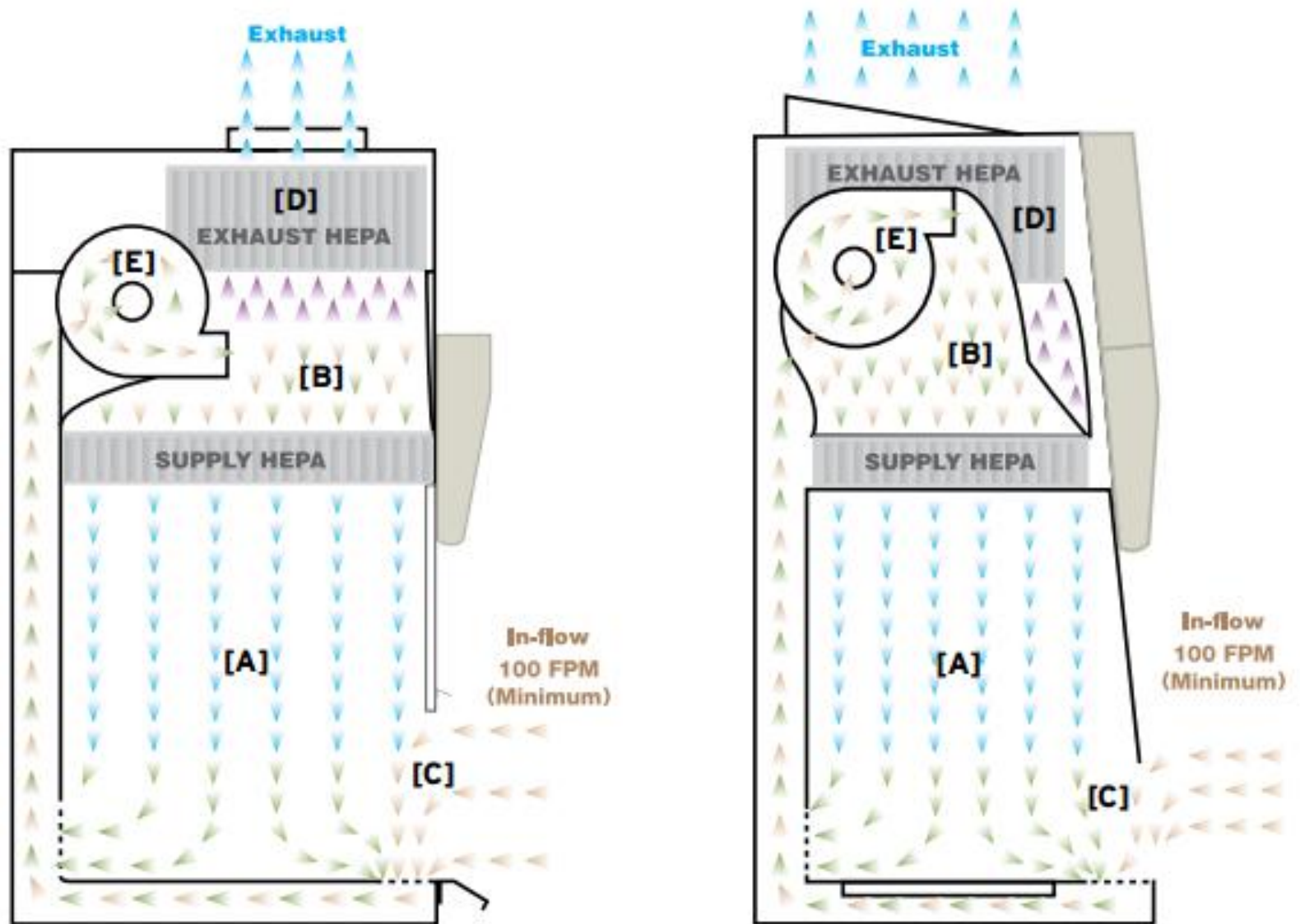
Air In-flow 70% Recirculated vs. 30% Exhausted

垂直式层流



- ➡ HEPA Filtered Air
- ➡ Contaminated Worksurface Air
- ➡ Contaminated Room Air





Class II Type A2 Biological Safety Cabinet
Airflow Schematics

▶ **HEPA FILTERED AIR**
▶ **ROOM AIR**

▶ **CONTAMINATED WORK SURFACE AIR**
▶ **CONTAMINATED EXHAUST AIR**



❖ 二氧化碳培养箱

- a. 打开前先用75%酒精消毒双手
- b. 打开时应注意不要说话，尽量屏住呼吸，以免污染
- c. 箱体底部的蒸馏水保持饱和湿度，每周一换。
- d. 放培养箱的细胞瓶请做好个人标记，按规定相对固定的位置格放置培养，做好及时观察和处理，防止细胞培养过久造成染菌、防止他人误拿。
- e. CO₂感应器不能触碰，不能溅上液体！
- f. 如发现二氧化碳减压阀显示CO₂即将用完，需及时报告管理员



清洁：

1. 经常用软布沾上肥皂水来擦拭培养箱外表面。
2. 将软布上的皂液漂洗干净后，再次擦拭培养箱外表面。

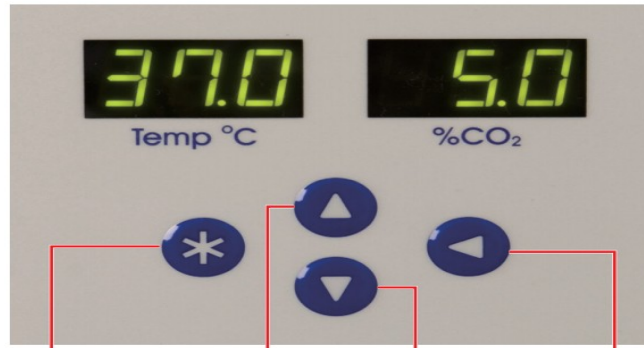
消毒：

醇溶液消毒（70%异丙醇和30%蒸馏水配成消毒液）和高温消毒

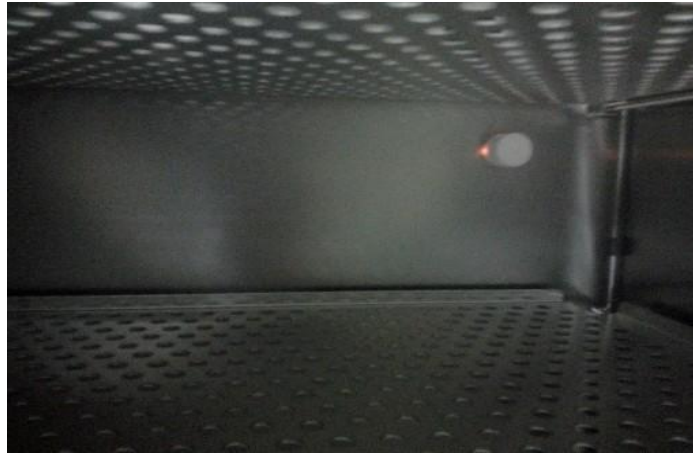
注意：

1. 进行高温消毒前培养箱必须经过充分清洁并已**完全干燥**，必须**取出CO2感应器的黑色保护罩**。
2. 在高温消毒过程中，切勿打开内外箱门，否则可能造成严重烫伤，另培养箱的外表面也将达到很高温度，严禁以手触摸。





编程键 数值上调 / 选项上移 确认键
数值下调 / 选项下移



❖ 倒置显微镜

- a. 在使用倒置显微镜进行观察时，一定要小心轻放，防止培养液溅到物镜或载物台上，如有发生，先将光源旋到最小，关闭开关，用擦镜纸擦净。
- b. 使用后将**光源旋到最小**，关闭电源，将**防尘布盖好**。
- c. 填写使用记录。



❖ 水浴锅

用于预热培养基、PBS、胰酶等溶液，**定期（每周五）更换水与清洁**，从水浴锅拿出的瓶子应用75%酒精擦拭后放入生物安全柜。**一定要注意水位，不能干烧！**

❖ 离心机

离心前**务必配平**（用天平进行），小心避免离心管在离心过程中损坏卡住角转子，溅落的液体及时清理，用完关闭电源，填写使用记录。



❖ 细胞间冰箱

细胞室冰箱仅用于储存细胞培养相关物品，请标注姓名，按规定位置存放，并定期清理。毕业前将自己的物品清理或转接，否则由中心自行处理。

❖ 液氮

液氮罐严禁储存细胞外其他生物样品，使用时带上防护手套，避免烫伤，快拿快放，每次使用后都要按一下“Reset”，填写使用记录。



❖ 移液器和电动助吸器

生物安全柜配有5ml、1ml、200 μ l、10 μ l手动移液器及电动移液器各一把，用前可用75%酒精擦拭，严禁倒吸液体进入移液器内。在相应量程内使用，用完后调回。



❖ 灭菌锅

在使用前务必检查水位，调好时间，压力平稳并开始倒计时后，方可离开。及时取出高压物品。如灭菌液体时，不可提前放气。

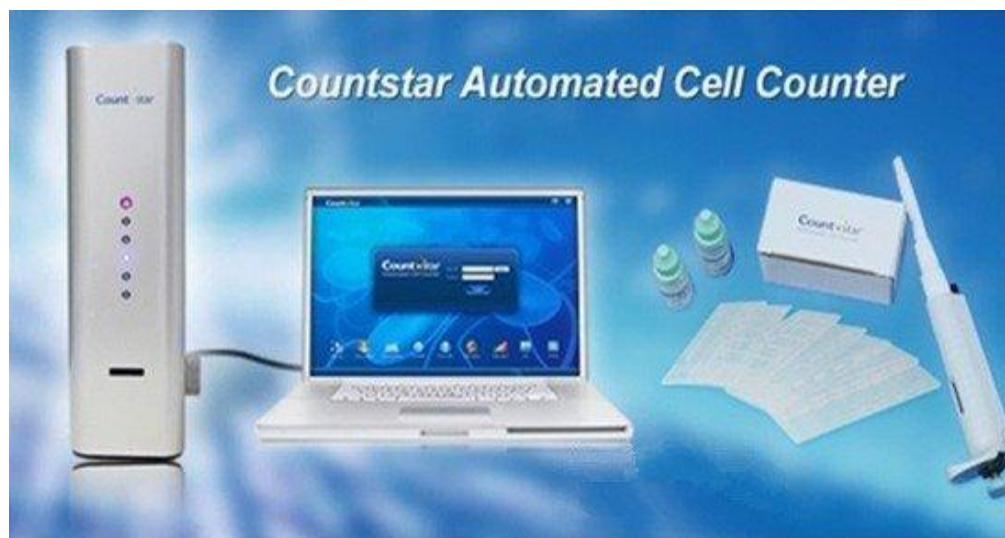
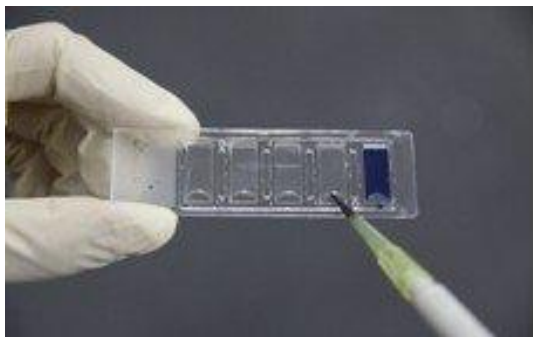
❖ 送风干燥箱

高压物品至少60 °C 烘4h，不要随意调动烤箱的设定值，及时清理自己的物品，如有需使用更高温度的，与管理老师联系



❖ 细胞计数仪

- ✓ 测量浓度范围： 1×10^4 — 3×10^7 /ml
- ✓ 测量直径范围：5-180 μ m
- ✓ 样品体积：20 μ l
- ✓ 测量时间：20秒
- ✓ 分析参数：总细胞浓度，活细胞浓度，死细胞浓度，活率，平均细胞直径，平均细胞圆度，结团率



❖ 纯水仪

- a. 开机：先开水再开电，关机：先关电再关水
- b. 水箱内水位低于16%就不能再取水，待机器产满后再次取水
- c. 红灯亮代表出现警报，及时联系管理老师
- d. 黄灯亮表示需要更换耗材
- e. 水流速较快，注意擦看，以免漏出

❖ 酸液

泡酸物品需先用洗涤剂洗净晾干，
然后泡酸，泡酸时必须穿好实验服，
带耐酸手套和防护眼罩。不可穿凉鞋



➤ 污染

对于新手来说，进行组织培养时维持无菌状态是最困难的挑战，然而，在一些情况下，甚至很有经验的老手也会遇到污染的问题。

➤ 污染的途径

无菌技术

材料和试剂

仪器设备和装置

生物材料的传入



➤ 常见的生物污染

细菌、霉菌、酵母、病毒、支原体以及其他细胞系的交叉污染。

细菌：PH值降低、云雾状，镜下可见移动的颗粒

霉菌：PH值增高、浑浊、呈集落或者菌丝状

酵母：PH值变化较小、浑浊、呈卵圆形，可芽生出较小的颗粒

病毒：对宿主有非常严格的要求，所以在培养**人或灵长类动物**

细胞时要特别注意

支原体：细胞增殖速度降低、饱和密度下降以及悬浮培养物凝集

➤ 解决办法：无菌操作



➤ 常规安全：

操作者：穿戴好防护服，按规范操作

设备：检查安全可靠，注意电路安全

玻璃器皿和锐利物品：泡酸、高压、使用过程中、针头

化学毒性：毒性物质（粉状/雾状剂）DMSO（强溶剂）

气体：CO₂/O₂/N₂

液氮：冻伤、窒息和爆炸

灼烧：高压灭菌锅，烘箱

火：乙醇，醇类

放射性：

生物危害性：



谢谢各位同学的参与，祝实验顺利！

