

细胞复苏

一. 实验目的

对T24细胞株及不同耐药程度的T24-RC48进行复苏，转入细胞培养瓶中。

二. 材料与试剂

2.1 材料 枪头、15ml离心管均购自Axygen公司
吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

T25培养瓶购自Corning公司

人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)

低、中、高耐药细胞株 T24-RC48

2.2 试剂 DMSO 来自德国 WAK CHEMIE公司

McCoy's5A培养基来自上海源培生物科技股份有限公司

胎牛血清(FBS, Gibco公司)

三. 实验仪器

超净台：苏州净化设备厂

台式常温低速离心机：Eppendorf公司

HX-20 恒温金属浴(常温)：上海沪析

四. 实验步骤

- 4.1 用酒精棉擦拭超净工作台台面，整理实验用具，将所需试剂耗材放入超净台中，开启紫外灯，紫外线消毒30分钟。
- 4.2 将待复苏细胞放入恒温金属浴中（提前打开预热，待示数显示37℃后使用），一分钟内迅速解冻，待细胞冻存管中冰块融化即可。
- 4.3 向提前准备好15ml离心管中加入5ml培养基待用。
- 4.4 将细胞冻存管转移至超净工作台中。用移液枪吸取细胞悬液，缓慢滴加到上一步骤中准备好的离心管中。800rpm，离心5min。
- 4.5 离心后弃掉上清液，加入新鲜培养基重悬细胞。
- 4.6 将细胞接种至新的透气无菌T25细胞培养瓶中，显微镜下观察细胞状态与密度。
- 4.7 水平放置于37℃, 5% CO₂的培养箱中进行培养。
- 4.8 第二天于倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

五. 实验操作照片



六、实验结果

24h后,T24细胞株及T24-RC48细胞株在培养瓶中成功复苏,呈上皮样,贴壁生长。其中,T24细胞株与中度耐药、高度耐药细胞株密度已达100%,低度耐药细胞株密度约为40%,培养基中漂浮的未贴壁细胞较少。

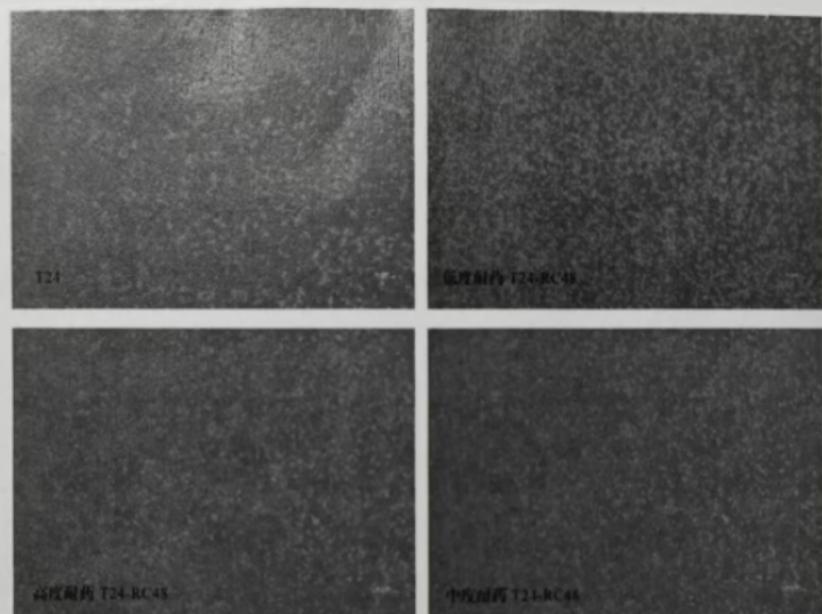


图2 刚复苏的细胞在倒置相差显微镜下的状态

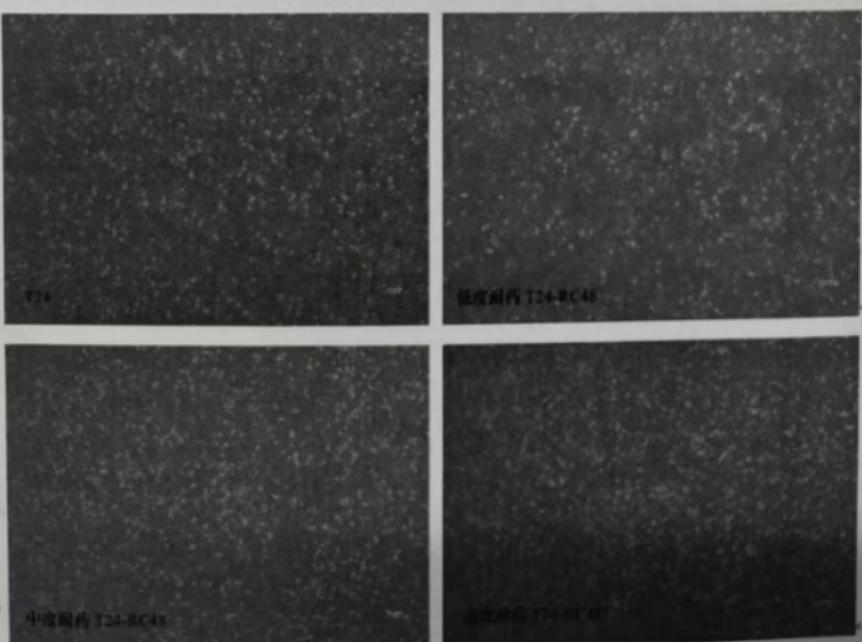


图3 复苏的细胞过夜后在倒置相差显微镜下的生长状态

七、结果分析

未贴壁的悬液细胞较少，贴壁率高，说明本次复苏操作比较成功。T24细胞株与中度耐药高度耐药细胞株密度高达100%，而低度耐药细胞株密度约为40%。原因是冻存不同的细胞所冻存的细胞量有差异。