

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 6 日 18:00 — 2025 年 3 月 6 日 20:00

---

## 细胞传代、换液

### 一、实验目的

- 1.1 对 T24 细胞株及中度耐药、高度耐药 T24-RC48 细胞株进行传代，以维持细胞的持续生长和营养供应。
- 1.2 对低度耐药 T24-RC48 细胞株进行换液，以去除代谢产物并补充新鲜培养基。

### 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

PBS、胰酶均购自美国 Gibco 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

### 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 酒精消毒双手，点燃酒精灯，镊子取刻度移液管，酒精灯外焰灼烧各试剂瓶盖、瓶口，打开 PBS，McCoy's5A 培养基，并将加了血清及双抗的细胞培养液并放到适当位置。
- 4.3 从 37℃ 恒温箱中取出内有 T24 及 T24-RC48 细胞株的细胞培养瓶，在显微镜下观察细

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 6 日 18:00 — 2025 年 3 月 6 日 20:00

胞培养情况：大量细胞贴壁生长。

**4.4** 将细胞培养瓶口在酒精灯火焰上灼烧一下，将里面的培养基倒入废液缸内。

**4.5** 用刻度移液管移取 PBS 约 4ml 加入培养瓶，平置培养瓶，前后缓慢摇晃培养瓶，冲洗去细胞碎片和残余培养基，清洗液倒入废液缸。重复该步骤两次。

**4.6** 用刻度移液管移取 5ml 完全培养基加入含低度耐药 T24-RC48 细胞株的培养瓶。

**4.7** 用新的刻度移液管吸取胰酶加入培养瓶（每瓶 1ml），放入 37℃ 恒温箱消化 2min，取出，显微镜下观察：细胞形态变小，皱缩，还未消化完。放入 37℃ 恒温箱继续消化 30s，取出观察：细胞呈流沙状，在显微镜下观察可见细胞间网状连接消失，圆球状细胞悬浮在培养液中，但没有大漂浮。

**4.8** 用刻度移液管向培养瓶内加入 2 倍胰酶体积（2ml）的完全全培养液，终止胰酶的消化，再用刻度移液管反复吹打瓶壁细胞，吹打约 30 次后，将培养液转移至 15ml 离心管中，做好标记，放入离心机中配平后离心（800rpm/min，5min）。

**4.9** 离心过程中，用新的移液管在三个细胞培养瓶中各加两管完全培养液（3ml/瓶）。

**4.10** 取出离心管，倒掉上清液，用刻度移液管往离心管中加入约 6ml 全培养液，吹打均匀之后，用刻度移液管将培养液均分至三个细胞培养瓶中，上下、左右各晃动两下使细胞均匀分布。

**4.11** 在细胞培养瓶上标记日期和细胞种类。

**4.12** 整理超净台，用酒精棉球擦拭。

## 五、实验操作照片：

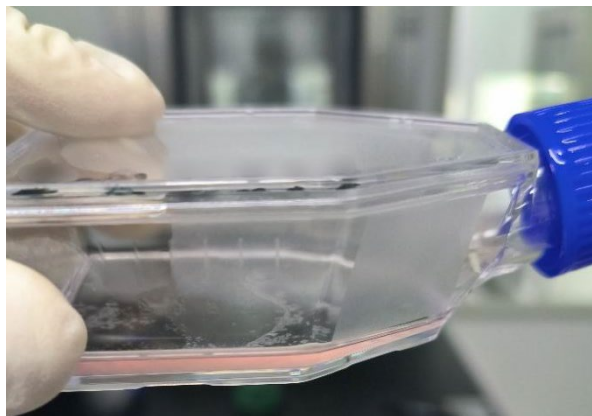


图 1 肉眼观察消化后细胞

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 6 日 18:00 — 2025 年 3 月 6 日 20:00

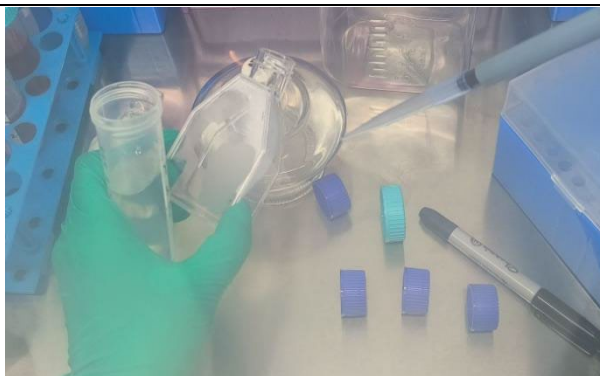


图 2 使用 PBS 洗去残余培养基

## 六、实验结果

6.1 T24 细胞株及中度耐药、高度耐药 T24-RC48 细胞株各获得三个传代细胞的培养瓶。第二天显微镜下观察：细胞均已贴壁，但形态略显扭曲，伴有轻微拉丝现象。

6.2 低度耐药 T24-RC48 细胞株换液后形态保持良好。

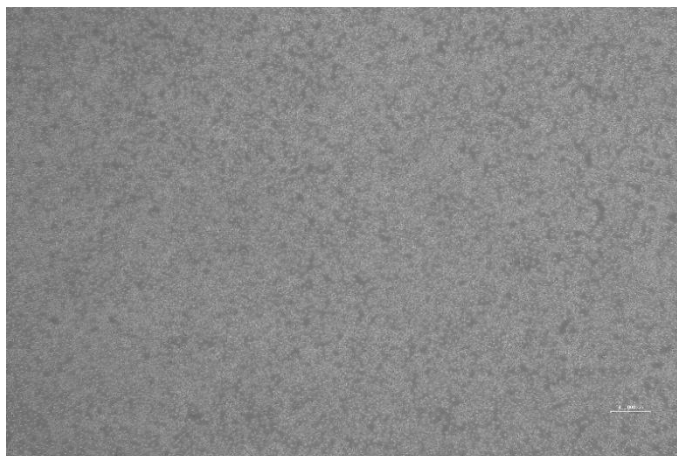


图 3 相差显微镜下消化后的细胞

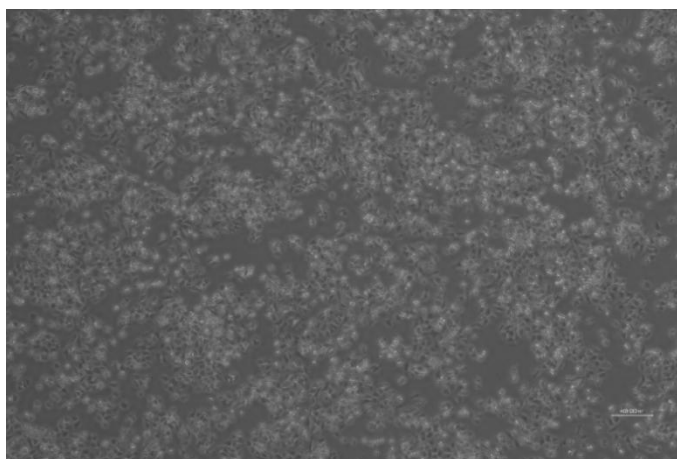


图 4 换液后低度耐药 T24-RC48 细胞株状态

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 6 日 18:00 — 2025 年 3 月 6 日 20:00

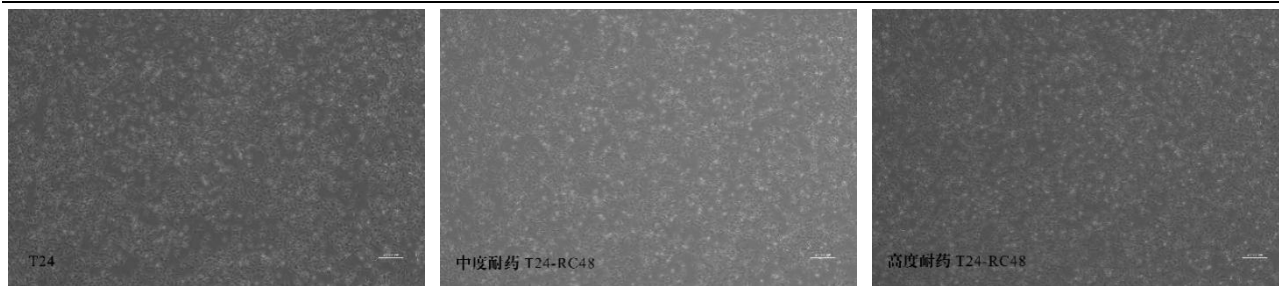


图 5 传代细胞过夜后在倒置相差显微镜下的生长状态

## 七、结果分析

T24 细胞株及中度耐药、高度耐药 T24-RC48 细胞株第二天形态略显扭曲，伴有轻微拉丝现象，而低度耐药 T24-RC48 细胞株换液后形态较好。原因可能是 T24 细胞株及中度耐药、高度耐药 T24-RC48 细胞株在复苏后第一天还没有稳定，却因为密度过高而被迫传代，导致状态不佳。而低度耐药 T24-RC48 细胞株获得了更久的稳定生长的时间，因而形态饱满，状态良好。