

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

移液枪：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Corning美国Gibco公司(笔误)

McCoy's 5A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's 5A 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°C恒温箱中取出内有T24及T24-RC48细胞株的细胞培养瓶，倒入废液缸内（笔误，）在显微镜下观察细胞培养情况：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, 褶皱, 还未消化完。放入37℃恒温箱继续消化30s, 取出观察: 细胞呈流动状, 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瓶中, 但没有大漂浮。

4.8 用刻度移液管向培养瓶中加入2倍胰酶体积(2ml)的完全培养液, 终止胰酶的消化, 再用刻度移液管反复吹打瓶壁细胞, 吹打30次后, 将培养液转移至15ml离心管中, 做好标记, 放入离心机后配平后离心(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分类。

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



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。

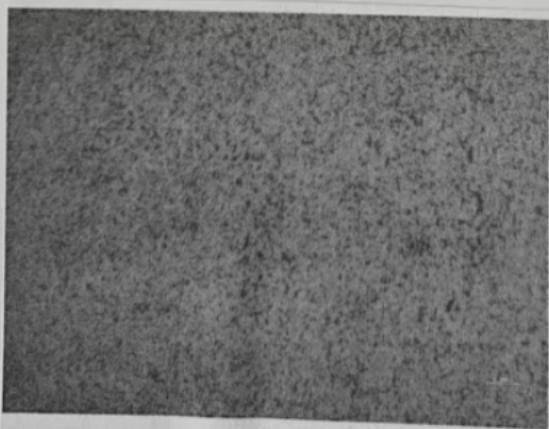


图 3 相差显微镜下消化后的细胞

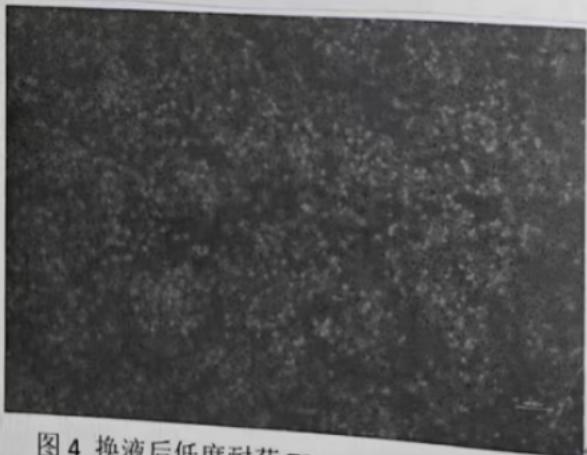


图 4 换液后低度耐药 T24-RC48 细胞株状态



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 细胞株在复苏第一天后还没有稳定，均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。