



## 原代细胞提取实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

#### 2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
70 $\mu$ m 筛网	碧云天	FSTR070

### 二、实验步骤

1、**实验动物处理与胚胎取材：**按照动物伦理批准的实验方案处置孕鼠或孕大鼠。处置完成后，将动物置于无菌操作区域，使用 70% 乙醇充分喷洒或擦拭体表进行消毒。



- 2、**无菌分离组织：**在超净工作台内，用无菌剪刀和镊子打开腹腔，取出组织，置于预冷无菌 PBS 中。并用无菌 PBS 反复漂洗，直至洗液较为清亮。
- 3、**组织剪碎处理：**将 1-2 个组织转移至无菌培养皿中，去除不需要的组织结构后，用无菌剪刀充分剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 左右的小组织块。随后加入适量无菌 PBS 轻轻漂洗，去除血液及杂质。
- 4、**酶消化：**将剪碎后的组织块转移至无菌 50 mL 离心管中，加入适量 0.25% 胰蛋白酶或其他适宜消化液，使组织块充分浸没。置于 37 °C 培养箱或水浴中消化 10-15 min，期间可每隔数分钟轻轻吹打或摇匀，以促进细胞释放。
- 5、**终止消化：**消化结束后，待较大组织块自然沉降，收集上层含细胞悬液的消化液，转移至新的无菌离心管中。加入含血清的完全培养基或胎牛血清终止胰蛋白酶消化。
- 6、**过滤细胞悬液：**将合并后的细胞悬液经 70 μm 细胞筛过滤，以去除未消化组织块和较大杂质，获得较均一的单细胞悬液。
- 7、**离心收集细胞：**将过滤后的细胞悬液于 300-500 ×g 离心 5 min，弃去上清，收集细胞沉淀。
- 8、**清洗细胞：**用无菌 PBS 或基础培养基重悬细胞沉淀，再次离心清洗 1-2 次，以去除残留消化酶、血液成分及组织碎片。
- 9、**重悬、计数与接种培养：**用相应的完全培养基重悬细胞，进行细胞计数和活率检测后，按实验需要接种于培养皿或培养板中，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞贴壁后更换新鲜培养基，以去除未贴壁细胞及残留杂质。

### 三、结果判读：

细胞贴壁情况原代细胞接种后，一般在数小时至 24 h 内开始贴壁。若细胞贴壁良好、形态逐渐伸展，说明组织消化、细胞收集及培养条件基本合适。

### 四、注意事项：

- 1、**严格无菌操作：**原代细胞对污染较敏感，整个取材、清洗、剪碎、消化、离心和接种过程均应在无菌条件下进行。所用剪刀、镊子、培养皿、离心管、PBS、消化液和培养基均需提前灭菌或确认无菌。
- 2、**组织剪碎应均匀：**组织块不宜过大，否则消化不充分；也不宜反复过度剪切，以免造成



细胞机械损伤。一般剪碎至约  $1\text{ mm}^3$  左右较为合适。

3、**控制消化时间和消化强度：**胰蛋白酶或胶原酶消化时间不宜过长。消化不足会导致细胞释放少，消化过度则会损伤细胞膜，降低细胞活率。应根据组织类型、组织量和细胞类型适当调整消化时间。

4、**终止消化要及时：**消化结束后应及时加入含血清培养基或血清终止消化，避免胰蛋白酶持续作用导致细胞损伤。

5、**打动作应轻柔：**重悬和吹打过程中应避免剧烈反复吹打，尤其是原代细胞较脆弱，过度机械刺激容易导致细胞死亡或贴壁能力下降。