

原代肺成纤维细胞提取

1. 分离肺组织

1. 小鼠麻醉后暴露心肺→含1%双抗的PBS冲肺→剪取肺组织→置肺于含有1%双抗DMEM/F-12培养基的50 mL离心管中

2. 消化

2. 将离心管中的肺组织置入盛有含有1%双抗DMEM/F-12的培养皿中→分离每片肺叶→将肺全部剪碎（不能太碎）→将剪碎的肺组织倒入盛有2 mg/mL的I型胶原酶的50 mL离心管中（2 mg/每只），混匀→37°C水浴锅中消化1 h（每10 min剧烈摇晃5-8次）；

3. 离心

3. 将I型胶原酶消化后的肺组织悬液离心，1200 rpm×10 min，常温（RT）；弃上清，用1%双抗DMEM/F-12培养基重悬，过70 μm滤网；离心，1200 rpm×10 min，RT；弃上清，加入5 mL红细胞裂解液，冰浴10 min，加15-20 mL含有1%双抗DMEM/F-12培养基终止反应，离心，11200 rpm×10 min，去上清；加入15-20 mL含有1%双抗DMEM/F-12培养基，过40 μm滤网；离心，1200 rpm×10 min，弃上清；

4. 培养

4. 加入含15%胎牛血清和2%双抗的DMEM/F-12完全培养基培养基重悬，加至细胞培养皿中，放入培养箱培养。

常见问题解析

1. 如何判断提取的原代细胞污染？

常见的细胞污染分为细菌污染、真菌污染、支原体污染、黑胶虫污染等。

①细菌污染：主要体现在肉眼观察到培养基快速变黄浑浊，显微镜下可见黑色细沙状颗粒，细胞空泡化，甚至凋亡以及有无菌体活动。若污染程度减轻，可尝试采用10X青链霉素双抗清洗3次并更换培养基，若效果不佳或污染程度重则需要高温高压灭菌后丢弃并对细胞培养箱进行紫外消毒处理；

②真菌污染：主要表现为肉眼观察到培养基内棉絮状菌落或霉菌漂浮，培养基颜色不变或者改变，高倍显微镜下可见丝状菌素或卵圆形酵母菌。当观察到上述情况下，细胞不可保留，必须丢弃污染细胞，用臭氧熏蒸培养箱，水盘更换无菌水并加0.1%两性霉素B；

③支原体污染：主要呈现细胞生长缓慢、形态拉丝、铺展、背景干净没有明显浑浊，且更换培养基后细胞状态无明显改善。可以通过荧光染色法或PCR检测法进一步判断支原体污染。若高度怀疑支原体污染，可添加支原体清除剂培养2-3代进行观察（每代都需要检测是否残存支原体感染），若多次传代后仍有支原体污染，则需要尽快丢弃细胞，避免气溶胶传播；

④黑胶虫污染：显微镜下可见微小黑点呈现快速布朗运动，细胞碎片增多，且细胞营养消耗快，需要频繁换液。若考虑黑胶虫污染，可采用黑胶虫清除剂处理3-6天，同步更换无污染血清；严重时冻存细胞，彻底消毒培养箱。

参考文献

[1] 柏梦如, 徐佩雯, 巩赫喆, 等.大鼠肺成纤维细胞原代分离培养方法优化[J].解剖学杂志, 2024, 47(05):385-388.