

“HeLa”细胞传代及生长周期观察

2024 年 4 月 11 日

2021080033

柯力

前言

“HeLa”细胞是从一名宫颈癌患者身上获得的癌细胞株。患者名叫“亨丽埃塔-拉克斯”。这些细胞是在未经 Henrietta Lacks 同意的情况下，通过阴道拭子从她身上窃取的。“HeLa”是一种永生细胞。由于“HeLa”细胞多产且非常耐用，科学家将其用于遗传学、病毒学和人类肿瘤学等多个领域的研究。“HeLa”细胞是第一个在体外培养成功的人类细胞系。这些细胞是癌细胞，具有致命的杀伤力，因为它们可以无限次复制。

20 世纪 50 年代，“HeLa”细胞被用于研制第一种脊髓灰质炎疫苗。它们在开发人类乳头瘤病毒（HPV）和细小病毒（Parvovirus）疫苗方面也很有用。在癌症研究中，“HeLa”细胞被用于测试不同的抗癌药物。它们还帮助研究人员发现人类有 23 对染色体，而不是 24 对。虽然“HeLa”细胞是偷来的，但它们在许多研究领域都是不可或缺的。

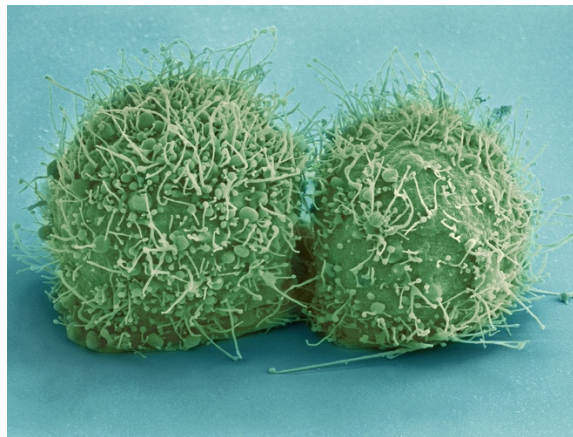


图 1 新分裂的“HeLa”细胞图像: 扫描电子显微镜

材料

- 平衡盐缓冲液
- “HeLa”细胞系
- 器具
 - 生物安全柜（超净工作台）
 - 倒置相差显微镜及数码成像系统
 - 离心机
 - 二氧化碳培养箱
 - 高压灭菌锅等
 - 移液器架
 - 移液器
 - 吸头
 - 辅料镊
 - 酒精棉球
 - 器械缸
 - 废固缸
 - 废液缸
- 记号笔
- 35 mm培养皿
- 1.5 mL离心管等
- PBS溶液
- 细胞培养基
 - DMEM 高糖型，使用时加入 10%（V/V）FBS 和 1%（V/V）双抗（DMEM++）
- FBS（Fetal Bovine Serum，胎牛血清）
- 双抗（100×，青霉素10000 U/mL、链霉素10000 μg/mL）
- 消化液
 - 0.05% 胰蛋白酶- 0.02% EDTA溶液（T-E）
- 70%-75%（V/V）乙醇

实验过程

1. 在生物安全柜（超净工作台）中，用移液管吸出培养基
2. 用 1 mL PBS 溶液清洗培养基，去除残留培养基
3. 丢弃 PBS 溶液，向培养皿中加入 300 μ L 消化液，（使用培养箱在 37° C 下消化细胞 3-5 分钟）
4. 在显微镜下检查消化后的细胞，确定它们是否已被充分消化，如果细胞高度融合，可能需要进一步消化 *
5. 用吸管反复抽吸细胞，以分散和挤出细胞 **
6. 加入 500 μ L DMEM++ 培养基终止消化
 - a. 再次重复抽吸，以确保 DMEM++ 的均匀分布
 - b. 在显微镜下分析平板底部是否有残留细胞
7. 室温下以 1000 转/分的转速离心溶液 5 分钟
8. 弃去上清液，将细胞重悬于 DMEM++ 培养基中
9. 细胞计数
 - a. 取 20 微升细胞液，用 PBS 溶液稀释
 - b. 使用玻璃细胞计数器显微载玻片计数
 - c. 每 $\frac{1}{4}$ 个较大的计数方格中应有约 20-50 个细胞
 - d. 细胞计数公式: $\frac{4 \times \text{个大格总数}}{4 \times \text{稀释倍数} \times 10000} = \text{每毫升细胞数量}$
10. 用 PBS 冲洗培养皿两次后，取适量细胞悬液放入原培养皿中（最终体积约为 1.5 毫升）
11. 用显微镜检查细胞是否均匀分布；细胞融合度应在 25-30% 左右
12. 在 37° C 和 5% CO₂ 条件下培养

* 仔细分析自己的情况，如果细胞汇合度高，消化时间应相应延长

** “HeLa” 细胞不易相互分离，对消化液的耐受性相对较差，因此需要吸液来帮助细胞解离

实验结果

细胞计数结果：

右上方	76
左上方	40
右下方	23
左下方	72
细胞总数	209
每毫升细胞总数	261,250 细胞/mL

表 1 显示毫升细胞数量的计算结果

“HeLa” 细胞培养分析：

通过使用生物安全柜（超净工作台），我们获得了使用 DMEM++ 消化前后 “HeLa” 细胞的清晰图像。这次实验很成功，很有趣，也学到了很多关于实验室程序的知识。圆形结构是与其他细胞分离的细胞，它们的细胞连接已被消化。拉伸结构是尚未被消化的 HeLa 细胞。

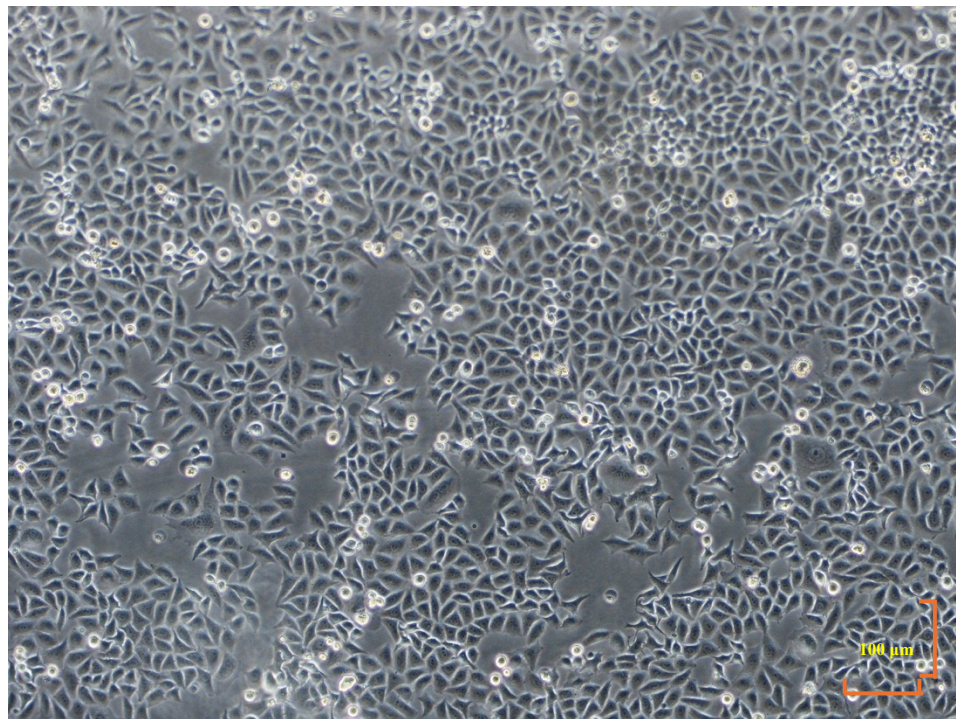


图2 预消化“HeLa”细胞

20x 倍

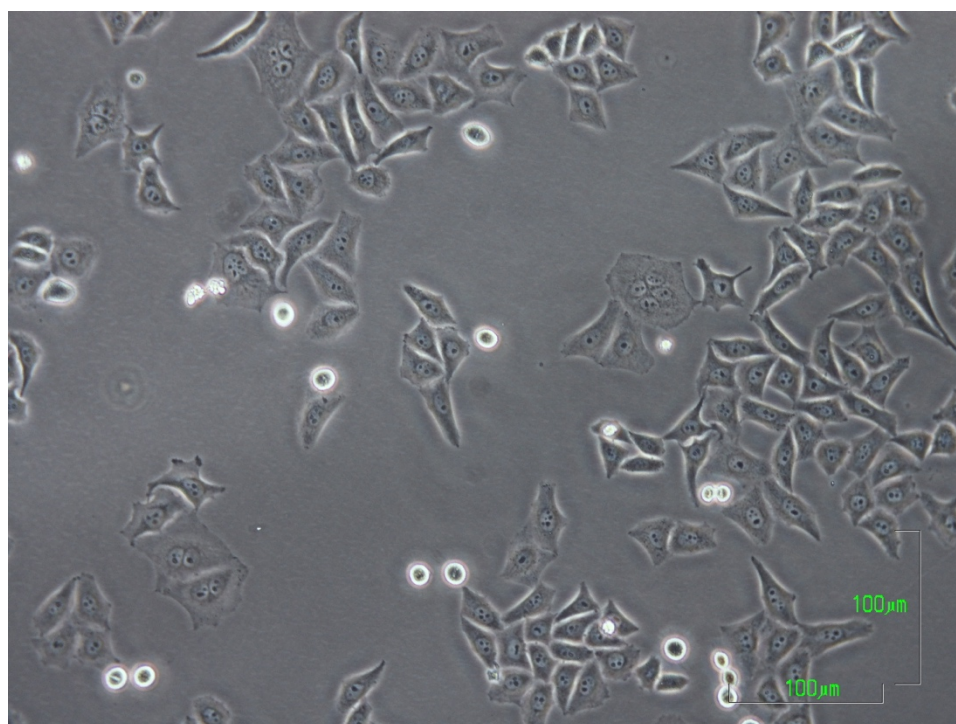


图3 近距离观察预消化“HeLa”细胞

40x 倍

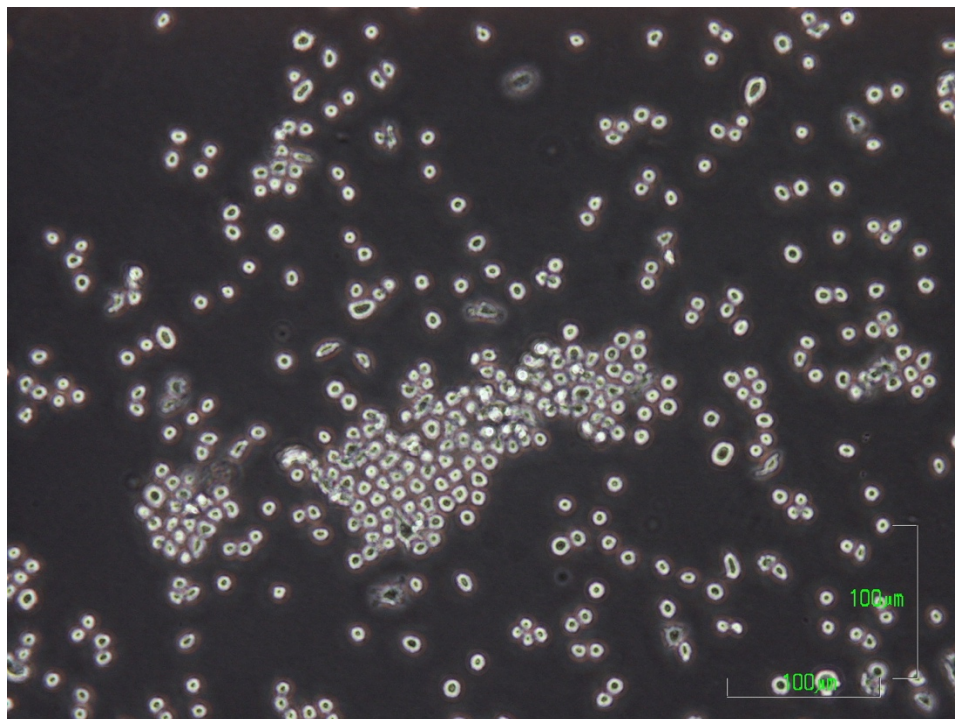


图4 消化DMEM++ 后的“HeLa”细胞，细胞融合度相当低

20x 倍