

# MDCK 细胞培养

## 一、目的

MDCK 细胞培养是分离流感病毒及相关研究实验的基本技术。疾控中心的所有技术人员，必须按照本文件相关的操作规程进行操作。

## 二、适用范围

适用于疾控中心所有技术人员。

## 三、程序

### (一) 生物安全要求

实验室生物安全级别：BSL-1

所有操作必须在 BSL-1 实验室的生物安全柜里进行。

### (二) 材料

1. 生长成片的MDCK细胞
2. 无菌的T25细胞培养瓶
3. D-MEM培养液（含有L-谷氨酰胺）
4. 青、链霉素母液(10000 U/mL 青霉素 G; 10000 $\mu$ g/mL 硫酸链霉素), 分装后保存于-20 $^{\circ}$ C
5. HEPES缓冲液, 1M母液
6. 胎牛血清
7. EDTA-胰酶 (0.05%胰酶, 0.53mM EDTA-4Na), 分装后保存于-20 $^{\circ}$ C
8. 7.5%牛血清白蛋白组分V
9. 1mL、10mL无菌移液管
10. 70%~75%的酒精

注意事项：经常检查试剂使用的有效期。

### (三) 实验步骤

这里以T75细胞瓶的单层细胞培养为例，叙述MDCK细胞的培养程序。如果细胞瓶的规格有变，MDCK细胞悬液的量必须做相应的调整。

#### 1. D-MEM 培养液的准备

500mL D-MEM液中加入：

青、链霉素母液5mL（终浓度达：100U/mL青霉素；100 $\mu$ g/mL链霉素），

HEPES缓冲液12.5mL（终浓度：25mM）。

7.5%牛血清白蛋白组分V 12.5mL

## 2. 细胞生长液的准备

胎牛血清10mL加到90mL的上述（1）的液体中，使胎牛血清的终浓度为10%。

3. 首先将细胞培养瓶中的培养液弃去，加入5mL在37℃水浴中预热的EDTA-胰酶。

4. 温和地摇动细胞瓶1min，使EDTA-胰酶均匀分布在整個细胞薄层。然后用移液管吸去EDTA胰酶。

5. 重新加入5mL在37℃水浴中预热的EDTA-胰酶重复上述步骤。

6. 加入1mLEDTA-胰酶使其均匀分布在整個细胞薄层，37℃孵育细胞瓶直至细胞从塑料细胞瓶的表面分离（约5~10min）。必要时可以摇动或吹打来分离细胞。然后加入1mL胎牛血清灭活残余的胰酶。

7. 加9mL已经配置好的含有L-谷氨酸的D-MEM培养液，轻轻用移动移液管来吹散细胞团。

8. 取10mL混合物加到90mL细胞生长液（细胞悬液的浓度大约为每毫升含 $10^5$ 细胞）

9. 每个T25细胞培养瓶加入6mL（ $6 \times 10^5$ /mL）细胞悬液，剩余的细胞悬液可以加到T75细胞瓶用于细胞传代。通常6mL细胞悬液2~3日可生长成片（80%~90%）的单层细胞。

10. 于37℃，5%CO<sub>2</sub>培养箱里培养细胞，每天观察细胞状态，以供进一步实验用。

生物秀——专心做生物！

[www.bb100.com](http://www.bb100.com)

生物秀论坛——学术交流，资源共享，互助社区

[www.bb100.com/bbs/](http://www.bb100.com/bbs/)