

RPMI1640培养基	吉诺生物医药科技有限公司
新生牛血清	美国Gibco公司
胰酶	上海生工生物工程技术有限公司
二甲基亚砜(DMSO)	美国Sigma公司

1.5 试验用品

50、100ml玻璃培养瓶	国产
吸管、离心管	国产
血球计数仪和盖玻片	国产
一次性1ml注射器	国产
50ml注射器	国产
4号针头	国产
止血钳、解剖剪、镊子等	国产

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 细胞培养用PBS配制: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.89g, KH_2PO_4 0.2g, 充分溶解于900ml dd H_2O , 定容至1000ml, 高温高压蒸气消毒。

2.1.2 0.25%胰酶: 0.25g胰酶溶解于100ml PBS (细胞培养用) 中, 搅拌均匀后过滤除菌, 4℃冰箱保存。

2.1.3 细胞培养方法: 将冻存的ACC-M细胞于37℃水浴中快速复苏, 加入10倍的含血清培养基离心后, 弃去上清液, 加入含10% 56℃灭活的新生牛血清, 含300mg/l谷氨酰胺, 2g/l碳酸氢钠的RPMI1640培养液吹打均匀后接种于50ml培养瓶中, 置于37℃, 5% CO_2 培养箱内培养。每隔2天换液, 倒置显微镜下观察细胞的生长状态, 待细胞长到瓶底的80%时, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 镜下观察见细胞变圆, 细胞间隙增大时加入RPMI1640培养液2ml终止消化, 用吸管吹打成单细胞悬液, 根据需要调整细胞浓度进行细胞实验。实验均用复苏传代三次后细胞。

2.2 裸鼠剪耳缺标记法

左前缺--1号, 左后缺--2号, 右前缺--3号, 右后缺--4号, 1+2--5号, 3+4--6号。