

## 脐带间充质干细胞原代分离培养（组织块贴壁法）

### 1. 脐带采集、运输。

通过无菌操作采集剖宫产脐带 1 份，放入含有生理盐水的脐带采集瓶中。2-8℃条件下运输至实验室（24h 内处理最佳，最多不超过 48h）。

### 2. 原代细胞分离培养

- 1) 用 75%酒精将含有脐带的采集瓶外表面消毒，传入生物安全柜中。
- 2) 用无菌的镊子将脐带放入无菌培养皿中，用生理盐水洗涤 2~3 次，洗净脐带上的血渍。
- 3) 将脐带转移至含有 75%无菌乙醇的培养皿中浸泡 10~20 秒，立即转移至含有生理盐水的培养皿中洗涤两遍。用无菌剪刀将脐带两端各剪掉 2cm ~ 3cm，弃去。
- 4) 将剩余脐带剪成约 2cm ~ 3cm 数段，用镊子将脐带血管中残留的血液挤出，用生理盐水洗净。
- 5) 用剪刀将脐带沿静脉剪开，平铺在培养皿上，用组织镊剔除上面的静脉和下面的羊膜，以及中间的两条动脉，剩余部分就是华通氏胶。
- 6) 将华通氏胶转移至提前称重的 50ml 离心管中，加入 1ml 配制好的完全培养基，用无菌手术剪将胶体剪成 3mm<sup>3</sup> 左右的组织块。向离心管中加入完全培养基，选择离心程序 2000rpm，5min 进行离心。
- 7) 用移液管吸去上清，称重。用完全培养基将组织块调整至 1g/ml。每个 T75 培养瓶中接种约 0.5g 组织块，用细胞刮刀使其均匀分布于培养瓶底部。37℃细胞培养箱培养 1-2h 后轻轻加入 10ml 培养基，注意不要

使组织块漂浮。

- 8) D7 换液，用移液管轻轻吸去上清，加入新配制的完全培养基 10ml。换液过程动作要轻缓，避免组织块漂浮。
- 9) D12-D14 天观察细胞扩增情况，进行细胞收获。
- 10) 细胞最早爬出时间 5-7 天，镜下可以观察到少量零散细胞。个别脐带原代细胞爬出晚，生长缓慢，可在 D12 左右再换液一次，适当推迟细胞收获的时间。
- 11) 以一份 20cm 左右脐带为例（约 20g），可分离约 10g 华通氏胶组织。经过 12-14 天的培养，P0 代可获得  $2.0 \times 10^7$  细胞，平均 1g 华通氏胶可收获 P0 细胞  $2.0 \times 10^6$  个。