

细胞培养 FAQ

在细胞培养的过程中，经常会出现各种各样的问题。为了大家能够更好的进行细胞培养，本文对实验中常出现的问题进行了汇总，方便大家查询和学习。

问题 1：血清中可能出现的沉淀物是什么？

基于多年的实验研究，用于细胞培养的胎牛血清以及其它血清中可能会存在以下种类的沉淀物：

1) 纤维蛋白，它是经常出现的较大的沉淀物，可以达到 1-2mm，可以用肉眼观察到。因为血清都是在低温下进行收集和快速处理的，一些纤维蛋白原（可溶性的形成絮状纤维蛋白的前体）在处理过程中仍然处于溶解状态，当经过最后的过滤分装后，就会在瓶中凝结出现纤维蛋白沉淀。

2) 磷酸钙，它也是常见的一种沉淀物，通常会使血清出现浑浊，并且在 37°C 培养的时候会增加。这种沉淀物在倒置显微镜下观察像小黑点，这些小黑点由于布朗运动看上去可以活动，因此经常被误认为是微生物污染。

3) 胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质。他们也是血清中出现沉淀物的常见原因。

问题 2：血清中的沉淀物对细胞培养有什么影响？

1) 细胞生长，我们的试验以及经验表明沉淀物不会影响细胞培养，我们的客户以及其它血清生产商也证明了这一点。

2) 过滤，如果血清中出现大量的沉淀物，血清将很难过滤。一般说来，因为在血清生产时最后已经经过 100nm 或者 40nm 的过滤处理，并且经过了严格的无菌检测，因此不推荐再过滤用于细胞培养的血清。在实验室中没有必要再过滤处理血清，以免操作不规范导致污染的发生。

3) 污染，磷酸钙往往被误认为微生物污染而引起争端。研究者可能会在血清中观察到一些絮状的沉淀，因此就会比较警觉的去做无菌试验，将血清放在培养箱中培养几天，结果可能会观察到更多的絮状沉淀，因此就断定血清被污染了。并且当研究者将血清样品放在倒置显微镜下观察时往往可以看到一些可以运动的小黑点，因此就更加确认是血清被污染了。于是，研究者就会花费更多的时间和精力来和生产商确认，但最终确定血清没有被污染而只是沉淀。为了避免这些问题的发生，我们建议不要直接将血清放在培养箱中培养观察是否有菌，而是将血清加到琼脂板上进行培养以观察是否有细菌生长。另外，也可以进行革兰氏染色，在油镜下观察，以确认是否有污染。

问题 3：如何避免血清中沉淀物的出现？

首先要注意正确的血清解冻步骤，而且溶解过程中一定要每隔一段时间均匀而缓慢的摇动血清。我们已经发现在下列情况下沉淀物可能增加，使用中应该尽量避免：

- 1) 热灭活血清；
- 2) 在 37°C 下培养血清；
- 3) 反复冻融；
- 4) γ 射线照射；
- 5) 长期储存在 2-8°C；
- 6) 在室温下放置时间过长；

问题 4：如何去除血清中的沉淀？

如果想去除这些絮状沉淀物，可以将血清分装到无菌离心管中，以 400g 离心 1~2min，上清液即可直接加入到培养基内使用。

注意：不要以过滤的方式去除这些絮状沉淀物，因为这可能阻塞滤膜。

问题 5：冻存管应如何解冻？

取出冻存管后，须立即放入 37°C 水槽中快速解冻，轻摇冻存管使其在 1 分钟内全部融化，并注意水面不可超过冻存管盖沿，否则易发生污染情形。另冻存管由液氮桶中取出解冻时，必须注意安全，预防冻存管发生爆裂。

问题 6：细胞冻存管解冻培养时，是否应马上去除 DMSO？

除少数特别注明对 DMSO 敏感的细胞外，绝大部分细胞株（包括悬浮细胞），在解冻后，都应直接放入含有 10-15ml 新鲜培养基的培养瓶中，待隔天再置换新鲜培养基以去除 DMSO 即可，如此可避免大部分解冻后细胞无法生长或贴附的问题。

问题 7：一般在拿到细胞后，应该注意什么？

收到细胞后先不要开盖，放在培养箱静置若干小时后（看细胞密度而定）在倒置显微镜下观察细胞生长情况，并对细胞进行不同倍数拍照（建议对收细胞时的培养基拍一张照片，观察培养基的颜色和是否有漏液情况，显微镜下拍细胞 100X，200X 各一张），排除细胞本身污染的情况；收到细胞未开封，出现污染状况一般可以再申请免费发送一株细胞。

收到细胞时如无异常情况，请在显微镜下观察细胞密度，如为贴壁细胞，未超过 80%汇合度时，将培养瓶中培养液吸出，留下 10ml 培养液继续培养；超过 80%汇合度时，请按细胞培养条件传代培养。如为悬浮细胞，吸出培养液、1000 转/分钟离心 2 分钟，吸出上清，管底细胞用新鲜培养基悬浮细胞后移回培养瓶。

细胞消化液建议使用 PBS 配制，慎用 Hanks 液配制。

问题 8：可否使用与原先培养条件不同的培养基？

一般不建议。每一细胞株均有其特定使用且已适应的细胞培养基，若骤然使用和原先提供的培养条件不同的培养基，细胞大都无法立即适应，造成细胞无法存活。

问题 9：可否使用与原先培养条件不同的血清种类？

不能。血清是细胞培养上一个极为重要的营养来源，所以血清的种类和品质对于细胞的生长会产生极大的影响。来自不同物种的血清，在一些物质或分子的数量或内容物上都有所不同，血清使用错误常会造成细胞无法存活。

问题 10：L-谷氨酰胺在细胞培养中重要吗？它在溶液中不稳定吗？

L-谷氨酰胺在细胞培养时是重要的。脱掉氨基后，L-谷氨酰胺可作为培养细胞的能量来源、参与蛋白质的合成和核酸代谢。L-谷氨酰胺在溶液中经过一段时间后会降解，但是确切的降解率一直没有最终定论。L-谷氨酰胺的降解导致氨的形成，而氨对于一些细胞具有毒性。

问题 11：培养细胞时应使用 5%或 10%CO₂？或根本没有影响？

一般培养基中大都使用 HCO₃⁻/CO₃²⁻/H⁺作为 pH 的缓冲系统，而培养基中 NaHCO₃ 的含量将决定细胞培养时应使用的 CO₂ 浓度。当培养基中 NaHCO₃ 含量为每公升 3.7g 时，细胞培养时应使用 10%CO₂；当培养基中 NaHCO₃ 为每公升 1.5g 时，则应使用 5%CO₂ 培养细胞。

问题 12：何时须更换培养基？

视细胞生长密度而定，或遵照细胞株基本数据上的更换时间，按时更换培养基即可。

问题 13：培养基中是否须添加抗生素？

除于特殊筛选系统中外，一般正常培养状态下，培养基中不应添加任何抗生素。

如果是没有进行过细胞培养的新手，对无菌技术没有信心的，或者提取的原代细胞，怕污染的，可以适量添加抗生素。

抗生素本身也是有毒性的，有些抗生素的药效浓度水平与毒效浓度水平非常接近，对细胞多少有伤害。

问题 14：悬浮性细胞应如何传代处理？

一般仅需持续加入新鲜培养基于原培养角瓶中，稀释细胞浓度即可，若培养液太多时，可将培养角瓶口端稍微抬高，直到无法容纳为止。分瓶时取出一部份含细胞之培养液至另一新的培养角瓶，加入新鲜培养基稀释至适当浓度，重复前述步骤即可。

问题 15：想将一般动物细胞离心下来，其离心速率应为多少转速？

回收动物细胞，其离心速率一般为 300xg(约 1000rpm)，5-10 分钟，过高之转速，将造成细胞死亡。

问题 16：细胞的接种密度为何？

依照细胞株基本数据上之接种密度或稀释分盘之比例接种即可。细胞数太少或稀释的太多亦是造成细胞无法生长之一重要原因。

问题 17：细胞冷冻培养基之成份为何？

动物细胞冷冻保存时最常使用的冷冻培养基是含 5-10%DMSO(dimethylsulfoxide)和 90-95%原来细胞生长用之新鲜培养基均匀混合之。注意：由于 DMSO 稀释时会放出大量热能，故不可将 DMSO 直接加入细胞液中，必须使用前先行配制完成。

问题 18：冷冻保存细胞的方法？

冷冻保存方法一：冷冻管置于 4°C30-0 分钟 →(-20°C30 分钟*) →-80°C16~18 小时(或隔夜) →液氮槽 vaporphase 长期储存。冷冻保存方法二：冷冻管置于已设定程序之可程序降温机中每分钟降 1-3°C 至-80°C 以下，再放入液氮槽 vaporphase 长期储存。 -20°C 不可超过 1 小时，以防止冰晶过大，造成细胞大量死亡，亦可跳过此步骤直接放入-80°C 冰箱中，惟存活率稍微降低一些。

问题 19：细胞要冷冻保存时，细胞冷冻管内应有多少细胞浓度？

冷冻管内细胞数目一般为 1x10⁶cells/mlvial，融合瘤细胞则以 5x10⁶cells/mlvial 为宜。

问题 20：应如何避免细胞污染？

细胞污染的种类可分成细菌、酵母菌、霉菌、病毒、原虫、支原体。主要的

赛澳美细胞技术（北京）有限公司

污染原因为无菌操作技术不当、操作室环境不佳、污染的血清和污染的细胞等。
严格的无菌操作技术、清洁的环境、与品质良好的细胞来源和培养基配制是减低污染的最好方法。

