

## 细胞培养的一般过程

### 准备工作

准备工作的内容包括器皿的清洗、干燥与消毒，培养基与其他试剂的配制、分装及灭菌，无菌室或超净台的清洁与消毒，培养箱及其他仪器的检查与调试等。

### 取材

在无菌环境下从机体取出某种组织细胞（视实验目的而定），经过一定的处理（如消化分散细胞、分离等）后接入培养器皿中，这一过程称为取材。如是细胞株的扩大培养则无取材这一过程。机体取出的组织细胞的首次培养称为原代培养。理论上讲各种动物和人体内的所有组织都可以用于培养，实际上幼体组织（尤其是胚胎组织）比成年个体的组织容易培养，分化程度低的组织比分化高的容易培养，肿瘤组织比正常组织容易培养。取材后应立即处理，尽快培养，因故不能马上培养时，可将组织块切成黄豆般大的小块，置 4℃ 的培养液中保存。取组织时应严格保持无菌，同时也要避免接触其他的有害物质。取病理组织和皮肤及消化道上皮细胞时容易带菌，为减少污染可用抗菌素处理。

### 培养

将取得的组织细胞接入培养瓶或培养板中的过程称为培养。如系组织块培养，则直接将组织块接入培养器皿底部，几个小时后组织块可贴牢在底部，再加入培养基。如系细胞培养，一般应在接入培养器皿之前进行细胞计数，按要求以一定的量（以每毫升细胞数表示）接入培养器皿并直接加入培养基。细胞进入培养器皿后，立即放入培养箱中，使细胞尽早进入生长状态。

正在培养中的细胞应每隔一定时间观察一次，观察的内容包括细胞是否生长良好，形态是否正常，有无污染，培养基的 PH 是否太酸或太碱（由酚红指示剂指示），此外对培养温度和 CO<sub>2</sub> 浓度也要定时检查。

一般原代培养进入培养后有一段潜伏期（数小时到数十天不等），在潜伏期细胞一般不分裂，但可贴壁和游走。过了潜伏期后细胞进入旺盛的分裂生长期。细胞长满瓶底后要要进行传代培养，将一瓶中的细胞消化悬浮后分至两到三瓶继续培养。每传代一次称为“一代”。二倍体细胞一般只能传几十代，而转化细胞系或细胞株则可无限地传代下去。转化细胞可能具有恶性性质，也可能仅有不死性（Immortality）而无恶性。培养正在生长中的细胞是进行各种生物医学实验的良好材料。

### 冻存及复苏

为了保存细胞，特别是不易获得的突变型细胞或细胞株，要将细胞冻存。冻存的温度一般用液氮的温度 $-196^{\circ}\text{C}$ ，将细胞收集至冻存管中加入含保护剂（一般为二甲亚砜或甘油）的培养基，以一定的冷却速度冻存，最终保存于液氮中。在极低的温度下，细胞保存的时间几乎是无限的。

复苏一般采用快融方法，即从液氮中取出冻存管后，立即放入 $37^{\circ}\text{C}$ 水中，使之在一分钟内迅速融解。然后将细胞转入培养器皿中进行培养。

冻存过程中保护剂的选用、细胞密度、降温速度及复苏时温度、融化速度等都对细胞活力有影响。

## 细胞培养常见问题分析

### 1. 冷冻管应如何解冻？

取出冷冻管后，须立即放入 37 °C 水槽中快速解冻，轻摇冷冻管使其在 1 分钟内全部融化，并注意水面不可超过冷冻管盖沿，否则易发生污染情形。另冷冻管由液氮桶中取出解冻时，必须注意安全，预防冷冻管之爆裂。

### 2. 细胞冷冻管解冻培养时，是否应马上去除 DMSO？

除少数特别注明对 DMSO 敏感之细胞外，绝大部分细胞株（包括悬浮性细胞），在解冻之后，应直接放入含有 10–15ml 新鲜培养基之培养角瓶中，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之问题。

### 3. 可否使用与原先培养条件不同之培养基？

不能。每一细胞株均有其特定使用且已适应之细胞培养基，若骤然使用和原先提供之培养条件不同之培养基，细胞大都无法立即适应，造成细胞无法存活。

### 4. 可否使用与原先培养条件不同之血清种类？

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。

### 5. 何谓 FBS, FCS, CS, HS ？

FBS (fetal bovine serum) 和 FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，两者都是指胎牛血清，FCS 乃错误的使用字眼，请不要再使用。CS (calf serum) 则是指小牛血清。HS (horseserum) 则是指马血清。

### 6. 培养细胞时应使用 5 % 或 10% CO<sub>2</sub>? 或根本没有影响？

一般培养基中大都使用 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/H<sup>+</sup> 作为 pH 的缓冲系统，而培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 的含量将决定细胞培养时应使用的 CO<sub>2</sub> 浓度。当培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 含量为每公升 3.7 g 时，细胞培养时应使用 10 % CO<sub>2</sub>；当培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 为每公升 1.5 g 时，则应使用 5 % CO<sub>2</sub> 培养细胞。

### 7. 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之更换时间，按时更换培养基即可。

### 8. 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。

### 9. 附着性细胞继代时所使用之 trypsin-EDTA 浓度？应如何处理？

一般使用之 trypsin-EDTA 浓度为 0.05% trypsin-0.53mMEDTA.4 Na。第一次开瓶后应立即少量分装于无菌试管中，保存于 -20 °C，避免反复冷冻解冻造成 trypsin 之活性降低，并可减少污染之机会。

### 10. 悬浮性细胞应如何继代处理？

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。

### 11. 欲将一般动物细胞离心下来，其离心速率应为多少转速？

欲回收动物细胞，其离心速率一般为 300xg (约 1,000rpm)，5 - 10 分钟，过高之转速，将造成细胞死亡。

### 12. 细胞之接种密度为何？

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。

### 13. 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 (dimethyl sulfoxide) 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。

### 14. DMSO 之等级和无菌过滤之方式为何？

冷冻保存使用之 DMSO 等级，必须为 Tissue culture grade 之 DMSO (如 Sigma D2650)，其本身即为无菌状况，第一次开瓶后应立即少量分装于无菌试管中，保存于 4° C，避免反复冷冻解冻造成 DMSO 之裂解而释出有害物质，并可减少污染之机会。若要过滤 DMSO，则须使用耐 DMSO 之 Nylon 材质滤膜。

### 15. 冷冻保存细胞之方法？

冷冻保存方法一：冷冻管置于 4°C 30~60 分钟 → (-20 °C 30 分钟\*) → -80 °C 16~18 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 vapor phase 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。

16. 细胞欲冷冻保存时， 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  $1 \times 10^6$  cells/ml vial， 融合瘤细胞则以  $5 \times 10^6$  cells/ml vial 为宜。

17. 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、病毒和霉浆菌。主要的污染原因为无菌操作技术不当、操作室环境不佳、污染之血清和污染之细胞等。严格之无菌操作技术、清洁的环境、与品质良好之细胞来源和培养基配制是减低污染之最好方法。

18. 如果细胞发生微生物污染时， 应如何处理？

加入相应抗生素。直接灭菌后丢弃之。

19. 支原体(mycoplasma) 污染的细胞， 是否能以肉眼观察出异状？

不能。除极有经验之专家外， 大多数遭受支原体污染的细胞株， 无法以其外观分辨之。

20. 支原体污染会对细胞培养有何影响？

支原体污染几乎可影响所有细胞之生长参数， 代谢及研究之任一数据。故进行实验前， 必须确认细胞为 mycoplasma-free， 实验结果之数据方有意义。

21. CO<sub>2</sub> 培养箱之水盘如何保持清洁？

定期(至少每两周一次) 以无菌蒸馏水或无菌去离子水更换之。

22. 为何培养基保存于 4 °C 冰箱中， 颜色会偏暗红色， 且 pH 值会越来越偏碱性？

培养基保存于 4 °C 冰箱中， 培养基内之 CO<sub>2</sub> 会逐渐溢出， 造成培养基越来越偏碱性。而培养基中之酸碱指示剂(通常为 phenol red) 的颜色也会随碱性增加而更偏暗红。培养基偏碱之结果， 将造成细胞生长停滞或死亡。若培养基偏碱时， 可以通入无菌过滤之 CO<sub>2</sub>， 以调整 pH 值。

23. 各种细胞培养用的 dish, flask 是否均相同？

不同厂牌的 dish 或 flask， 其所 coating 的 polymer 不同， 制造程序亦不同， 虽对大部分细胞没有太大之影响， 惟少数细胞则可能因使用厂牌不同之 dish 或 flask 而有显著之生长差异。

24. 购买之细胞冷冻管经解冻后， 为何会发生细胞数目太少之情形？

研究人员在冷冻细胞之培养时出现细胞数目太少， 大都是因为离心过程操作上的失误， 造成细胞的物理性损伤， 以及细胞流失。建议细胞解冻后不要立刻离心， 应待细胞生长隔夜后再更换培养基即可。

25. 购买之细胞死亡或细胞存活率不佳可能原因？

研究人员在细胞培养时出现存活率不佳，常见原因可归纳为：培养基使用错误或培养基品质不佳。血清使用错误或血清的品质不佳。解冻过程错误。冷冻细胞解冻后，加以洗涤细胞和离心。悬浮细胞误认为死细胞。培养温度使用错误。细胞置于 -80°C 太久。

#### 26. 收到之冷冻管瓶身破裂，瓶盖有裂纹，或瓶盖脱落之原因？

冷冻管瓶盖裂纹，或瓶身破裂，可能是因为操作者夹取冷冻管时用力不当，造成冷冻管裂损，建议使用止血钳小心夹取。另冷冻管瓶盖松动或松脱，乃因热胀冷缩之物理现象，冷冻管有可能因此而造成细胞污染，故冷冻管于放入和取出液氮桶时，均应立刻将冷冻管再一次扭紧。

#### 27. 如何选用特殊细胞系培养基？

培养某一类型细胞没有固定的培养条件。在 MEM 中培养的细胞，很可能在 DMEM 或 M199 中同样很容易生长。总之，首选 MEM 做粘附细胞培养、RPMI-1640 做悬浮细胞培养是一个好的开始，各种目的无血清培养最好首选 AIM V (12005) 培养基 (SFM)。

#### 28. 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。

#### 29. GlutaMAX-I 是什么？培养细胞如何利用 GlutaMAX-I？这个二肽有多稳定？

GlutaMAX-I 二肽是一个 L-谷氨酰胺的衍生物，其不稳定的  $\alpha$ -氨基用 L-丙氨酸来保护。一种肽酶逐渐裂解二肽，释放 L-谷氨酰胺供利用。GlutaMAX-I 二肽非常稳定，即使在 121 磅灭菌 20 分钟，GlutaMAX-I 二肽溶液有最小的降解，如果在相同条件下，L-谷氨酰胺几乎完全降解。

#### 30. 什么培养基中可以省去加酚红？

酚红在培养基中被用来作为 PH 值的指示剂：中性时为红色，酸性时为黄色，碱性时为紫色。研究表明，酚红可以模拟固醇类激素的作用，（特别是雌激素）。为避免固醇类反应，培养细胞，尤其是哺乳类细胞时，用不加酚红的培养基。由于酚红干扰检测，一些研究人员在做流式细胞检测时，不使用加有酚红的培养基。

#### 31. 培养基中丙酮酸钠的作用是什么？

丙酮酸钠可以作为细胞培养中的替代碳源，尽管细胞更倾向于以葡萄糖作为碳源，但是，如果没有葡萄糖的话，细胞也可以代谢丙酮酸钠。

#### 32. 二价离子抑制胰蛋白酶活性吗？使用胰蛋白酶时加入 EDTA 的目的是什么？



二价离子的确抑制胰蛋白酶活性。EDTA 用来整合游离的镁离子和钙离子，以便保持抑制胰蛋白酶的活性。建议胰蛋白酶处理细胞前，用 EDTA 清洗细胞，以消除来自培养基中所有的二价离子。

33. 书上说，Hank 's 平衡盐溶液 (HBS) 要在空气中使用，不需要 CO<sub>2</sub> 培养箱。原因是什么？Hank 's 平衡盐溶液 (HBS) 和 Earle 's 平衡盐溶液 (EBS) 有什么本质的功能差别？

HBS 和 EBS 的主要差别在于碳酸氢钠的水平，在 Eagles (2.2g/L) 中比在 Hanks (0.35g/L) 中高。碳酸氢钠需用高水平的 CO<sub>2</sub> 平衡，以维持溶液的 PH 值。Eagles 液在空气水平的 CO<sub>2</sub> 中，溶液会变碱，Hanks 液在 CO<sub>2</sub> 培养箱中会变酸。如果希望在 CO<sub>2</sub> 培养箱中保存组织，需要用 Eagles 液，。如果仅仅是清洗将要在细胞培养基中储存的组织，用 Hanks 液就可以了。

血清

34. 保存血清最好的方法？

建议血清应保存在-5℃至-20℃。然而，若存放于 4℃时，请勿超过一个月。若您一次无法用完一瓶，建议您无菌分装血清至恰当的灭菌容器内，再放回冷冻。35. 如何解冻血清才不会使产品质量受损？

建议您将血清从冷冻箱取出后，先置于 2~8℃冰箱使之融解，然后在室温下使之全融。但必须注意的是，融解过程中必须规则地摇晃均匀。

36. 血清解冻后发现絮状沉淀物出现，该如何处理？

血清中沉淀物的出现有许多种原因，但最普遍的原因是由于血清中脂蛋白的变性所造成，而血纤维蛋白(形成凝血的蛋白之一)在血清解冻后，也会存在于血清中，亦是造成沉淀物的主要原因之一。但这些絮状沉淀物，并不影响血清本身的质量。若欲去除这些絮状沉淀物，可以将血清分装至无菌离心管内，以 400g 稍微离心，上清液即可接着加入培养基内一起过滤。我们不建议您以过滤的方法去除这些絮状沉淀物，因为它可能会阻塞您的过滤膜。

37. 为什么要热灭活血清？

加热可以灭活补体系统。激活的补体参与溶解细胞事件，刺激平滑肌收缩，细胞和血小板释放组胺，激活淋巴细胞和巨噬细胞。在免疫学研究，培养 ES 细胞，昆虫细胞和平滑肌细胞时，推荐使用热灭活血清。

38. 有必要做热灭活吗？

实验显示，经过正确处理的热灭活血清，对大多数的细胞而言是不需要的。经此处理过的血清对细胞的生长只有微小的促进，或完全没有任何作用，甚至通常因为高

温处理影响了血清的质量，而造成细胞生长速率的降低。而经过热处理的血清，沉淀物的形成会显著的增多，这些沉淀物在倒置显微镜下观察，像是“小黑点”，常常会让研究者误以为是血清遭受污染，而把血清放在 37℃ 环境中，又会使此沉淀物更增多，使研究者误认为是微生物的分裂扩增。

### 39. 为什么储存在冰箱中的胎牛血清会出现沉淀？

GIBICO 的胎牛血清 没有预老化，储存在 2—8℃ 时，血清中的各种蛋白和脂蛋白（如冷凝集素、纤维蛋白原、玻粘连蛋白等）可能聚集而形成沉淀或可见的混浊。这应该不会影响血清的质量。推荐在 -20℃ 储存胎牛血清，避免反复冻融。

### 40. 如何避免血清里沉淀物的产生？

解冻血清时，请按照所建议的逐步解冻法（-20℃ 至 4℃ 至室温），若血清解冻时改变的温度太大（如 -20℃ 至 37℃），实验显示非常容易产生沉淀物。

解冻血清时，请随时将之摇晃均匀，使温度及成分均一，减少沉淀的发生。请勿将血清置于 37℃ 太久。若在 37℃ 放置太久，血清会变得混浊，同时血清中许多较不稳定的成分也会因此受到损害，而影响血清的质量。

血清的热灭活非常容易造成沉淀物的增多，若非必要，可以无须做此步骤。若必须做血清的热灭活，请遵守 56℃，30 分钟的原则，并且随时摇晃均匀。温度过高，时间过久或摇晃不均匀，都会造成沉淀物的增多。