

干货 | 细胞培养之二十问答

转自：生物制品圈

细胞培养专题—细胞培养 FAQ

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。

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% CO₂? 或根本没有影响？

一般培养基中大都使用 HCO₃⁻/CO₂/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 3.7 g 时，细胞培养时应使用 10 % CO₂；当培养基中 NaHCO₃ 为每公升 1.5 g 时，则应使用 5 % CO₂ 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 vapor phase 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 1x10⁶ cells/ml vial， 融合瘤细胞则以 5x10⁶ 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？

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。