

关于细胞培养中的细节问题



基础篇-无菌操作基本技术

1. 实验进行前，无菌室及无菌操作台(laminar flow) 以紫外灯照射30-60分钟灭菌，以70 %ethanol 擦拭无菌操作台面，并开启无菌操作台风扇运转10 分钟后，才开始实验操作。每次操作只处理一株细胞株，且即使培养基相同亦不共享培养基，以避免失误混淆或细胞间污染。实验完毕后，将实验物品带出工作台，以70 % ethanol 擦拭无菌操作台面。操作间隔应让无菌操作台运转10 分钟以上后，再进行下一个细胞株之操作。
2. 无菌操作工作区域应保持清洁及宽敞，必要物品，例如试管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暂时放置，其它实验用品用完即应移出，以利于气流之流通。实验用品以70 % ethanol 擦拭后才带入无菌操作台内。实验操作应在台面之中央无菌区域，勿在边缘之非无菌区域操作。
3. 小心取用无菌之实验物品，避免造成污染。勿碰触吸管尖头部或是容器瓶口，亦不要在打开之容器正上方操作实验。容器打开后，以手夹住瓶盖并握住瓶身，倾斜约45° 角取用，尽量勿将瓶盖盖口朝上放置桌面。

- 4. 工作人员应注意自身之安全，须穿戴实验衣及手套后才进行实验。对于来自人类或是病毒感染之细胞株应特别小心操作，并选择适当等级之无菌操作台(至少Class II)。操作过程中，应避免引起aerosol 之产生，小心毒性药品，例如DMSO 及TPA 等，并避免尖锐针头之伤害等。
- 5. 定期检测下列项目：
 - 5.1. CO₂ 钢瓶之CO₂ 压力
 - 5.2. CO₂ 培养箱之CO₂ 浓度、温度、及水盘是否有污染(水盘的水用无菌水，每周更换)。
 - 5.3. 无菌操作台内之airflow 压力，定期更换紫外线灯管及HEPA 过滤膜，预滤网(300小时/预滤网，3000 小时/HEPA)。
- 6. 水槽可添加消毒剂(Zephirin 1:750)，定期更换水槽的水。

基础篇-实验用品

1. 种类：

1.1. 细胞培养实验用品均为无菌，除了玻璃容器与pasteur pipet 外，其它均为塑料无菌制品。

1.2. TC 级培养盘表面均有coating 高分子物质以让细胞吸附，培养容器种类有Tflask, plates, dishes, roller bottle 等，依实验需要使用。

1.3. plastic sterile pipet: 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml

1.4. 塑料离心管: 15 ml, 50 ml, 均有2 种不同材质，其中polypropylene (PP) 为不透明材质，polystyrene (PS) 为透明材质，可依实验需要而选择适合材质之离心管。

1.5. glass pastuer pipet: 9 inch, 用以抽掉废弃培养液等。

1.6. 玻璃血清瓶(Pyrex or Duran glassware): 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000ml

2. 清洗：

2.1. 新购玻璃血清瓶先以0.1~0.05 N HCl 浸泡数小时，洗净后才开始使用。

2.2. 用过之玻璃血清瓶，以高压蒸汽灭菌，洗净后分别用一次与二次去离子水冲洗干净，勿加清洁剂清洗。

3. 灭菌：

3.1. 实验用玻璃血清瓶以铝箔纸包覆瓶盖，高压蒸汽灭菌121°C，15 lb，20 分钟，置于oven 中烘干。

3.2. 实验用玻璃pasteur pipet 以干热灭菌170°C，4 小时。

3.3. 液体或是固体废弃物可用10 % hypochloride 溶液（次氯酸，即漂白水）或是蒸汽高压灭菌121 °C，15 lb，20 分钟处理。

基础篇-培养基

1. 液体培养基贮存于4℃ 冰箱，避免光照，实验进行前放在37℃ 水槽中温热。
2. 液体培养基(加血清) 存放期为六个月，期间 glutamine 可能会分解，若细胞生长不佳，可以再添加 适量glutamine。
3. 粉末培养基配制(以1 升为例):
 - 3.1. 细胞培养基通常须添加10 % 血清，因此粉末培养基之配制体积为900 ml，pH 为7.2 - 7.4。NaHCO₃ 为另外添加，若将NaHCO₃ 粉末直接加入液体培养基中会造成pH 之误差，或局部过碱。因此粉末培养基及 NaHCO₃ 粉末应分别溶解后才混合，然后用CO₂ 气体调整pH，而非用强酸(HCl)或强碱(NaOH)，因为氯离子对细胞生长可能有影响，且贮存时培养基的pH 易发生改变。

3.2. 材料:

纯水 (milli-Q 水或二次至三次蒸馏水, 水质非常重要), 粉末培养基, NaHCO_3 , 电磁搅拌器 无菌血清瓶, 0.1 或 0.2 mm 无菌过滤膜, pH 计, 真空泵, CO_2 气体

3.3. 步骤:

3.3.1. 取粉末培养基溶于 700 ml milli-Q 水中, 搅拌使其溶解。

3.3.2. 称取适量之 NaHCO_3 粉末溶于 200 ml milli-Q 水中, 搅拌使其溶解, 然后通入 CO_2 气体至饱和, 约 3-5 分钟。

3.3.3. 将溶解且含饱和 CO_2 之 NaHCO_3 溶液加入溶解之液体培养基中混合。混后溶液之 pH 应为 7.2-7.4, 除非 pH 值偏差太大, 否则不需用酸碱再调整之。若为太碱, 可再通入 CO_2 气体调整 pH。培养基以真空帮浦通过过滤膜时, pH 会升高 0.1-0.2。

3.3.4. 以 0.1 或 0.2 mm 无菌过滤膜过滤灭菌, 同时分装至无菌容器中, 标示培养基种类、日期、瓶号等, 贮存于 4°C 。(血清亦可加入培养基中一起过滤)

3.3.5. 配制之培养基配制须作生长试验与污染测试。

附-配制培养基之生长测试

材料:

MDCK cell (ATCC CCL-34 或CCRC 60004)
6-well TC plate (or 35 mm TC dish)
methanol
glacial acetic acid
10 % Giemsa solution (GibcoBRL 10092-013)

步骤:

1. 以待测试培养基培养MDCK cell, 接种MDCK 细胞于6-well plate (或35mm TC dish) 中, 每个well 接种 1×10^2 活细胞, 同时作对照组实验。
2. 接种5~7 天后, 在100 倍倒立显微镜作观察细胞群落之生长, 待细胞群落大到可以肉眼观察, 而群落间不互相接触时即可。
3. 去除培养基, 加入1 ml Carnoy' s 固定液(甲醇: 冰醋酸= 3:1), 室温下静置10 min。
4. 去除固定液, 水洗二次。
5. 加入1 ml 10 % Giemsa solution, , 室温下静置染色2-3 min。
6. 去除染液, 水洗二次。
7. 以肉眼计数群落数, 并比较之, 若新配制或新批号的培养基对细胞生长不佳, 则丢弃之。

基础篇-抗生素

1. 细胞库之细胞培养基不加抗生素

1.1. 培养自ATCC 引进之细胞株，培养基中不加抗生素。

1.2. 培养自其它实验室引进之细胞株，制作token freeze 前培养基须添加抗生素，待token freeze 通过污染测试后，大量培养时则不加抗生素。

2. 寄送活细胞时，须将培养液充满整个flask 时，则须添加抗生素 (penicillin 100 units/ml + streptomycin 100 ug/ml)。

3. 若要检测mycoplasma，则培养基内不可添加 gentamicin，因gentamicin 会抑制mycoplasma 生长。

- 4. 去除细菌污染之抗生素混合配方: penicillin 250 units/ml, streptomycin 250 ug/ml, neomycin 250 ug/ml, bacitracin 2.5 units/ml, 注意混合使用后药物毒性会增强。

- 5. 抗生素使用种类与浓度:

浓度.	储存温度.	杀灭细菌	工作
penicillin G(+) bacteria		100 units/ml	-20°C
streptomycin G(+) and G(-) bacteria		100 ug/ml	-20°C
chlortetracycline G(+) and G(-) bacteria		50 ug/ml	-20°C
gentamicin G(+) and G(-) bacteria, mycoplasma		50 ug/ml	-20°C
amphotericin B yeast and molds		2.5 ug/ml	-20°C
nystatin yeast and molds		50 ug/ml	-20°C
fungizone yeast and molds		2.5ug/ml	-20°C

基础篇-血清

1. 血清必须贮存于 $-20 \sim -70^{\circ}\text{C}$ ，若存放于 4°C ，请勿超过一个月。如果一次无法用完一瓶，可将 $40 \sim 45 \text{ ml}$ 分装于无菌 50 ml 离心管中，由于血清结冻时体积会增加约 10% ，必须预留此膨胀体积之空间，否则易发生污染或容器冻裂之情形。
2. 一般厂商提供之血清为无菌，不需再无菌过滤。若发现血清有许多悬浮物，则可将血清加入培养基内一起过滤，勿直接过滤血清。
3. 瓶装 (500 ml) 血清解冻步骤 (逐步解冻法)： -20°C 或 -70°C 至 4°C 冰箱溶解一天，至室温下全溶后再分装，一般以 50 ml 无菌离心管可分装 $40 \sim 45 \text{ ml}$ 。在溶解过程中须规则摇晃均匀 (小心勿造成气泡)，使温度与成分均一，减少沉淀的发生。勿直接由 -20°C 直接至 37°C 解冻，因温度改变太大，容易造成蛋白质凝结而发生沉淀。

4. heat-inactivation 是指 56°C ，30 分钟加热已完全解冻之血清。加热过程中须规则摇晃均匀。此热处理之目的是使血清中之补体成份 (complement) 去活化。除非必须，一般不建议作此热处理，因为会造成沈淀物之显著增多，且会影响血清之品质。补体参与之反应有：cytolytic activities, contraction of smooth muscle, release of histamine from mast cells and platelets, enhanced phagocytosis, chemotaxis and activation of lymphocytic and macrophage cell type。

5. 勿将血清置于 37°C 太久，若在 37°C 放置太久，血清会变得混浊，同时血清中许多较不稳定之成份亦会因此受到破坏，而影响血清之品质。

6. 血清之沉淀物

6.1. 凝絮物：发生之原因有许多种，但普遍之原因是血清中之脂蛋白(lipoprotein) 变性及解冻后血清中存在之血纤维蛋白(fibrin) 造成，这些凝絮沉淀物不会影响血清本身之品质。若欲减少这些凝絮沉淀物，可用离心3000 rpm, 5 min 去除，或离心后上清液可以加入培养基中一起过滤。不建议用过滤步骤去除这些凝絮沉淀物，因为会阻塞过滤膜。

6.2. 显微镜下观察之“小黑点”：通常经过热处理之血清，沉淀物的形成会显著的增多。有些沉淀物在显微镜下观察像是“小黑点”，常会误认为血清遭受污染，而将血清放在37℃中欲培养此“微生物“，但在37℃环境下，又会使此沉淀物增多，更会误认为微生物之增殖，但以培养细菌之培养基检测，又没有污染。一般而言，此小黑点应不会影响细胞之生长，但若怀疑此血清之品质，应立即停用，更换另一批号的血清。

附-血清之生长测试

材料:

MDCK cell (ATCC CCL-34 或CCRC 60004)

α -MEM (alpha modified minimal essential medium, GibcoBRL 12000-022)

6-well TC plate (or 35mm TC dish)

methanol

glacial acetic acid

10 % Giemsa solution (GibcoBRL 10092-013)

步骤:

1. 以 α -MEM with 10 % FBS (已测试过) 培养MDCK 细胞于T75 flask 至80% confluency.

2. 以trypsin-EDTA 处理细胞, 离心后, 加入适量不加血清之 α -MEM 制成细胞悬浮液, 并测细胞浓度。以不加血清之 α -MEM 稀释细胞浓度为 1×10^2 活细胞数/ ml。

3. 将1 ml 细胞悬浮液接种入6-well plate 中, 并另加入1 ml 含不同浓度的血清(20 % , 10 % , 4 % , 2 % , 1 % , 0.4 %) 之 α -MEM, 使血清最终浓度为10% , 5 % , 2 % , 1 % , 0.5 % , 0.2 %。用已测试过之血清同时进行对照组试验。

4. 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱培养5-7 天, 期间不需更换培养基, 待细胞群落大到可以肉眼观察, 而群落间不互相接触即可。

5. 去除培养基, 加入1 ml Carnoy' s 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), 室温下静置10 min。

6. 去除固定液, 水洗二次。

7. 加入1 ml 10 % Giemsa solution, , 室温下静置染色2-3 min。

8. 去除染液, 水洗二次。

9. 以肉眼计数群落数

10. 计算SPE (Serum Plating Efficiency):

$$\text{SPE} = (\text{no. of colonies} / \text{well}) / 100 \times 100 \%$$

11. 计算RPE(Relative Plating Efficiency):

$$\text{RPE} = [\text{total colonies of six well (test)} / \text{Total colonies of six well (control)}] \times 100 \%$$

比较各浓度血清培养基之RPE, 即可得知待测血清对细胞生长的影响。订购多量同一批号的优良血清, 置于 - 70°C 保存之

基础篇-细胞传代培养

1. 细胞生长至高密度时，即须分殖至新的培养瓶中，一般稀释比例为1:3 至 1:6，依细胞种类而异。

2. 材料：

2.1. 无菌磷酸生理缓冲液 (Dulbecco' s phosphate-buffered saline, Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ free, D-PBS, GibcoBRL 21600-010)

2.2. trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin-0.53mM EDTA-4Na, GibcoBRL 25300-062)：

以10 ml 分装于15 ml 无菌离心管中，保存于 - 20℃，使用前放在37℃ 水槽回温。

2.3. 新鲜培养基

2.4. 无菌吸管/离心管/培养瓶

3. 步骤：

3.1. 附着型胞 (adherent cell)

3.1.1. 吸掉旧培养液。

3.1.2. 用D-PBS 洗涤细胞一至二次。

3.1.3. 加入trypsin-EDTA 溶液(1ml/25cm², 2ml/75cm²), 37 °C作用数分钟, 于倒立显微镜下观察, 当细胞将要分离而呈现圆粒状时, 吸掉trypsin-EDTA 溶液。(若不移去trypsin-EDTA, 则在trypsin-EDTA 作用后, 加入适量含血清之新鲜培养基终止trypsin 作用, 离心后再吸掉上清液。)

3.1.4. 轻拍培养瓶使细胞自瓶壁脱落, 加入适量之新鲜培养基, 以吸管上下吸放数次以打散细胞团块, 混和均匀后, 依稀释比例转移至新的培养瓶中, 以正常培养条件培养。

3.2. 悬浮型细胞 (suspension cell)

3.2.1. 吸出细胞培养液，放入离心管中，离心1000 rpm 5 分钟。

3.2.2. 吸掉上清液，加入适量之新鲜培养基，混和均匀后，依稀释比例转移至新的培养瓶中，以正常培养条件培养。

3.3. 融合瘤 (hybridoma)

3.3.1. 有些hybridoma cell 需培养三天以上才会产生抗体，若是更换培养基，则可能会失去抗体。因此继代培养不需离心后更换培养基，直接添加新鲜培养基稀释细胞浓度即可。若体积太大，可倾斜放置，或分殖至新培养瓶中。

基础篇-细胞冷冻保存 (一)

1. 注意事项:

1.1. 欲冷冻保存之细胞应在生长良好(log phase) 且存活率高之状态, 约为80 - 90 %致密度。

1.2. 冷冻前检测细胞是否仍保有其特有性质, 例如hybridoma应在冷冻保存前一至二日测试是否有抗体之产生。

1.3. 注意冷冻保护剂之品质。DMSO 应为试剂级等级, 无菌且无色(以0.22 micronFGLP Telflon 过滤或是直接购买无菌产品, 如Sigma D-2650), 以5~10 ml 小体积分装, 4°C避光保存, 勿作多次解冻。Glycerol 亦应为试剂级等级, 以高压蒸汽灭菌后避光保存。在开启后一年内使用, 因长期储存后对细胞会有毒性。

1.4. 冷冻保存之细胞浓度:

- 1.4.1. normal human fibroblast: $1 \sim 3 \times 10^6$ cells/ml
- 1.4.2. hybridoma: $1 \sim 3 \times 10^6$ cells/ml, 细胞浓度不要太高, 某些hybridoma 会因冷冻浓度太高而在解冻24 小时后死去。
- 1.4.3. adherent tumor lines: $5 \sim 7 \times 10^6$, 依细胞种类而异。Adenocarcinoma 解冻后须较高之浓度, 而HeLa 只需 $1-3 \times 10^6$ cells/ml。
- 1.4.4. other suspensions: $5 \sim 10 \times 10^6$ cells/ml, human lymphocyte 须至少 5×10^6 cells/ml。

1.5. 冷冻保护剂浓度为5 或10 % DMSO, 若是不确定细胞之冷冻条件, 在做冷冻保存之同时, 亦应作一个backup culture, 以防止冷冻失败。

1.6. 冷冻方法:

1.6.1. 传统方法: 4°C 10 分钟 \longrightarrow -20°C 30 分钟 \longrightarrow -80°C 16 - 18 小时 (或隔夜) \longrightarrow 液氮槽 vapor phase 长期储存。

1.6.2. 程序降温: 利用等速降温机以 $-1 \sim -3^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 之速度由室温降至 -120°C , 放在液氮槽 vapor phase 长期储存。适用于悬浮型细胞与hybridoma 之保存。

基础篇-细胞冷冻保存 (二)

2. 材料:

2.1. 生长良好之培养细胞

2.2. 新鲜培养基

2.3. DMSO (Sigma D-2650)

2.4. 无菌塑料冷冻保存管 (Nalgene 5000-0020)

2.5. 0.4 % w/v trypan blue (GibcoBRL 15250-061)

2.6. 血球计数盘与盖玻片

2.7. 等速降温机 (KRYO 10 Series II)

3. 步骤:

3.1. 冷冻前一日前更换半量或全量培养基，观察细胞生长情形。

3.2. 配制冷冻保存溶液(使用前配制): 将DMSO 加入新鲜培养基中，最后浓度为5-10%，混合均匀，置于室温下待用。

3.3. 依细胞继代培养之操作，收集培养之细胞，取少量细胞悬浮液(约0.1 ml) 计数细胞浓度及冻前存活率。

3.4. 离心，去除上清液，加入适量冷冻保存溶液，使细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ cells/ml，混合均匀，分装于已标示完全之冷冻保存管中，1 ml/vial，并取少量细胞悬浮液作污染检测。

3.5. 冷冻保存方法1: 冷冻管置于 4°C 10 分钟 $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ 30 分钟 $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ 16~18 小时(或隔夜) \rightarrow 液氮槽vapor phase 长期储存。

3.6. 冷冻保存方法2: 冷冻管置于已设定程序之等速降温机中，再放入液氮槽中。程序为: program 7: HB CELL

基础篇-冷冻细胞活化

1. 冷冻细胞之活化原则为快速解冻，以避免冰晶重新结晶而对细胞造成伤害，导致细胞之死亡。
2. 细胞活化后，约需数日，或继代一至二代，其细胞生长或特性表现才会恢复正常（例如产生单株抗体或是其它蛋白质）。
3. 材料
37℃ 恒温水，新鲜培养基，无菌吸管 / 离心管 / 培养瓶，液氮或干冰容器

4. 步骤:

4.1 操作人员应戴防护面罩及手套，防止冷冻管可能爆裂之伤害。

4.2 自液氮或干冰容器中取出冷冻管，检查盖子是否旋紧，由于热胀冷缩过程，此时盖子易松掉。

4.3 将新鲜培养基置于37 ° C 水槽中回温，回温后喷以70 % 酒精并擦拭之，移入无菌操作台内。

4.4 取出冷冻管，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，以70 % ethanol 擦拭保存管外部，移入无菌操作台内。

4.5 取出0.9 ml 解冻之细胞悬浮液，缓缓加入有培养基之培养容器内(稀释比例1:10~1:15)，混合均匀，放入CO₂ 培养箱培养。另取0.1 ml 解冻细胞悬浮液作存活测试。

4.6 解冻后是否立即去除冷冻保护剂(例如DMSO 或 glycerol)，依细胞种类而异，一般而言，大都不需要立即去除冷冻保护剂。惟若要立即去除，则将解冻之细胞悬浮液加入含有5-10 ml 培养基之离心管内，离心1,000 rpm, 5 分钟，移去上清液，加入新鲜培养基，混合均匀，放入CO₂ 培养箱培养。

4.7 若不需立即去除冷冻保存剂，则在解冻培养后隔日更换培养基。

基础篇-收到细胞的处理方式 (一)

1. 收到细胞株包裹时，请检查细胞株冷冻管是否有解冻情形，若有请立即通知。细胞株请尽速开始培养，或立即冷冻保存(置于 -70°C ，隔夜后，移到液氮)。

2. 冷冻细胞解冻程序：

2.1. 依据细胞株数据单指定之基础培养基种类、血清种类和其它指定之成份和比例，制备培养基。绝大多数之细胞均无法立即适应不同之基础培养基或不同之血清种类，若因实验需要，必须有所不同时，务必以缓慢比例渐次改变培养基组成，确定细胞适应后，方进行所需之实验。

2.2. FBS (fetal bovine serum, 胚牛血清), CS (calf serum, 小牛血清)和HS (horse serum, 马血清), 对细胞而言差异极大, 请务必依据细胞株资料单指

2.3. 将培养基置于37 ° C 水槽中回温，回温后喷以70 % 酒精并擦拭之，移入无菌操作台内。取出冷冻管，立即放入37 ° C 水槽中快速解冻，水面高度不可接近或高过冷冻管之盖沿，否则易发生污染。轻摇冷冻管使其在1 分钟内全部融化后，以70 % ethanol 擦拭冷冻管外部，移入无菌操作台内。

2.4. 依据细胞种类和浓度，于无菌操作台内取10 ml 培养基加至T25 或T75 flask中。取出已解冻之细胞悬浮液，缓缓加入T25 或T75 flask 内之培养基，混合均匀，放入37 ° C, 5 % CO₂ 培养箱培养。

2.5. 对绝大多数细胞而言，1 % 以下之冷冻保护剂DMSO，不会对细胞之贴附或活化有不良影响，不需立刻由解冻细胞中去除，待第二天确定细胞生长或贴附良好后再去除即可。惟对极少数因对DMSO 敏感或会造成细胞分化之细胞，需立即去除DMSO 者，则可将解冻后之细胞悬浮液放入5 - 10 ml 培养基中，离心300 xg (约1000 rpm)，5 分钟，小心移去上清液，加入适量新鲜培养基，将细胞均匀混合后，转移至培养瓶中，再放入37 ° C, 5 % CO₂ 培养箱培养。

基础篇-收到细胞的处理方式（二）

- 收到T25 flask 细胞时， 处理方式为：
 1. 于寄送过程中， 为避免起泡造成细胞脱落死亡， T25 flask 均加满培养基。请检查flask 外观，并于显微镜下观察细胞生长状况和有无污染现象，若有任何问题， 不要打开盖子，请立即通知细胞实验室。
 2. 将原封之T25 flask 静置于37 ° C， 5 % CO₂ 培养箱中，使细胞回温至37 ° C， 并让运送过程中少数脱落的细胞可再附着生长。隔天后，于无菌操作箱内取出flask内之培养基，（取出之培养基可以再使用），仅留约5-10ml 培养基于flask 内，依一般培养方式再将细胞置入培养箱中，或细胞已长满盘， 则将细胞做传代培养。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/148074105043006137>