

细胞培养常见问题

1. 如何选择培养基？

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，各种目的无血清培养的首选是 AIM V 培养基（SFM）。

2. 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。在进行免疫学研究、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。

3. 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确定。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。

4. 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 L-谷氨酰胺的衍生物，将其不稳定的 α -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。

5. 为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。

6. 如何用台盼兰计数活细胞？

用无血清培养基把细胞悬液稀释到 200-2000 个/毫升，在 0.1 毫升的细胞中加入 0.1 毫升的 0.4% 的台盼兰溶液。轻轻混匀，数分钟后，用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼兰，因而染成蓝色的细胞是死细胞。

7. 如何消除组织培养的污染？

当重要的培养污染时，研究者可能试图消除或控制污染。首先，确定污染物是细菌、真菌、支原体或酵母，把污染细胞与其它细胞系隔离开，用实验室消毒剂消毒培养器皿和超净台，检查 HEPA 过滤器。高浓度的抗生素和抗霉菌素可能对一些细胞系有毒性，因而，做剂量反应实验确定抗生素和抗霉菌素产生毒性的剂量水平。这点在使用抗生素如两性霉素 B 和抗霉菌素如泰乐菌素时尤其重要。下面是推荐的确定毒性水平和消除培养污染的实验步骤。

1) 在无抗生素的培养基中消化、计数和稀释细胞，稀释到常规细胞传代的浓度。

2) 分散细胞悬液到多孔培养板中，或几个小培养瓶中。在一个浓度梯度范围内，把选择抗生素加入到每一个孔中。例如，两性霉素 B 推荐下列浓度，0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml。

3) 每天观测细胞毒性指标，如脱落，出现空泡，汇合度下降和变圆。

4) 确定抗生素毒性水平后，使用低于毒性浓度 2-3 倍浓度的抗生素的培养液培养细胞 2-3 代。

5) 在无抗生素的培养基中培养细胞一代。

6) 重复步骤 4。

7) 在无抗生素的培养基中培养 4-6 代，确定污染是否已被消除。

8. 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。

9. Hank's 平衡盐溶液(HBS)要在空气中使用，不需要 CO2 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，碳酸氢钠的含量在 Eagles (2.2g/L) 中比在 Hanks (0.35g/L) 中高。碳酸氢钠需用高水平的 CO2 平衡，以维持溶液的 PH 值。Eagles 液在空气水平的 CO2 中，溶液会变碱，Hanks 液在 CO2 培养箱中会变酸。如果希望在 CO2 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。

10. Qualified 和 Certified 胎牛血清有什么差别？

Certified 胎牛血清包括了 Qualified 胎牛血清执行的所有的标准检验程序，而且除了这些标准检测，Certified 胎牛血清还有如下一些附加的检测：

End-Point Determination of Endotoxin Content

噬菌体检验

生物化学检测

激素的检测

血红蛋白检测

Sf9 细胞生长促进及方法学检测

11. 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 用来螯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。

12. 制备 lipid-DNA 的方法会影响转染效率吗？

是的。对于 LIPOFECTAMINE Reagent，稀释试剂在 100 μ l OPTI-MEM 中，稀释 DNA 在 100 μ l OPTI-MEM 中。混合两种溶液在室温下孵育 15 分钟。对于 LIPOFECTIN Reagent，在加入 DNA 溶液前允许稀释的试剂和培养基孵育至少 30 分钟可以增加 3 倍的效率。确保复合物在没有血清的情况下形成。孵育 15 分钟后，在复合物中加入含有血清的培养基（800 μ l）。（注意以上是 35mm 培养皿使用体积）。对于 LIPOFECTAMINE Plus Reagent DNA 应该在与脂质体混合之前首先与 Plus Reagent 混合。LIPOFECTAMINE 2000 的操作步骤允许在一个很

小的体积下混合 DNA 和脂质体，接下来可以不需要换培养基的情况下直接加入。

13. 我使用 SF900 II 时，细胞生长良好，但是为什么我的蛋白产物不如使用 Graces 液和 10%胎牛血清时效果好？

如果目的蛋白是一个后期蛋白，它将与蛋白酶一起表达，这些蛋白酶将会作用于目的蛋白。在加有血清的培养基中，这些蛋白酶将作用到血清中的蛋白，从而使目的蛋白产品保持完好。在无血清配方中，蛋白酶作用的唯一底物是你的目的蛋白。为了避免这一问题，加入一些蛋白酶抑制剂或加入少量的血清（少于 1%），让血清给蛋白酶提供作用底物。

14. 如何检测内毒素(热源)水平？

LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 试验是可用的最敏感和特异的检测细菌内毒素的方法。Levin 和 Bang 发现细菌可引起鲎 (Limulus polyphemus) 血管内的凝集作用。内毒素启动一个细胞内酶原系统 (丝氨酸蛋白酶级联反应系统)，通过修饰凝集素，产生一种透明的胶，LAL 中的凝固蛋白，从而，形成不可溶的基质。LAL 试剂缓冲的鲎 (血细胞) 裂解物。

胎牛血清的内毒素检测是在 Grand Island，按照手册上 Gel-clot 方法进行的。在对血清产品进行内毒素检测前，用无热源的水 1: 10 稀释样品。稀释样品沸水育 5 分钟，以消除抑制剂。(通常，血液中

的内毒素结合成份的出现会抑制凝胶过程，使内毒素不能与 LAL 反应。样品预先热处理可以消除这种抑制作用。)

15. 我可以使用固体形式的 Murashige Skog 培养基吗？

如果使用固体形式的培养基，需要加入琼脂。琼脂加入前要先灭菌。应该避免 MS 培养基的直接灭菌，应该高压灭菌琼脂溶液，然后把融化的琼脂溶液加入到 MS 培养基中。

16. 20℃下配制的缓冲液，在较高或较低的温度下 PH 值会改变吗？

对于普通使用的缓冲液，PH 值随温度变化而变化。

下表列出温度改变 10℃时，PH 值的变化情况

例如 20℃下配制 PH7.4 Tris 缓冲液, 40℃时 PH 值为 $7.4 - (2 \times 0.310) = 6.78$

17. 室温下(25℃)配制的 Tris-HCl 溶液，在 37℃使用时 PH 值是多少？

缓冲液的 PH 值随温度变化而变化。下表列出了 50mM Tris-HC 溶液在 4℃，25℃，37℃时，不同的 PH 值。

- 4° C 25° C 37° C
- 8.1 7.5 7.2
- 8.2 7.6 7.3

- 8.3 7.7 7.4
- 8.4 7.8 7.5
- 8.5 7.9 7.6
- 8.6 8.0 7.7
- 8.7 8.1 7.8
- 8.8 8.2 7.9
- 8.9 8.3 8.0
- 9.0 8.4 8.1
- 9.1 8.5 8.2
- 9.2 8.6 8.3
- 9.3 8.7 8.4
- 9.4 8.8 8.5

18. 昆虫细胞培养的最适 PH 值和渗透压是多少？

生长培养基的 PH 值对细胞的增值和病毒或重组蛋白的生产均会产生影响。对于大部分鳞翅类昆虫细胞系，在 PH 值 6.0-6.4 范围的大部分应用效果良好。培养鳞翅类昆虫细胞系时，培养基的最适渗透压是 345-380mOsm/kg.。为保证可靠和持久的细胞培养方式，减少技术问题，保持 PH 值和渗透压在以上所列的范围之内。

19. High Five 细胞有任何其它名称吗？

High Five 细胞也被称为 Trichoplasia ni 5B1-4 和 BTI-TN-5B1-4。

20. 在 High Five 无血清培养基中去污剂的浓度是多少？

High Five 无血清培养基中去污剂的浓度：0.025 g/L Tween-80，1.0 g/L Pluronic Poly-all。

21. High Five 细胞用多大的密度冻存？

3.0x10E6 cells/ml

22. 在我的果蝇培养基中发现形成白色沉淀，加热后溶解。它是什么？对我的细胞有害吗？

可能是谷氨酰胺沉淀，但是更可能是 L-酪氨酸沉淀。培养基中谷氨酰胺的浓度比典型的 2mM 高 6 倍。酪氨酸的浓度比在 RPMI 1640 中高 25 倍，而且比谷氨酰胺更加难以溶解。沉淀也可能是不止一种成分的复合物。它可能是由于贮存在局部温度较低的地方引起。只要沉淀在培养条件下可以溶解，对实验不会有不利的影响。

23. 如何从 T25 瓶中转移 sf9 细胞？能用胰蛋白酶消化吗？

我们强力推荐使用脱落细胞的方法，因为这项技术破坏性最小，生命力最高。通过使用巴氏德吸液管，让细胞上培养基流动。作为一种选择你也可以轻轻拍打培养瓶。只有在绝对必要的情况下，才使用胰酶消化细胞。

胰酶消化一个 T25 瓶的 sf9 细胞：

- 1) 去除培养基。
- 2) 用 2ml 1xPBS（足以覆盖细胞表面）洗涤细胞，去除 PBS。
- 3) 加入 2ml 1x 胰酶 EDTA（恰好覆盖细胞表面）。
- 4) 37 °C 孵育 5 到 10 分钟。在仪器下检测看到 5 分钟后它们正在向上移动。
- 5) 向细胞中加入 2ml 细胞培养液，移入锥形管，用 2ml 培养液洗瓶壁，移入同一锥形管中。（培养基中的 FBS 终止了胰酶的活性。）
- 6) 离心（1100rpm）沉淀细胞。去除培养基。
- 7) 用新的培养基重新悬浮细胞。传代。

24. 在 Sf9, Sf21, 和 high Five 细胞悬浮培养时，肝素的使用量是多少？

为了防止悬浮培养细胞聚集的形成，使用肝素浓度为 10 单位/毫升细胞悬液。

25. 如何评估 ES 细胞合格的胎牛血清？

使用 D3 ES 细胞。这是一个对于胎牛血清中生长促进、生长抑制和分化因子非常敏感的细胞系。相关生长效率分析：

当 ES 细胞以非常低的密度传入包含 10% 胎牛血清的生长培养基中，检测开始和支持 ES 细胞克隆的能力。

细胞毒分析：

当以非常低的密度传入包含 30%胎牛血清的生长培养基中，检测 ES 细胞和 feeder 细胞的生长能力。

相关形态学和分化分析：

检测胎牛血清支持未分化 ES 细胞克隆的能力。通过碱性磷酸酶活性评估分化程度。未分化的 ES 细胞小颜色深红粉红，分化的细胞较大，丰满，颜色较浅。

所有的分析在没有 ESGRO 的情况下进行的，培养基中出现 ESGRO 会掩盖由胎牛血清所导致的问题。（ESGRO 或 LIF 经常用来保持 ES 细胞处于未分化状态。）

经过培养发现，大约 8 批中有 1 批可以用来培养 ES 细胞。

26. 在重新冻存 sf9 细胞前，它可以传多少代？随着传代的次数的增加，它的感染能力会降低吗？

通常情况当细胞经过 30 次传代后，应该返回冻存。无论什么时候计数时，都应该检查细胞活力。如果超过 95%的细胞保持有活力和在大约 30 小时左右加倍，细胞仍然可以使用。如果活力和加倍时间下降，它们的感染力将不是有效的。