

实用哺乳动物细胞培养手册



细胞培养基本概念

细胞培养是指从体内组织取出细胞在体外模拟体内环境下,使其生长繁殖,并维持其结构和功能的一种培养技术。细胞培养的培养物可以是单个细胞,也可以是细胞群。

细胞培养目的与用途

1、科学研究: 药物研究与开发与基础研究

药物研究与开发

- (1) 新药筛选: 如化学合成药物药效研究、中药有效成分筛选与鉴定等。
- (2) 疫苗研究与开发: 如病毒性疫苗的研究与开发(肝炎病毒疫苗、艾滋病疫苗等)、肿瘤疫苗(多肽疫苗)等。
- (3) 基因工程药物研究与开发: 如干扰素研究与开发, 细胞生长因子研究与开发等。
- (4) 细胞工程药物研究与开发: 生物活性多肽研究与开发, 人参皂甙、紫杉醇等生物活性成分研究与开发。
- (5) 单克隆抗体制备: 包括诊断用单克隆抗体, 治疗用单克隆抗体。

基础研究

- (1) 药物作用机理
- (2) 基因功能
- (3) 疾病发生机理

2、生物制药

- (1) 疫苗生产: 如病毒性疫苗(肝炎病毒疫苗、艾滋病疫苗等)、肿瘤疫苗(多肽疫苗)等。
- (2) 基因工程药物生产: 如在临床医学中具有治疗价值的一些细胞生长因子如干扰素、粒细胞生长因子、胸腺肽等
- (3) 诊断用和药用单克隆抗体生产
- (4) 细胞工程药物生产: 生物细胞内的一些生物活性多肽, 生物活性物质等

细胞培养基本条件

1、合适的细胞培养基

合适的细胞培养基是体外细胞生长增殖的最重要的条件之一,培养基不仅提供细胞营养和促使细胞生长增殖的基础物质,而且还提供培养细胞生长和繁殖的生存环境。

2、优质血清

目前,大多数合成培养基都需要添加血清。血清是细胞培养液中最重要成分之一,含有细胞生长所需的多种生长因子及其它营养成分。

3、无菌无毒细胞培养环境

无菌无毒的操作环境和培养环境是保证细胞在体外培养成功的首要条件。在体外培养的细胞由于缺乏对微生物和有毒物的防御能力，一旦被微生物或有毒物质污染，或者自身代谢物质积累，可导致细胞中毒死亡。因此，在体外培养细胞时，必须保持细胞生存环境无菌无毒，及时清除细胞代谢产物。

4、恒定的细胞生长温度

维持培养细胞旺盛生长，必须有恒定适宜的温度。

5、合适的气体环境

气体是哺乳动物细胞培养生存必需条件之一，所需气体主要有氧气和二氧化碳。

细胞培养基种类与基本成分

细胞培养基的种类很多，按其来源分为合成培养基和天然培养基（目前使用的培养基绝大部分是合成培养基），按其物质状态分为干粉培养基和液体培养基两类。干粉培养基需由实验者自己配制并灭菌，液体培养基由专业商家提供，用户可直接使用，非常方便。每种细胞都有其合适的培养基，详见附表 1。

1、合成培养基的主要成分有：氨基酸、碳水化合物、无机盐、维生素及其它辅助物质

氨基酸

氨基酸是组成蛋白质的基本单位。不同种类的细胞对氨基酸的要求各异，但有几种氨基酸细胞自身不能合成，必须依靠培养液提供，这几种氨基酸称为必需氨基酸。其中谷氨酰胺是细胞合成核酸和蛋白质必需的氨基酸，在缺少谷氨酰胺时，细胞生长不良而死亡。因此，各种培养液中都有较大量的谷氨酰胺。但是，由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定，应置于-20℃冰箱中保存，在使用前加入培养液内。已含谷氨酰胺的培养液在 4℃冰箱中储存 2 周以上时，还应重新加入原来量的谷氨酰胺。

碳水化合物

碳水化合物是细胞生长主要能量来源，其中有的是合成蛋白质和核酸的成分。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸等。

无机盐

培养液中无机盐的主要功能是帮助细胞维持渗透压平衡。此外，通过提供钠，钾和钙离子，帮助细胞调节细胞膜功能。培养液的渗透压是一个非常重要的因素，细胞通常可耐受 260mOsm/kg -320 mOsm/kg。标准培养液的渗透压在此范围内波动。**特别注意：**向培养液中加入其它物质有可能会明显改变培养液的渗透压，特别是溶于强酸或强碱中的物质。向培养液中添加 HEPES 时需按以下方法调节钠离子浓度。

缓冲系统

大多数细胞所需 pH 在 7.2 - 7.4。但是，细胞培养最适 pH 值随培养的细胞种类不同而不同。成纤维细胞喜欢较高 pH (7.4 - 7.7)，而传代转化细胞系则需要偏酸 pH (7.0 - 7.4)。由于多数培养液靠碳酸氢钠 (NaHCO₃) 与 CO₂ 体系进行缓冲，因此，气相中的 CO₂ 浓度应与培养液中碳酸氢钠浓度相平衡。如果气相或培养箱空气中 CO₂ 浓度设定在 5%，培养

液中 NaHCO_3 的加入量为 1.97g/L；如果 CO_2 浓度维持在 10%，培养液中 NaHCO_3 的加入量为 3.95g/L。细胞培养瓶盖不应拧得太紧，以保证气体交换。

HEPES 是一种非离子缓冲液，在 pH 7.2 - 7.4 范围内具有较好的缓冲能力，但是非常昂贵，在高浓度时对一些细胞可能有毒。HEPES 缓冲液可与低水平的碳酸钠 (0.34g/L) 共用，以抵消因额外加入 HEPES 引起的渗透压增加。在这种培养条件下，细胞培养瓶的盖子应拧紧，以防止培养液中所需的少量碳酸盐散入空气中。大多数培养液中含有酚红作为 pH 指示剂，酸性培养液呈橙黄色，碱性培养液呈深红色。

维生素

在细胞培养中，尽管血清是维生素重要来源，但是许多培养基中添加了各种维生素以适合更多的细胞系生长。

其它成分

在一些较为复杂的培养液中还包括其它一些成分。如在杂交瘤技术中常用的 DMEM 培养液，使用时还需要补加丙酮酸钠和 2-巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol, 2-Me)。2-Me 对细胞生长有很重要的作用。有人认为它相当于胎牛血清，有直接刺激细胞增殖作用。2-Me 的活性部分是硫氢基，其中一个重要作用是使血清中含硫的化合物还原成谷胱甘肽，能诱导细胞的增殖，为非特异性的激活作用。同时避免过氧化物对培养细胞的损害。另一个重要作用是促进分裂原的反应和 DNA 合成，增加植物凝集素(PHA)对淋巴细胞的转化作用，已广泛应用于杂交瘤技术，另外，也开始用于一些难以培养的培养细胞。2-Me 是一种小分子还原剂，极易氧化。分子量为 78.13，纯的 2-Me 是一种无色有刺激味的液体，比重为 1.110-1.120(Do20)，常用终浓度为 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 。常配制成 0.1M 的储存液，用时每升培养液加 0.5ml。

液体培养基保存：

液体培养基应于 4℃ 冰箱避光保存，实验前放入 37℃ 预热。未加血清液体培养基有效期为 12 个月。液体培养基中的 L-谷氨酰胺会随着储存时间的延长而慢慢分解。如果细胞生长不良，可以再添加适量 L-谷氨酰胺。

干粉培养基保存：4℃ 冰箱避光保存，有效期 36 个月。

血清

细胞培养液中添加的血清有牛血清、马血清、人血清等，其中牛血清是最常用的血清，分为胎牛血清和新生小牛血清。胎牛血清是从母牛破腹取出的胎牛中分离出的血清，价格昂贵。新生小牛血清是从刚出生的尚未哺乳的小牛中分离出来的血清，如厂家能做到这一点，新生小牛血清的质量与胎牛血清的质量相差不大。如小牛出生后已哺乳，从这种小牛中取出的血清中可能含有较多的生物活性物质，其质量明显不如前两种。

血清的质量，种类及使用的浓度都有可能影响细胞的生长，而不同批次的血清支持细胞生长的能力也不同，尤其是对克隆细胞的生长，某些批次血清可能含有毒性或抑制细胞生长的物质。因此，在购买大量血清之前，必须对血清支持细胞生长能力进行检测，然后

再，然后大量购买质量好的同一批号的血清，并注意以下几点：

- (1) 需要长期保存的血清必须储存于 -20°C – 70°C 低温冰箱中。 4°C 冰箱中保存时间切勿超过1个月。由于血清结冰时体积会增加约10%，因此，血清在冻入低温冰箱前，必须预留一定体积空间，否则易发生污染或玻璃瓶冻裂。
- (2) 一般厂商提供的血清为无菌，无需再过滤除菌。如发现血清有悬浮物，则可将血清加入培养液内一起过滤，切勿直接过滤血清。
- (3) 瓶装血清解冻需采用逐步解冻法： -20°C 至 -70°C 低温冰箱中的血清放入 4°C 冰箱中溶解1天。然后移入室温，待全部溶解后再分装。在溶解过程中需不断轻轻摇晃均匀（小心勿造成气泡），使温度与成分均一，减少沉淀的发生。切勿直接将血清从 -20°C 进入 37°C 解冻，这样因温度改变太大，容易造成蛋白质凝集而出现沉淀。
- (4) 热灭活是指 56°C , 30 分钟加热已完全解冻的血清。加热过程中须规则摇晃均匀。此热处理的目的是使血清中的补体成分（complement）灭活。除非必须，一般不建议作此热处理，因为热处理会造成血清沉淀物显著增多，而且还会影响血清的质量。补体参与反应有：细胞毒作用，平滑肌细胞收缩，肥大细胞和血小板释放组胺，增强吞噬作用，促进淋巴细胞和巨噬细胞发生化学趋化和活化。
- (5) 切勿将血清在 37°C 放置太久，否则血清会变得浑浊，同时血清中的有效成分会破会而影响血清质量。
- (6) 血清中的沉淀物

絮状物：主要是血清中的脂蛋白变性及解冻后血清中纤维蛋白造成，这些絮状物不会影响血清本身的质量。可用离心 3000rpm, 5 分钟去除，也可不用处理。

显微镜下“小黑点”：经过热处理过的血清，沉淀物的形成会显著增多。有些沉淀物在显微镜下观察象“小黑点”，常误认为血清受污染。一般情况下，此小黑点不会影响细胞生长，但如果怀疑血清质量，则应立即停止使用，更换另一批号的血清。

细胞培养环境

1、实验室设计

细胞培养是一种无菌操作技术，要求工作环境和条件必须保证无微生物污染和不受其它有害因素的影响。细胞培养室和设计原则是防止微生物污染和有害因素影响，要求工作环境清洁、空气清新，干燥和无烟尘。细胞培养室的设计原则一般是无菌操作区设在室内较少走动的内侧，常规操作和封闭培养于一室，而洗刷消毒在另一室。

2、常用设施及设备

- (1) 超净工作台：也称净化工作台，分为侧流式、直流式和外流式三大类。
- (2) 无菌操作间：一般由更衣间、缓冲间和操作间三部分组成。操作间放置净化工作台及二氧化碳培养箱、离心机、倒置显微镜等。缓冲间可放置电冰箱、冷藏器及消毒好的无菌物品等。

(3) 操作间：普通培养箱、离心机、水浴锅、定时钟、普通天平及日常分析处理物

(4) 洗刷消毒间：烤箱、消毒锅、蒸馏水处理器及酸缸等。

(5) 分析间：显微镜、计算机及打印机等。

3、培养器皿

常用细胞培养器皿有培养瓶、培养板、培养皿等。常准备量是使用量的三倍。器皿应选择透明度好、无毒、利于细胞粘附和生长的材料，常用一次性聚苯乙烯材料制品或中性硬度玻璃制品。常用的器皿有下面几种。

(1) 液体储存瓶：用于储存各种配制好的培养液、血清等液体，常用规格有 500ml、250ml、100ml 等几种。

(2) 培养瓶：根据培养细胞种类要求不同培养瓶的形态各异，用于细胞传代培养的细胞要求瓶壁厚薄均匀，便于细胞贴壁生长和观察，瓶口要大小一致，口径一般不小于 1cm，允许吸管伸入瓶内任何部位，规格有 200ml、100ml、50ml、25ml、10ml 等几种。

(3) 培养皿：用于开放式培养及其它用途。分直径 30mm、60mm、120mm 等几种。

(4) 吸管：常用的有长吸管和短吸管两类，长吸管也称刻度吸管。其改良后管上部有球型刻度称改良吸管，刻度吸管用于移动液体。常用 1ml 和 10ml 两种。短吸管也叫滴管，分弯头和直头两种。

(5) 离心管：离心管是细胞培养中使用最广泛的器皿，根据用途不同形态各异，常用于细胞培养的离心管有大腹式尖底离心管和普通尖底离心管两类。前者分别为 50ml、30ml、15ml；后者则多为 10ml 和 5ml。

(6) 其它：如三角烧瓶、烧杯、量筒、漏斗、注射器等。

4、细胞培养温度

维持培养细胞旺盛生长，必须有恒定而适宜的温度。不同种类的细胞对培养温度要求也不同。人体细胞培养的标准温度为 $36.5^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，偏离这一温度范围，细胞的正常代谢会受到影响，甚至死亡。培养细胞对低温的耐受力较对高温强，温度上升不超过 39°C 时，细胞代谢与温度成正比；人体细胞在 $39-40^{\circ}\text{C}$ 1 小时，即能受到一定损伤，但仍有可能恢复；在 $40-41^{\circ}\text{C}$ 1 小时，细胞会普遍受到损伤，仅小半数有可能恢复； $41-42^{\circ}\text{C}$ 1 小时，细胞受到严重损伤，大部分细胞死亡，个别细胞仍有恢复可能；当温度在 43°C 以上 1 小时，细胞全部死亡。相反，温度不低于 0°C 时，对细胞代谢虽有影响，但并无伤害作用；把细胞放入 $25-35^{\circ}\text{C}$ 时，细胞仍能生存和生长，但速度减慢；放在 4°C 数小时后，再回到 37°C 培养，细胞仍能继续生长。细胞代谢随温度降低而减慢。当温度降至冰点以下时，细胞可因胞质结冰受损而死亡。但是，如果向培养液中加入一定量的冷冻保护剂（二甲亚砜或甘油），可在深低温下如 -80°C 或 -196°C （液氮）长期保存。

5、合适的气体环境

气体是哺乳动物细胞培养生存必需条件之一，所需气体主要有氧气和二氧化碳。氧气参与三羧酸循环，产生供给细胞生长增殖的能量和合成细胞生长所需用的各种成分。开放培养时一般把细胞置于 95% 空气加 5% 二氧化碳混合气体环境中。二氧化碳既是细

胞代谢产物，也是细胞生长繁殖所需成分，它在细胞培养中的主要作用在于维持培养基的 pH 值。大多数细胞的适宜 pH 为 7.2-7.4，偏离这一范围对细胞培养将产生有害的影响。但细胞耐酸性比耐碱性大一些，在偏酸环境中更利于细胞生长。但有一些细胞也喜欢偏碱环境中生长，如成纤维细胞最适合 pH 是 7.4-7.6。每种细胞都有其最适 pH 值。

细胞培养无菌操作基本技术

无菌操作技术分为三个部分：工作环境及表面的处理，细胞培养所用玻璃及塑料制品的处理及培养液与培养细胞的处理。

工作环境的处理

使用层流超净工作台是最经济有效的手段。超净工作台正常工作时，向下的气流可阻挡外界空气污染物进入超净台。

- (1) 实验前，无菌室及无菌操作台用紫外灯照射 30-60 分钟灭菌，用 70% 酒精擦拭无菌操作台面，并开启无菌操作台风机运转 10 分钟后，才可开始实验操作。每次操作只处理一株细胞，以免造成细胞交叉污染。实验结束后，将实验物品带出工作台。如需要继续进行下一个实验，则用 70% 酒精擦拭无菌操作台面，再让无菌操作台风机运转 10 分钟后，才可进行下一个实验操作。
- (2) 无菌操作工作区域应保持清洁与宽敞，必要物品，如试管架、移液器或吸管头等可以暂时放置，其它实验用品用完后应及时移出，以利气体流通。实验用品要用 70%酒精擦拭后才能带入无菌操作台内。实验操作应在操作台中央无菌区域内进行，勿在边缘非无菌区域操作。
- (3) 小心取出无菌实验用品，避免造成污染。切勿碰触吸管与吸头头部或容器瓶口，不要在打开的容器正上方操作实验。容器打开后，用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在台面上。
- (4) 工作人员应注意自身的安全，必须穿戴实验衣与手套后才进行实验。对于来自人源性或病毒感染的细胞株应特别小心，并选择适当等级的无菌操作台（至少两级）。操作过程中，应避免引起气溶胶的产生，小心有毒性试剂，例如 DMSO 及 TPA 等，并避免尖锐物品伤人等。
- (5) 定期检查下列项目：CO₂ 钢瓶内的 CO₂ 压力；CO₂ 培养箱内的 CO₂ 浓度、温度、及水盘是否有污染；无菌操作台内气流压力是否正常，定期更换紫外灯管及 HEPA 过滤器滤膜，预滤网（300 小时/预滤网，3000 小时/HEPA）。

培养细胞生长过程：潜伏期→指数增生期→停滞期

潜伏期(latent phase)

细胞接种后,先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮期.此时,细胞质回缩,胞体呈球形.然后细胞贴附于载体表面,称贴壁,悬浮期结束.细胞贴壁速度与细胞种类,培养液成分,载体的理化性质等密切相关。一般情况下，原代培养细胞贴壁速度慢,可达 10-24 小

时或更多, 而传代细胞系贴壁速度快, 通常 10-30 分钟即可贴壁。细胞贴壁后还需经过一个潜伏阶段, 才进入生长和增殖期。原代培养细胞潜伏期长, 约 24-96 小时或更长, 连续细胞系和肿瘤细胞潜伏期短, 仅需 6-24 小时。

(2) 指数增生期(logarithmic growth phase)

这是细胞增殖最旺盛的阶段, 分裂相细胞增多。指数增生期细胞分裂相数量可作为判定细胞生长是否旺盛的一个重要标志。通常以细胞分裂相指数 (Mitotic index, MI) 表示, 即细胞群中每 1000 个细胞中的分裂相数。一般细胞的分裂指数介于 0.1%-0.5%, 原代细胞分裂指数较低, 而连续细胞和肿瘤细胞分裂相指数可高达 3%—5%。指数增生期的细胞活力最好时期, 是进行各种实验最佳时期, 也是冻存细胞的最好时机。在接种细胞数量适宜情况下, 指数增生期持续 3—5 天后, 随着细胞数量不断增多、生长空间减少, 最后细胞相互接触汇合成片。正常细胞相互接触后能抑制细胞运动, 这种现象称接触抑制现象(contact inhibition)。而恶性肿瘤细胞无接触抑制现象, 能继续移动和增殖, 导致细胞向三维空间扩展, 使细胞发生堆积 (piled up)。细胞接触汇合成片后, 虽然发生接触抑制, 但只要营养充分, 细胞仍能进行增殖分裂, 因此细胞数仍然在增多。但是, 当细胞密度进一步增大, 培养液中营养成分减少, 代谢产物增多时, 细胞因营养枯竭和代谢产物的影响, 导致细胞分裂停止, 这种现象称密度抑制现象 (Density Inhibition)。

(3) 停滞期(Stagnate phase)

细胞数量达到饱和密度后, 如不及时进行传代, 细胞就会停止增殖, 进入停滞期。此时细胞数持平, 故也称平台期 (Plateau phase)。停滞期细胞虽不增殖, 但仍有代谢活动。如不进行分离传代, 细胞会因培养液中营养耗尽、代谢产物积聚、pH 下降等因素中毒, 出现形态改变, 贴壁细胞会脱落, 严重的会发生死亡, 因此, 应及时传代。

培养细胞基本形态

培养细胞随贴附支持物形状不同而形态各异, 最常见的是贴附于平面支持物细胞。在一般光镜下生存中的细胞是均质而透明的, 结构不明显。细胞在生长期常有 1-2 个核仁。在细胞机能状态不良时, 细胞轮廓会增强, 反差增大。若胞质中时而出现颗粒、脱滴和腔泡等, 表明细胞代谢不良。

体外培养细胞根据它们在培养器皿是否能贴附于支持物上生长特征, 可分为贴附型生长和悬浮型生长两大类。贴附型细胞在培养时能贴附在支持物表面生长。如羊水细胞为贴附型细胞, 常表现为成纤维型细胞和上皮细胞生长。悬浮型细胞在培养中悬浮生长。

(1) 成纤维型细胞

在培养中的细胞凡形态与成纤维细胞类似时, 皆可称之为成纤维细胞。本型细胞由形态与体内成纤维细胞的形态相似而得名, 细胞在支持物表面呈梭形或不规则三角形生长, 细胞中央有卵圆形核, 胞质向外伸出 2-3 厘米个长短不同的突起, 除真正的成纤维细胞外, 凡由中胚层间质起源的组织细胞常呈本类形态生长。

(2) 上皮型细胞

此类型细胞在培养器皿支持物上生长具有扁平不规则多角形特征, 细胞中央有园形

核，细胞紧密相连单层膜样生长。起源于内、外胚层细胞如皮肤、表皮衍生物、消化管上皮等组织细胞培养时，皆呈上皮型形态生长。

(3) 游走型细胞

本型细胞在支持物上散在生长，一般不连成片。细胞质经常伸出伪足或突起，呈活跃的游走或变形运动，速度快且不规则。此型细胞不很稳定，有时亦难和其它型细胞区别。在一定的条件下，由于细胞密度增大联成片后，可呈类似多角型或成纤维细腻包形态。常见于羊水细胞培养的早期。

细胞培养所用玻璃及塑料制品的清洗与消毒

清洗

在组织细胞培养中，体外细胞对任何有害物质都非常敏感。微生物产品附带杂物，上次细胞残留物及非营养成分的化学物质，均能影响培养细胞的生长。因此对新使用玻璃器皿和重新使用的培养器皿都要严格彻底的清洗，且要根据器皿的组成材料不同，选择不同的清洗方法。

玻璃器皿的清洗

组织细胞培养中，使用量最大的是玻璃器皿，故工作最最大的是玻璃器皿的清洗。一般玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、浸酸和冲洗四个步骤。清洗后的玻璃器皿不仅要求干净透明无油迹，而且不能残留任何物质。

(1) 浸泡：初次使用和培养使用后的玻璃器皿均需先用清水浸泡，以使附着物软化或被溶液掉。新的初次使用的玻璃器皿，在生产及运输过程中，玻璃表面带有大量的干固的灰尘，且玻璃表面常呈碱性及带有一些对细胞有害的物质等。新瓶使用前应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸液浸泡过夜，以中和其中的碱性物质。再次使用的玻璃器皿则常附有大量刚使用过的蛋白质，干固后不易洗掉，故用后要立即浸入水中，且要求完全浸入，不能留有气泡或浮在液面上。

(2) 刷洗：浸泡后的玻璃器皿一般要用毛刷沾洗涤剂刷洗，以除去器皿表面附着较牢的杂质。刷洗要适度，过度会损害器皿表面光泽度。

(3) 浸酸：清洁液是由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水按一定比例配制而成，其处理过程称为浸酸。清洁液对玻璃器皿无腐蚀作用，而其强氧化作用可除掉刷洗不掉的微量杂质。清洁液去污能力很强。是清洗过程中关键的一环。浸泡时器皿要充满清洁液，勿留气泡或器皿露出清洁液面。浸泡时间一般为过夜，不应少于 6 小时。清洁液可根据需要，配制不同的强度，常用的下列三种：重铬酸钾 (g) 浓硫酸 (ml) 蒸馏水 (ml) (A) 强清洁液 63 : 1000 : 200000 (B) 次强清洗液 120 : 200 : 1000 (C) 弱清洁液 100 : 100 : 100。

清洁液配制时应注意安全，须穿戴耐酸手套和围裙，并要保护好面部及身体裸露部分。配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒搅拌，使产生的热量挥发，配制过程中可使重铬酸钾溶于水中，然后慢慢加浓硫酸。并不停的用玻璃棒搅拌，使产生的热量挥发，配制溶液应选择塑料制品。配成后清洁液一般为棕红色。

(4) 冲洗：玻璃器皿在使用后，刷洗及浸泡后都必须用水充分冲洗。使之尽量不留污染

或洁液的残迹。冲洗最好用洗涤装置。即省力、效果又好。如用手工操作，则需流水冲洗十次以上，每天水须灌满及倒干净，最好用蒸馏水清洗 3-5 次，晾干备用。

胶塞的清洗

细胞培养中所用的橡胶制品主要是瓶塞。新购置的瓶塞带有大量滑石粉及杂质，应先用自来水冲洗，再做常规处理，常规清洗方法是：每次用后立即置入水中浸泡，然后用 2% NaOH 或洗衣粉煮沸 10-20 分钟，以除掉培养中的蛋白质。自来水冲洗后，再用 1% 稀盐酸浸泡 30 分钟或蒸馏水冲洗后再煮沸 10-20 分钟，晾干备用。

塑料制品的清洗

塑料自制品现多是采用无毒并已经特殊处理的包装，打开包装即可用，多为一次性物品。必要时用 2% NaOH 浸泡过夜，用自来水充分冲洗，再用 5% 盐酸溶液浸泡 30 分钟，最后用自来水和蒸馏水冲洗干净，晾干备用。

消毒

细胞培养的最大危险是发生培养物的细菌，真菌和病毒等微生物的污染。污染主要是由于操作者的疏忽而引起，常见的原因有操作间或周围空间的不洁，培养器皿和培养液消毒不合格或不彻底。由于有关培养的每个环节的失误均能导致培养失败，故细胞培养的每个环节都应严格遵守操作常规，防止发生污染。

消毒方法分为三类：物理灭菌法（紫外线、湿热、干烤、过滤等），化学灭菌法（各种化学消毒剂）和抗生素。

(1) 紫外线消毒：用于空气，操作台表面和不能使用其它法进行消毒和培养器皿。紫外线直接照射方便、效果好，经一定的时间照射后，可以消灭空气中大部分细菌，培养室紫外线灯应距地面不超过 2.5 米，且消毒进物品不宜相互遮挡，照射不到的地方起不到消毒作用。紫外线可产生臭氧，污染空气，试剂及培养液都有不良影响，对人皮肤也有伤害，不宜近照射。

(2) 湿热消毒：即高压蒸气消毒，是一种使用最广泛、效果最好的消毒方法。湿热消毒时，消毒物品不能装得过满，以防止消毒器内气体阻塞而千百万危险，保证其内气体的流通。在加热升压之前，先要打开排气阀门排放消毒器内的冷空气，冷气空气排出后，关闭排气阀门，同时检验安全阀活动自如，继后开始升压，当达到所需压力时，开始记算消毒时间。消毒过程中，操作者不能离开工作岗位，要定时检查压力及安全，防止消毒及表皮意外事件发生。

常用物品消毒压力及时间：

培养液、平衡盐溶液及其它需要灭菌的液体：121℃, 15 磅, 20 分钟；

布类、玻璃制品、金属器械等物品：先 121℃, 15 磅, 20 分钟，然后在烘箱中烘干；

玻璃瓶：干热灭菌 170℃, 4 小时。

(3) 化学消毒法：最常见的是 70% 酒精及 1% 的新洁而灭，前者主要用于操作者的皮肤，操作台表面及无菌室内的壁面处理。后者则主要用器械的浸泡及皮肤和操作室壁面的擦拭消毒。化学消毒法操作简单、方便有效。

(4) 抗生素消毒：主要用于培养用液灭菌或预防培养物污染。

细胞培养常用物品

细胞培养基

目前，市场上可提供干粉培养基和液体培养基。干粉培养基需使用者自己配制并灭菌，其优点是价格便宜。缺点是配制过程繁琐，质量不易控制。液体培养基是由专业产家按标准规模化生产，不仅质量得到保证，而且使用十分方便。常用的培养基种类及其应用见下表：

培养基种类	应用细胞
RPMI -1640 (标准型)	主要用于悬浮细胞培养
DMEM-高糖 (标准型)	
DMEM-低糖 (标准型)	
I MDM	
McCoy's 5A	
M199	
F10	

血清

平衡盐液体

PBS (Phosphate-Buffered Salines)

DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines) 标准型

成分	含量 (g/L)
CaCl ₂ (anhyd.)(无水氯化钙)	0.10
KCl	0.20
KH ₂ PO ₄	0.20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10
NaCl	8.00
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.16

Hanks' 平衡盐溶液 (Hanks' Balanced Salt Solutions, HBSS)

成分	含量 (g/L)
CaCl ₂ (anhyd.)(无水氯化钙)	0.14
KCl	0.40
KH ₂ PO ₄	0.06
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10
NaCl	8.00
NaCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄	0.048
D-Glucose	1.00
Phenol Red	0.01

D-Hanks' 平衡盐溶液 (D-Hanks Balanced Salt Solutions, D-HBSS)

成分	含量 (g/L)
KCl	0.40
KH ₂ PO ₄	0.06
NaCl	8.00
NaCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄	0.048
D-Glucose	1.00
Phenol Red	0.01

消化液:

分离组织和分散细胞。常用的有胰蛋白酶和二乙胺四乙酸二钠(EDTA)两种溶液。可以单独使用，也可以混合使用。

(1) 胰蛋白酶溶液

胰蛋白酶（简称胰酶）是一种黄白色粉末，易潮解，应放置冷暗干燥处保存。目前应用的胰蛋白酶主要来自牛或猪的胰腺。胰酶的主要作用是使细胞间的蛋白质水解，使细胞相互离散。胰酶对细胞的分离作用与细胞的种类和细胞的特性有密切关系。一般来讲，胰酶浓度大、作用温度高、作用时间长，对细胞分离能力也大，但超过一定的限度会损伤细胞。胰酶溶液在 pH8.0，温度为 37℃时，作用能力最强。注意：钙离子、镁离子和血清蛋白的存在会降低胰酶活力。因此，胰酶溶液常用无 Ca²⁺、Mg²⁺的 D-Hanks' 平衡盐溶液配制成 0.25% 溶液。消化细胞时，加入一些血清或含血清的培养液，或胰蛋白酶抑制剂能终止胰蛋白酶对细胞的消化作用。

胰蛋白酶溶液配制:

- (1) 称取胰蛋白酶粉末置烧杯中，先用少许 D-Hanks 平衡盐溶液（pH7.2 左右）调成糊状，然后再补足 D-Hanks 平衡盐溶液，搅拌混匀，置室温 4 小时或冰箱过夜，并不断搅拌振荡；
- (2) 次日，先用滤纸粗滤，再进行过滤除菌，分装入瓶中，低温冰箱保存备用，常用浓度为 0.25% 或 0.125%。胰蛋白酶溶液偏酸，使用前可调用碳酸氢钠溶液调 pH 至 7.2 左右。

保存条件：配制好的胰蛋白酶溶液必须保存在 -20℃ 冰箱中，以免分解失效。

EDTA 4Na 溶液

EDTA 是一种化学螯合剂，对细胞有一定的离解作用，而且毒性小，价格低廉，使用方便。

常用工作液浓度为 0.02%。通常与 0.25% 的胰蛋白酶溶液按 1: 1 混合使用（混合液）。

注意：使用 EDTA 处理细胞后，一定要用 Hanks 液冲洗干净，因残留的 EDTA 会影响细胞生长。

EDTA 溶液配制：用无钙、镁的 D-HBSS 平衡盐溶液溶解后，高压蒸汽灭菌，分装成小瓶，室温或 4℃ 冰箱保存。

胰蛋白酶 - EDTA 4Na 溶液 (0.05%胰蛋白酶, 0.53mM EDTA 4Na)

0.5g 胰蛋白酶+0.2gEDTA 4Na+1L D-HBSS。 -20℃冰箱中保存。

pH 调整液

(1) NaHCO₃ 溶液

常用浓度为 7.5%。配制时用三蒸水溶解后, 过滤除菌, 分装, 4℃冰箱或室温保存。

当 pH 值超过后, 可用高压灭菌的 10%醋酸溶液或通入 CO₂ 气体方法调节。

(2) HEPES (分子量 238.31) 溶液

HEPES 使用终浓度一般为 10-50mM, 但通常配成 1M 储存液: 用 200ml 双蒸水溶解 47.6 克 HEPES, 用 1N NaOH 调节 pH 至 7.5-8.0; 然后过滤除菌, 分装小瓶, 室温或 4℃保存。

抗生素溶液

酚红:

大多数培养液中使用酚红作为 pH 指示剂。红色表示中性 pH, 黄色代表酸性 pH, 紫色表示碱性 pH。但是, 在一些特殊培养液中不含酚红, 因为已有一些研究表明: 酚红能模拟类固醇激素 (尤其是雌激素) 样作用。

丙酮酸钠:

是细胞液中细胞的另一种碳源。D-葡萄糖是细胞优选碳源, 但是当培养液中 D-葡萄糖耗尽时, 细胞可以代谢丙酮酸钠获取碳源。

抗生素

哺乳动物细胞冷冻保存

主要目的: (1) 保存种子细胞, 以便随时取用。这是保存细胞的最主要目的。

(2) 减少细胞被微生物污染的危险性。

(3) 减少细胞之间交叉污染的危险性。

(4) 减少细胞因传代培养而引起的遗传变异和形态改变。

(5) 避免有限细胞系出现衰老或恶性转化。

(6) 降低人力和物力。

冷冻保存要点: (1) 冷冻过程要缓慢。需要冷冻保存的细胞先在 4℃冰箱中放置 30—60 分钟; 然后转入 -20℃, 放置 30 分钟; 然后再转入 -80℃放置 16—18 小时 (或过夜); 最后放入液氮中长期保存。有条件的地方, 可用程控降温仪, 按每分钟 -1 到 -3℃速度降温, 一直到 -80℃以下, 然后直接放入液氮中长期保存。

(2) 冻存细胞必须处在对数生长期, 活力大于 90%, 无微生物污染。

(3) 细胞浓度控制在: 1×10^7 — 5×10^7 /ml。

(4) 使用高浓度血清或蛋白保护剂。一般情况下, 用于冷冻保存完全细胞生长培养液中血清浓度大于 20%。

(5) 使用合适的细胞冷冻保护剂, 以保护细胞在冷冻过程中免受冰晶破坏。目前, 最常用的冷冻保护剂是 DMSO (二甲基亚砷), 使用终浓度为 5—10%。但是, 有些细胞系不能用 DMSO 作为冷冻保护剂, 如人白血病细胞系 HL-60。因为, DMSO 能诱导 HL-60 细胞分化。在这种情况下, 可选用其它冷冻保护剂, 如甘油 (glycerol), 羟乙基淀粉等。

特别注意: (1) 细胞在冷冻过程中在 -20℃冰箱内放置时间不可超过 1 小时, 以防止冰晶过大而破坏细胞。也可跳过 -20℃这一步骤直接放入 -80℃冰箱中, 但这样做细胞存活率要低一些。

(2) DMSO 稀释时会释放大热量。因此, DMSO 不能直接加到细胞液中, 必须事先配制。

- (3) DMSO 必须是细胞培养级别的。新买的 DMSO 本身处于无菌状态，第一次开瓶后应立即少量分装于无菌试管或瓶中，4℃ 保存。避免反复冻融造成 DMSO 裂解产生有害物质。并可减少污染机会。如要过滤 DMSO，必须选用耐 DMSO 的尼龙滤膜。

细胞冷冻保存液主要成分： 冷冻保护剂，基础培养液，血清或蛋白。

常用细胞冷冻保存液： (1) 10%DMSO + 完全细胞生长培养液 (20%血清+基础培养液)
(2) 10%甘油 + 完全细胞生长培养液 (20%血清+基础培养液)

悬浮细胞冷冻保存操作程序 (液氮保存法)：

- (1) 取对数生长期细胞培养物，离心 200—400g 5 分钟。用

粘附 (贴壁) 细胞冷冻保存操作程序 (液氮保存法)：

- (1)

冷冻保存细胞的解冻与复苏要点： (1) 快速解冻。冻存细胞从液氮中取出后，应立即放入 37℃ 水浴中，轻轻摇动冷冻管，使其在 1 分钟内全部融化 (不要超过 3 分钟)。

(2) 解冻操作过程动作要轻。由于冷冻保存过的细胞变得非常脆弱，不仅解冻速度要快，而且动作要轻。一般情况下，解冻后的细胞可直接接种到含完全生长培养液的细胞培养瓶中直接进行培养 (1ml 冻存细胞液加入到 25—30ml 新鲜完全培养液中)，24 小时后再用新鲜完全培养替换旧培养液，以去除 DMSO。如果，细胞对冷冻保护剂特别敏感，那么，解冻后的细胞应先通过离心去除冷冻保护剂，然后再接种到含完全生长培养液的培养瓶中。

特别注意： (1) 解冻时务必注意安全，预防冷冻管爆裂。要带手套，用镊子将细胞冷冻管从液氮中取出，放入 37℃ 水浴中。切不可直接用手，以免冻伤。

- (2) 冷冻管在水浴中解冻时，液面不可超过冻存管盖面，否则，易发生污染。

解冻冷冻保存细胞的离心方法：

- (1) 从液氮中取出冻存的细胞，立即放入 37℃ 水浴中快速解冻。
(2) 将 1—2ml 冻存细胞液加入到 25ml 新鲜完全细胞生长培养液中，轻轻混匀。
(3) 用 80g 离心 2—3 分钟，弃上清液。
(4) 用完全生长培养液轻轻悬浮细胞团，并计数细胞。
(5) 接种细胞到培养瓶中，起始密度为 3×10^5 /ml。