



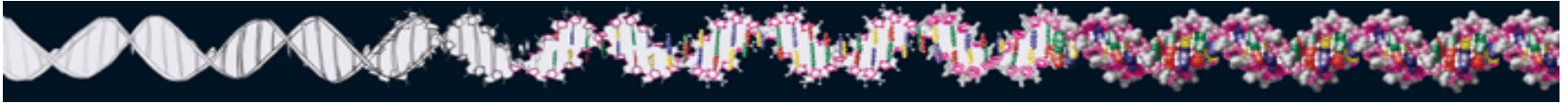
细胞培养基本技术



ustcwhm@ustc.edu.cn

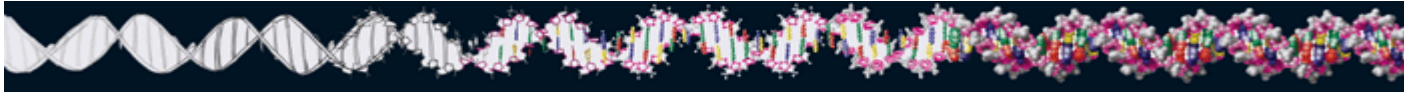
<http://ioi.ustc.edu.cn> → 在授课程 → 细胞生物学原理与技术 → PPT下载

无菌操作技术



体外培养细胞缺乏抗感染能力，所以防止污染是决定培养成功或失败的首要条件。即便使用设备完善的实验室，若实验者粗心大意，技术操作不规范，也会导致污染。因而，为在一切操作中最大可能地保证无菌，每一项工作都必须做到有条不紊和完全可靠。

Terms to remember :



消毒(disinfection)和消毒剂(disinfectant)

灭菌(sterilization)

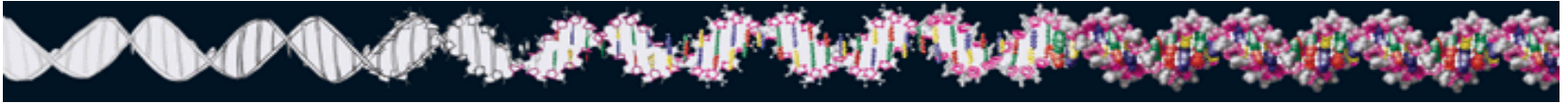
防腐(antisepsis)和防腐剂

抑菌(bacteriostasis)和抑菌剂(bacteriostatic)

无菌(asepsis)

无菌技术/无菌操作(antiseptic technique)

无菌操作技术



1. 工作环境及表面的处理
2. 细胞培养所用玻璃及塑料制品的处理
3. 实验者的操作技术
4. 培养液的处理

无菌技术概念

- 无菌技术
- 无菌区
- 非无菌区
- 相对无菌区
- 无菌物品
- 污染物品

是指未经处理或消毒
灭菌后又被碰脏的物
品。

【培养前准备】

在开始实验前要**制定好实验计划和操作程序**。有关数据的计算要事先做好。根据实验要求，准备各种所需器材和物品、清点无误后将其放置操作场所(培养室、超净台)内，然后开始消毒。这可以避免开始实验后，因物品不全往返拿取而增加污染机会。

1、实验时间与地点

2、实验目的

3、实验材料

4、实验方法

5、实验结果

6、结果分析与讨论

【操作野消毒】

无菌培养室每天都要用0.2%的新洁尔灭拖洗地面一次(拖布要专用)，紫外线照射消毒30-50min，超净工作台台面每次实验前要用75%酒精擦洗。然后紫外线消毒30min。在工作台面消毒时切勿将培养细胞和培养用液同时照射紫外线，消毒时工作台面上用品不要过多或重叠放置，否则会遮挡射线降低消毒效果。一些操作用具如移液器、废液缸、污物盒、试管架等用75%酒精擦洗后置于台内同时紫外线消毒。

【洗手和着装】

原则上和外科手术相同。平时仅做观察不做培养操作时，可穿着细胞培养室内紫外线照射30min的清洁工作服。在利用超净台工作时，因整个前臂要伸入箱内，应着长袖的清洁工作服，并于开始操作前要用75%酒精消毒手。如果实验过程中手触及可能污染的物品和出入培养室都要重新用消毒液洗手。进入原代培养室需彻底洗手还要戴口罩、着消毒衣帽。







【火焰消毒】

在无菌环境进行培养或做其它无菌工作时，首先要点燃酒精灯。以后一切操作，如按装吸管帽、打开或封闭瓶口等，都需在火焰近处并经过烧灼进行。

培养瓶



试管



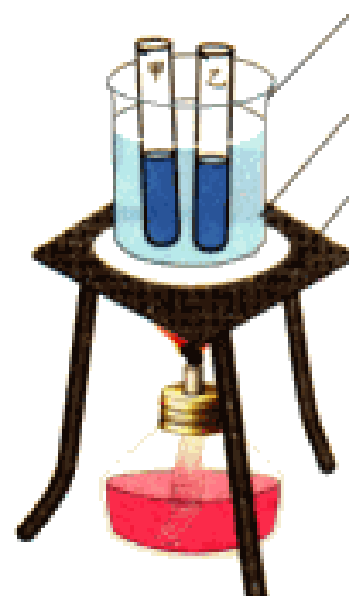
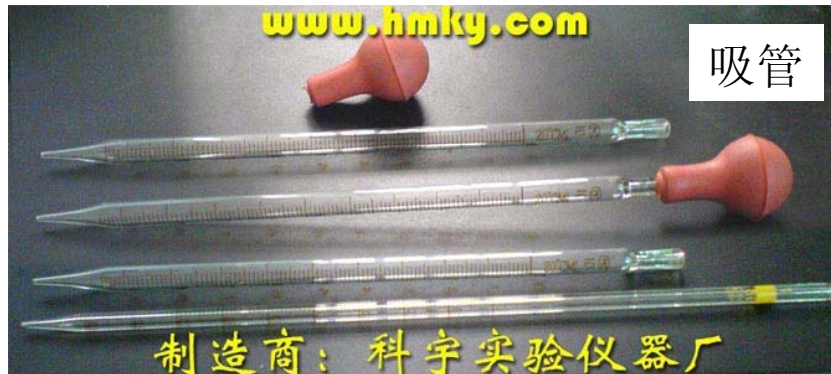
培养皿



滴管



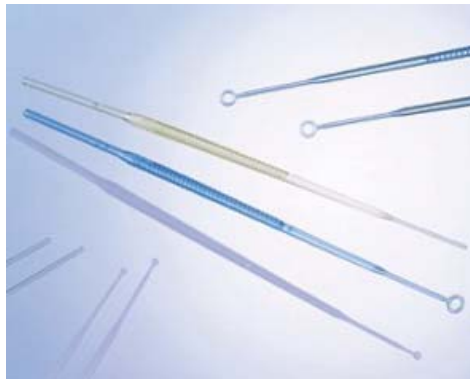
吸管



【操作】

进行培养时，动作要准确敏捷，但又不必太快，以防空气流动，增加污染机会。不能用手触及已消毒器皿，如已接触，要用火焰烧灼消毒或取备品更换。

接种环、接种针



L形涂布棒



培养细胞的观察



1. 肉眼观察培养物颜色及混浊度



体外培养细胞的常见问题



问题	可能原因	建议解决方法
培养液 pH 值变化太快	CO₂ 张力不对。 培养瓶盖拧得太紧。 NaHCO₃ 缓冲系统缓冲力不足。 培养液中盐浓度不正确 细菌、酵母或真菌污染	(1) 按培养液中 NaHCO₃ 浓度增加或减少培养箱内 CO₂ 浓度，2.0g/L 到 3.7g/L 浓度 NaHCO₃ 对应 CO₂ 浓度为 5% 到 10%。 (2) 改用不依赖 CO₂ 培养液。 松开瓶盖 1/4 圈。 加 HEPES 缓冲液至 10 到 25mM 终浓度。 在 CO₂ 培养环境中改用基于 Earle' s 盐配制的培养液，在大气培养环境中培养改用 Hanks 盐配制的培养液。 丢弃培养物。 或用抗生素除菌。
培养液出现沉淀，但 pH 值不变	用洗涤剂清洗后残留磷酸盐将培养基成分沉淀下来 冰冻保存培养液	用去离子水反复冲洗玻璃器皿，然后除菌。 将培养液加热到 37℃，摇动使其溶解如沉淀仍然存在，丢弃培养液。

培养液出现沉淀，同时pH发生变化	细菌或真菌污染	丢弃培养物。 或用抗生素除菌。
培养细胞不贴壁	胰蛋白酶消化过度 支原体污染 培养液中无贴壁因子	缩短胰蛋白酶消化时间或降低胰蛋白酶浓度。 分离培养物，检测支原体。清洁支架和培养箱。如发现支原体污染，丢弃培养物。
悬浮细胞成簇	培养液中含钙、镁离子 支原体污染 蛋白酶过度消化使得细胞裂解释放DNA	用无钙镁平衡盐溶液洗涤细胞，轻轻吹吸细胞获得单细胞悬液。 分离培养物，检测支原体。如发现支原体污染，丢弃培养物。 用 DNase I 处理细胞。
原代细胞培养物污染	原代培养组织在进入培养前已污染	培养前用含高浓度抗生素的平衡盐溶液反复冲洗组织。

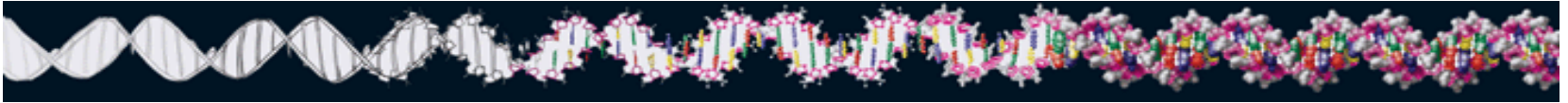
培养细胞生长减慢	由于更换不同培养液或血清 培养液中一些细胞生长必需成分如谷氨酰胺或生长因子耗尽或缺乏或已被破坏。 培养物中有少量细菌或真菌污染 试剂保存不当	比较新培养液与原培养液成分,比较新血清与旧血清支持细胞生长实验。 增加起始培养细胞浓度。 让细胞逐渐适应新培养液。 换入新鲜配制培养液。 补加谷氨酰胺或生长因子。 用无抗生素培养液培养,如发现污染,丢弃培养物。或用抗生素除菌。 血清需保存在-5℃ 到-20℃。培养液需在 2—8℃避光保存。含血清完全培养液在 2-8℃保存,并在 2 周内用完。
	接种细胞起始浓度太低 细胞已老化 支原体污染	增加接种细胞起始浓度。 换用新的保种细胞。 分离培养物,检测支原体。清洁支架和培养箱。如发现支原体污染,丢弃培养物。
培养细胞死亡	培养箱内无 CO₂ 培养箱内温度波动太大 细胞冻存或复苏过程中损伤 培养液渗透压不正确 培养液种有毒代谢产物堆积	检测培养箱内 CO₂ 检查培养箱内温度 取新的保存细胞种 检测培养液渗透压。注意:大多数哺乳动物细胞能耐受渗透压为 260 – 350 mOsm/kg。加入额外试剂如 HEPES 或药物都有可能影响培养液渗透压。 换入新鲜培养液

	接种细胞起始浓度太低 细胞已老化 支原体污染	增加接种细胞起始浓度。 换用新的保种细胞。 分离培养物，检测支原体。清洁支架和培养箱。如发现支原体污染，丢弃培养物。
培养细胞死亡	培养箱内无 CO₂ 培养箱内温度波动太大 细胞冻存或复苏过程中损伤 培养液渗透压不正确 培养液种有毒代谢产物堆积	检测培养箱内 CO₂ 检查培养箱内温度 取新的保存细胞种 检测培养液渗透压。注意：大多数哺乳动物细胞能耐受渗透压为 260 – 350 mOsm/kg。加入额外试剂如 HEPES 或药物都有可能影响培养液渗透压。 换入新鲜培养液

2. 倒置显微镜观察细胞生长状态

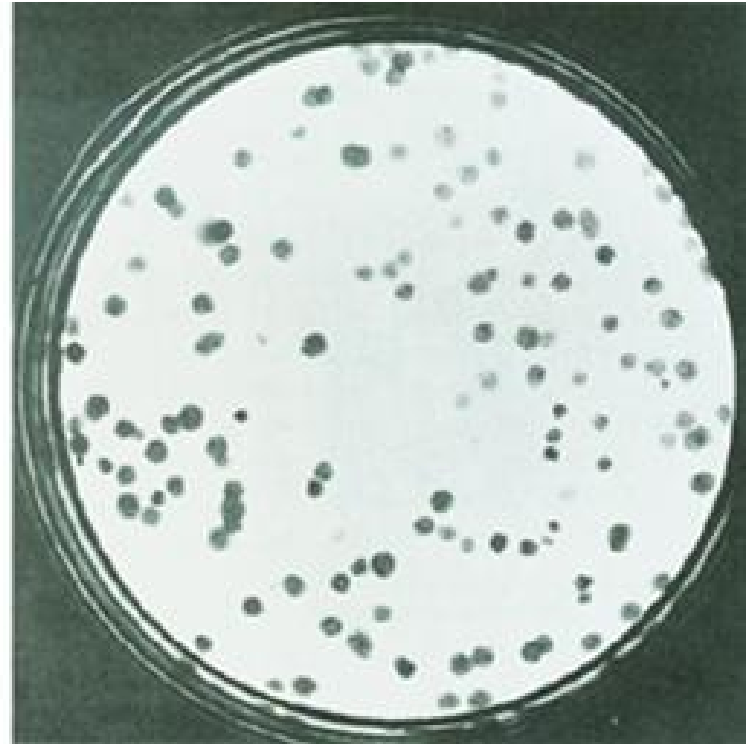
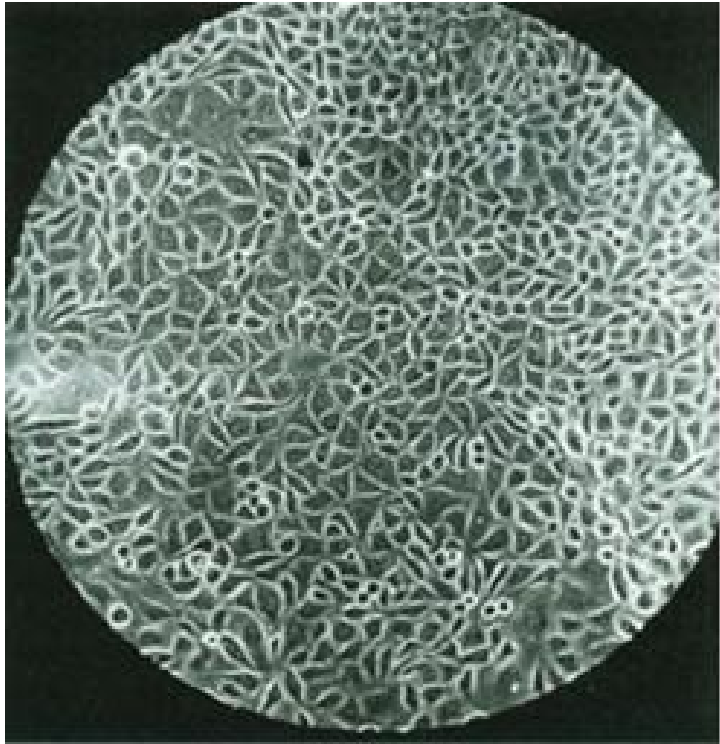


体外培养细胞的方式



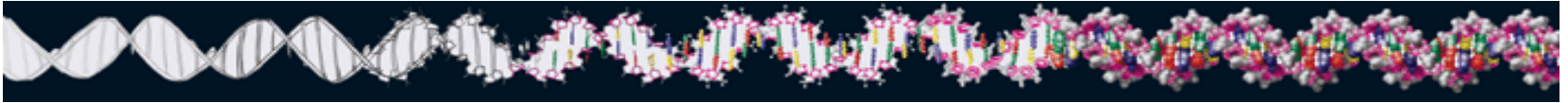
群体培养 (mass culture)，将含有一定数量细胞的悬液置于培养瓶中，让细胞贴壁生长，汇合 (confluence) 后形成均匀的单细胞层；

克隆培养 (clonal culture)，将高度稀释的游离细胞悬液加入培养瓶中，各个细胞贴壁后，彼此距离较远，经过生长增殖每一个细胞形成一个细胞集落，称为克隆 (clone)。一个细胞克隆中的所有细胞均来源于同一个祖先细胞。



群体培养（左）和克隆培养（右）

体外培养细胞的分型



（一）贴附型：

大多数培养细胞贴附生长，属于贴壁依赖性细胞，判断细胞形态时不能按照体内组织学标准判定，仅大致分成以下四型：

1、成纤维细胞型：

胞体呈梭型或不规则三角形，中央有卵圆形核，胞质突起，生长时呈放射状。除真正的成纤维细胞外，凡由中胚层间充质起源的组织，如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮等常呈本型状态。另外，凡培养中细胞的形态与成纤维类似时皆可称之为成纤维细胞。

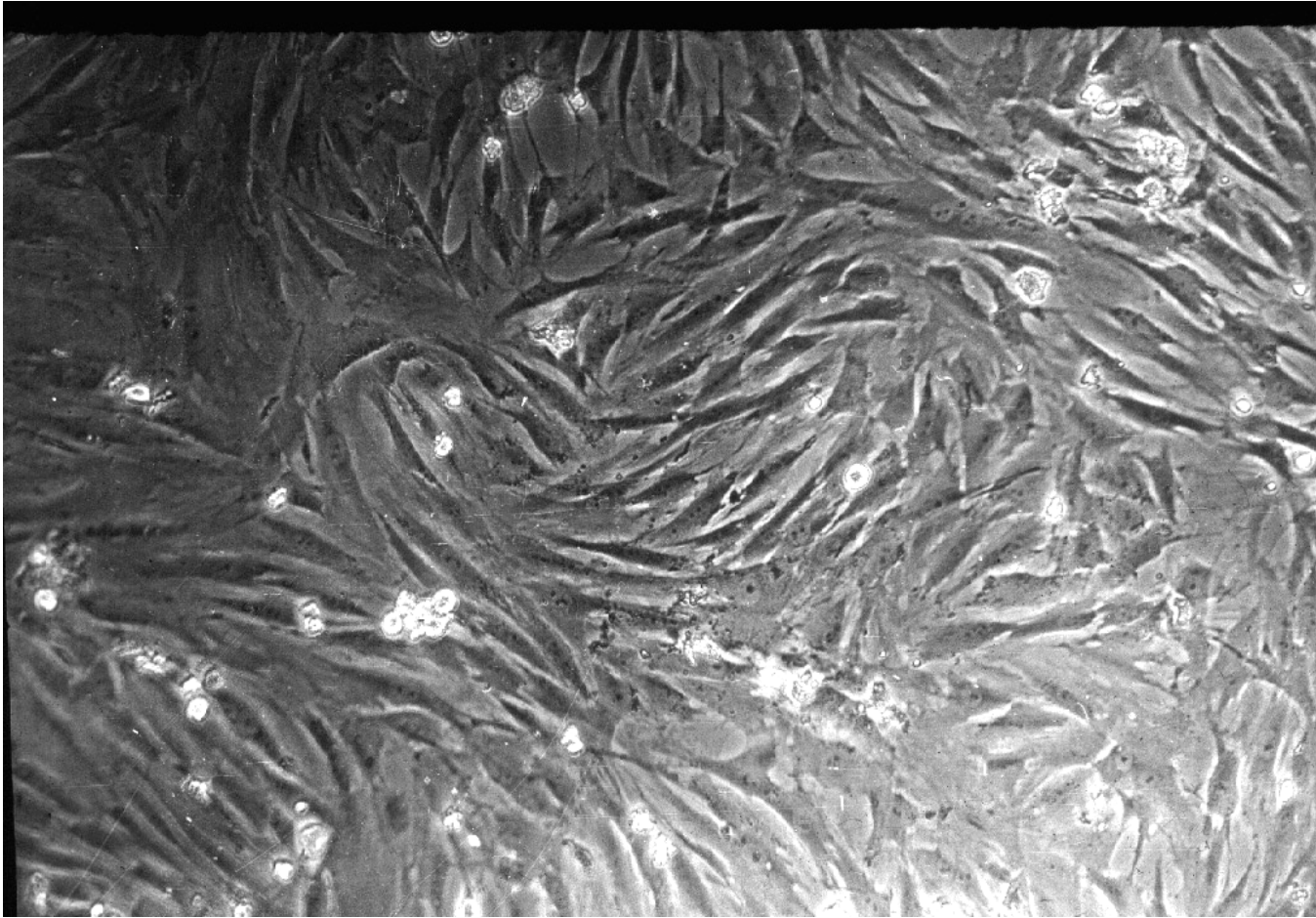
名称：凡在培养中形态与成纤维细胞类似的

来源：由中胚层间充质组织起源的组织如：

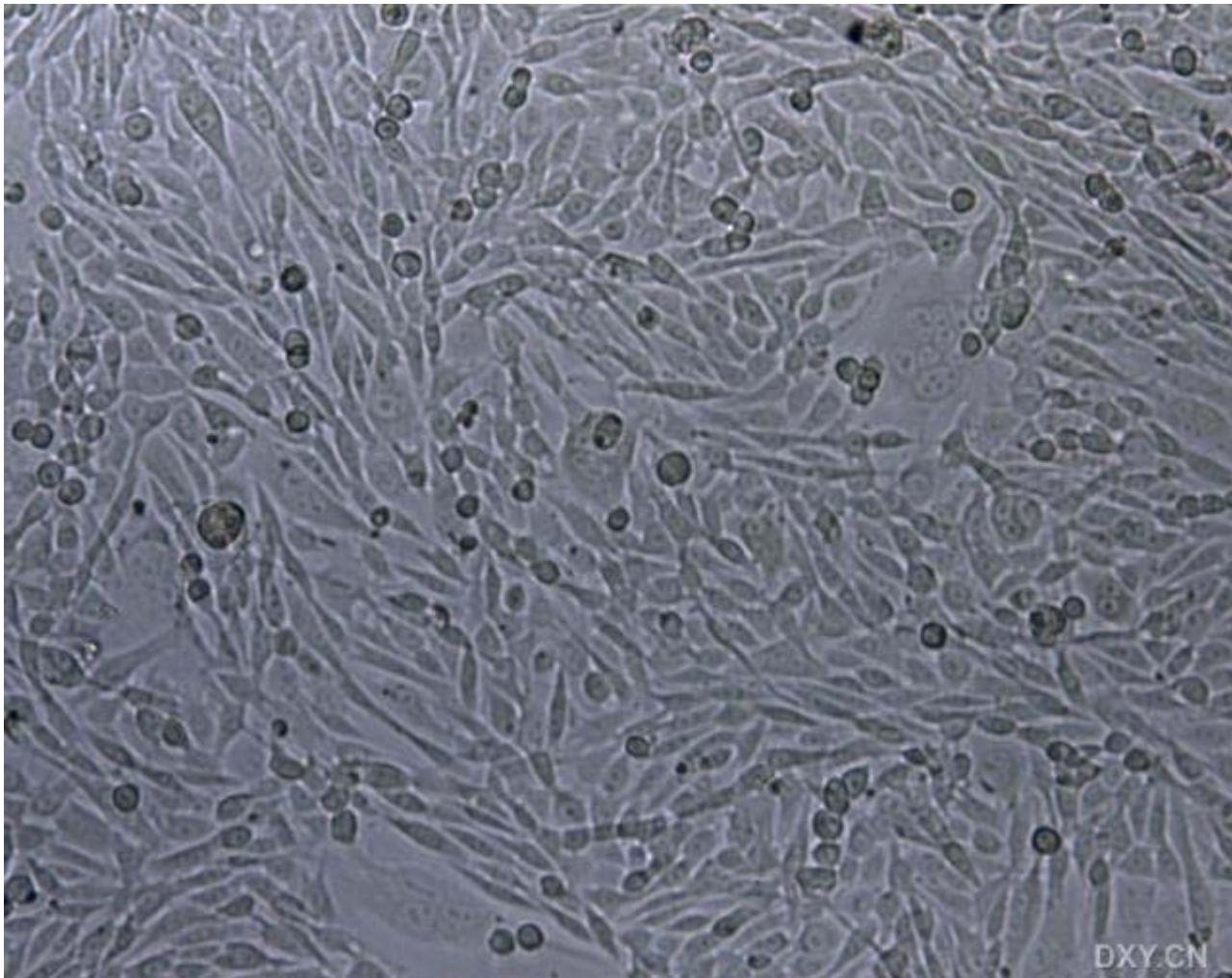
真正的成纤维细胞，心肌，平滑肌，成骨细胞，
血管内皮

形态：似体内成纤维细胞的形态，胞体梭形或不规则
三角形，胞质向外伸出2-3个长短不等的突起，
中有卵圆形核

生长特点：排列成放射状，漩涡状，并不紧靠连成片，
细胞-细胞接触易断开而单独行动，游离的单独的
成纤维样细胞，常有几个伸长的细胞突起



成纤维细胞



成纤维细胞

2、上皮型细胞:

细胞呈扁平不规则多角形，中央有圆形核，细胞彼此紧密相连成单层膜。生长时呈膜状移动，处于膜边缘的细胞总与膜相连，很少单独行动。起源于内、外胚层的细胞如皮肤表皮及其衍生物、消化管上皮、肝胰、肺泡上皮等皆成上皮型形态。

名称：仅形态上似体内，实际上不完全相同

来源：来源于外胚层、内胚层细胞，如：

皮肤及其衍生物,消化道，乳腺，肺泡, 上皮性肿瘤

形态：类似体内的上皮细胞扁平，不规则多角形，中有圆形核

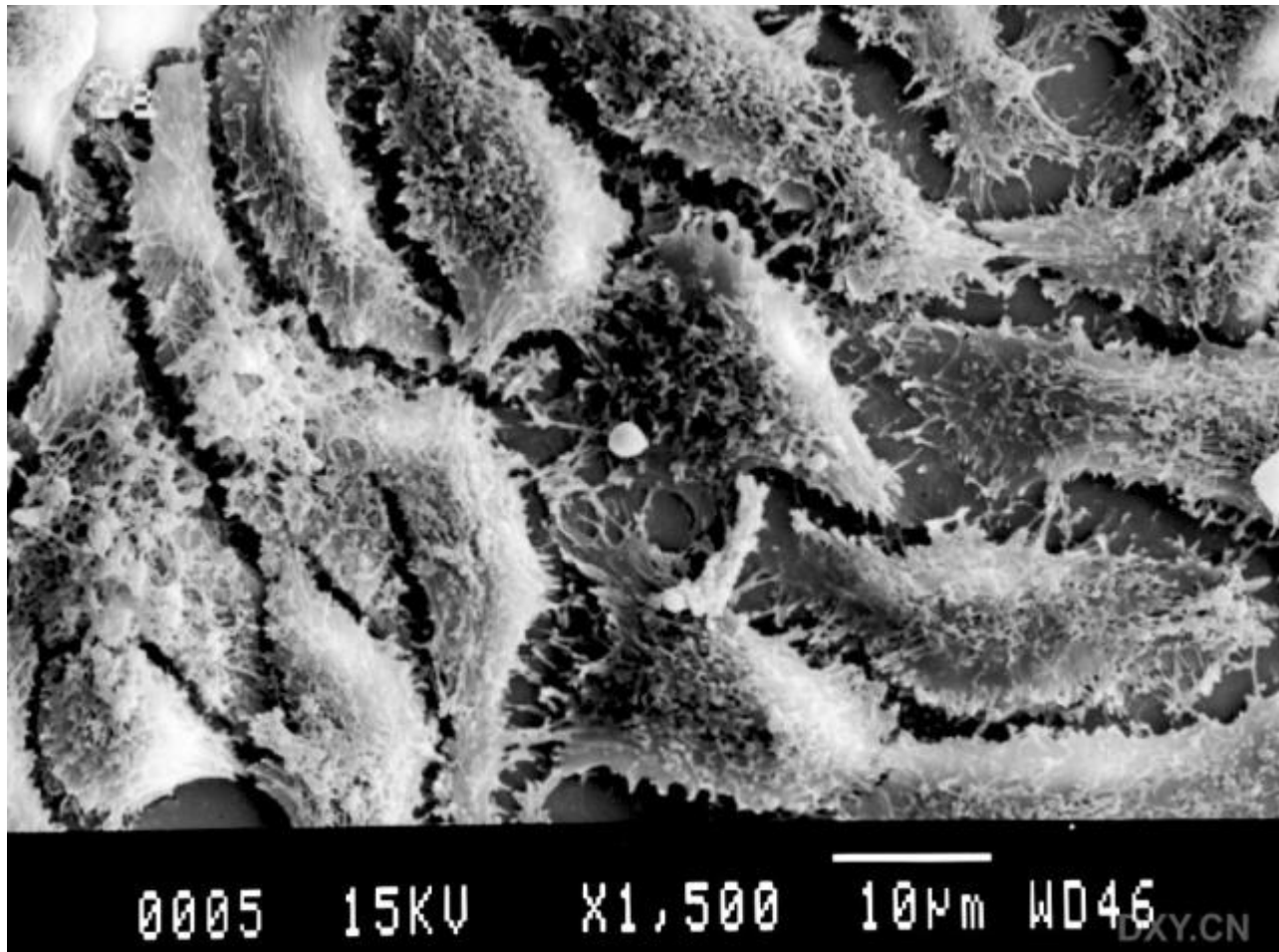
生长特点：易相连成片，相靠—紧密相连—成薄层—铺石状
生长时呈膜状移动，很少脱离细胞群而单个活动

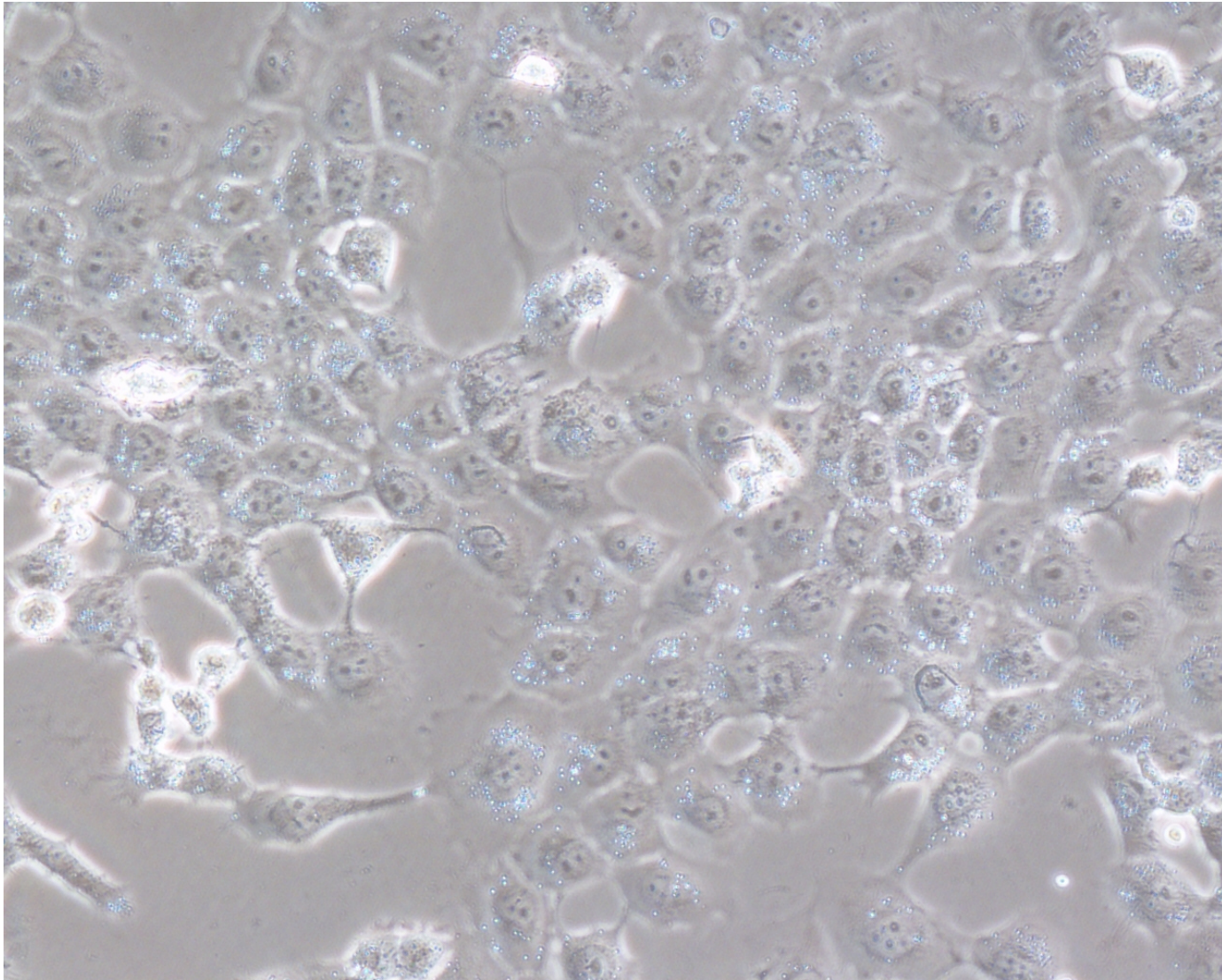


上皮型细胞

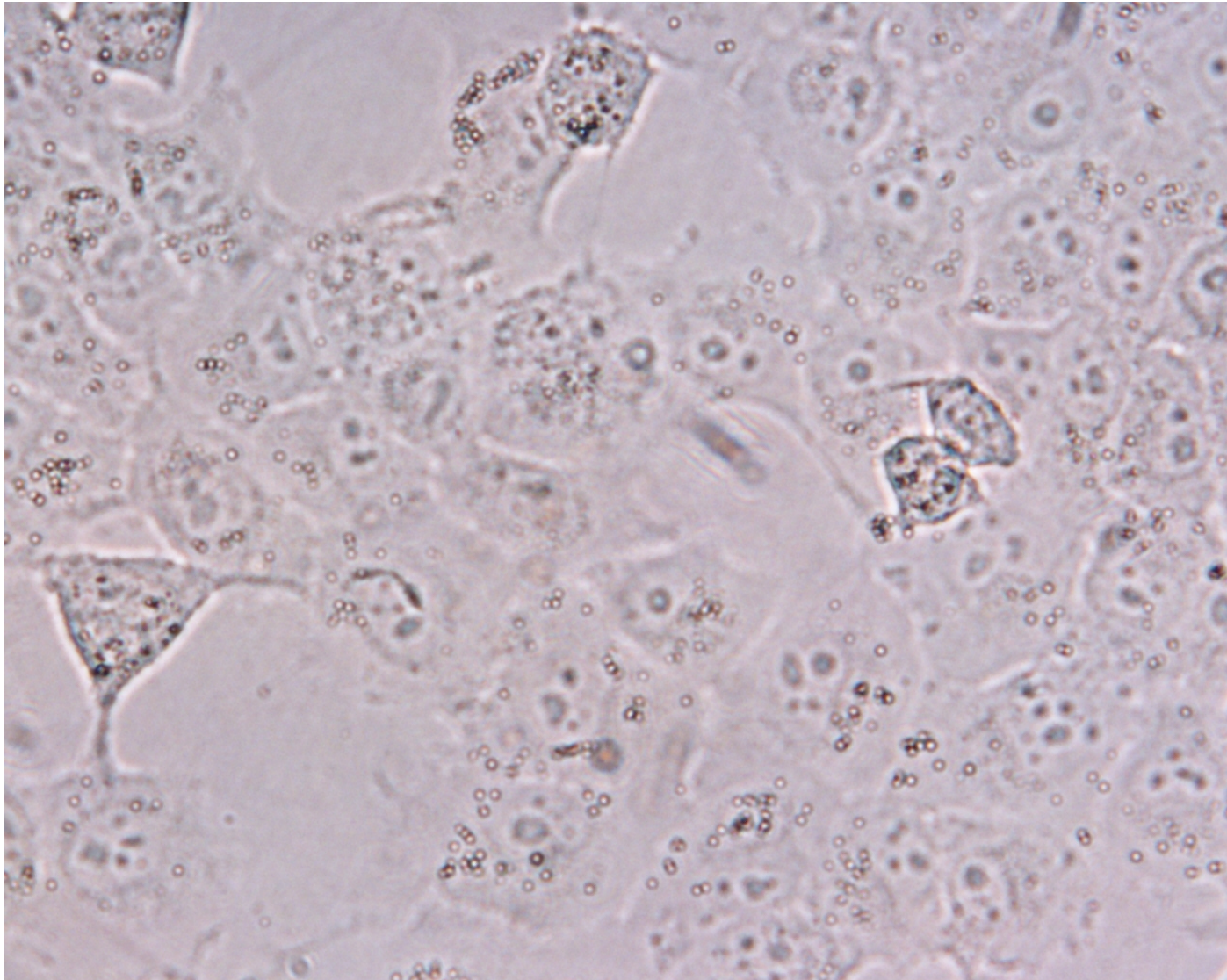
人大肠癌细胞HT-29系

- 1.细胞种类：人大肠上皮粘膜癌；
- 2.培养天数：传代后2天；
- 3.放大倍数：电镜*；
- 4.培养基种类：MEM/Ham-F12 1:1混合；
- 5.细胞状态与特征：细胞呈贴壁生长，梭形或不规则形，伪足较多，生长较快。





衰退期细胞



衰退期细胞

3、游走细胞型：

呈散在生长，一般不连成片，胞质常突起，呈活跃游走或变形运动，方向不规则。此型细胞不稳定，有时难以和其他细胞相区别。

- 1.细胞种类：小鼠腹腔分离的单核巨噬细胞；
- 2.培养的天数：24h；
- 3.放大倍速：倒置显微镜 X10；
- 4.培养基种类：RPMI1640+10%胎牛血清；
- 5.细胞状态与特征简述：细胞呈圆形，边缘清晰整齐，贴壁生长。

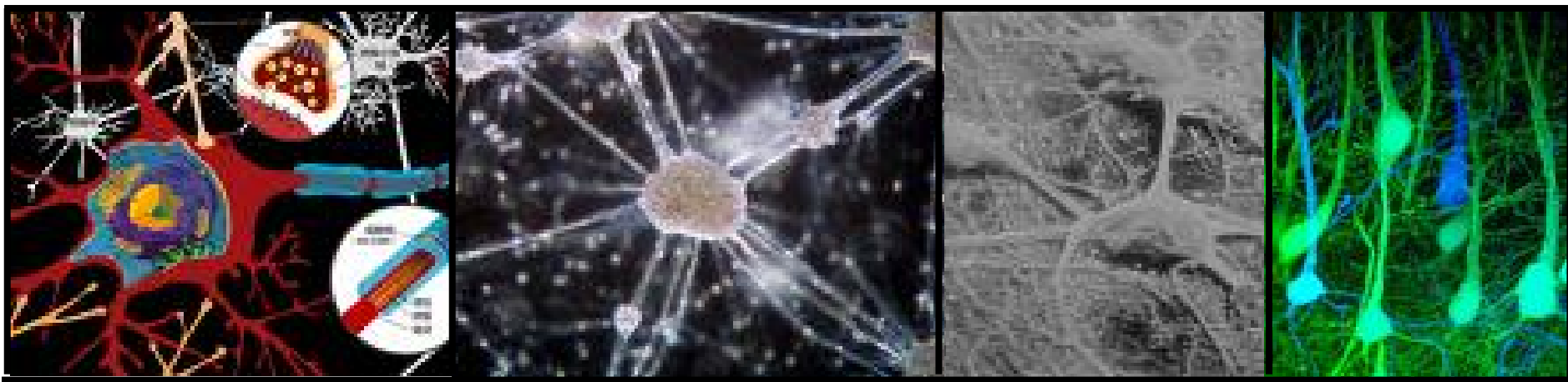


- 1.细胞种类：小鼠腹腔分离的单核巨噬细胞；
- 2.培养的天数：30h；
- 3.放大倍速：倒置显微镜 X10；
- 4.培养基种类：RPMI1640+10%胎牛血清；
- 5.细胞状态与特征简述：细胞形态不规则，向四周伸展伪足，边缘不清，贴壁生长。



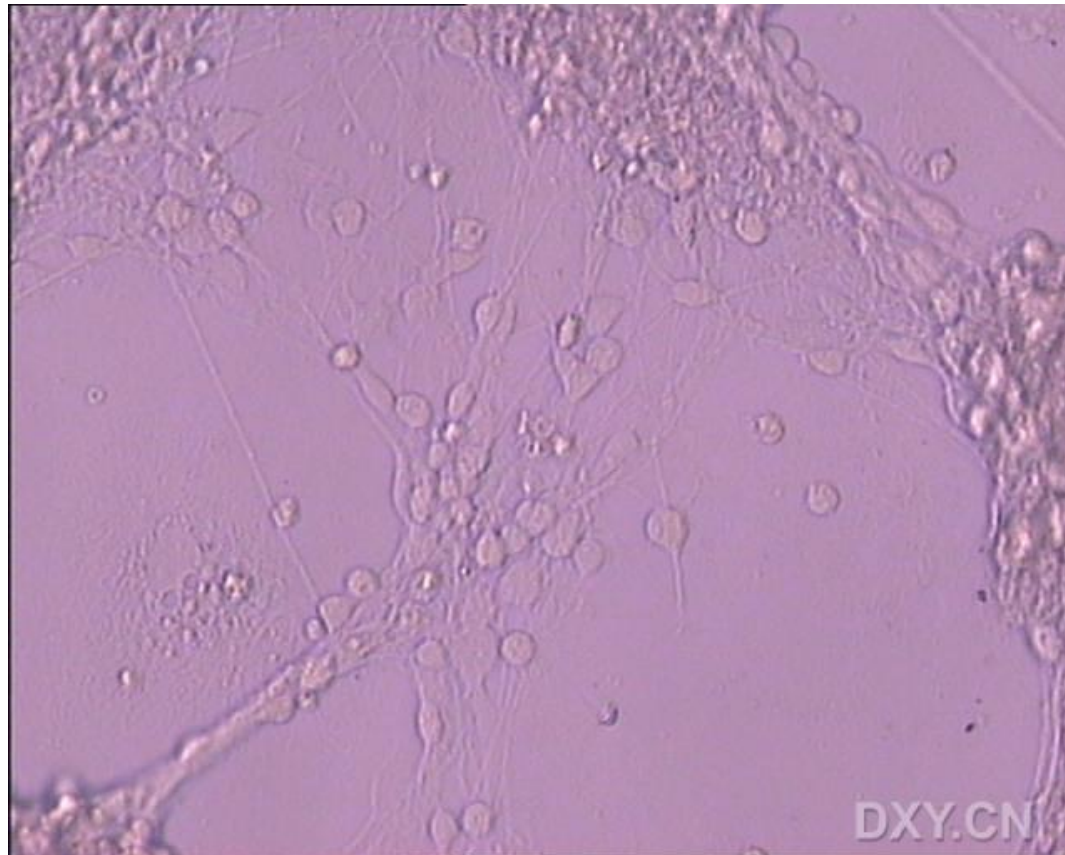
4、多型细胞型：

有一些细胞，如神经细胞难以确定其规律和稳定的形态，可统归于此类。



新生24小时wistar大鼠皮质神经细胞

- 1.细胞种类：大鼠皮质神经细胞；
- 2.培养的天数：5 天；
- 3.放大倍速：倒置显微镜 X200倍；
- 4.培养基种类：DEME-F12+N2
- 5.细胞状态与特征简述：神经细胞聚集成球，向外爬行生长，各神经球之间有丰富的神经丝联系。单个神经细胞胞体呈锥形或圆形，树突交错呈网，贴壁生长。



（二）悬浮型：

见于少数特殊的细胞，如某些类型的癌细胞及白血病细胞。胞体圆形，不贴于支持物上，呈悬浮生长。这类细胞容易大量繁殖。

概念：培养时不贴附于底物而呈悬浮状态生长

或以机械方法使保持悬浮状态下生长

来源：白血，脾或骨髓，尤以血中白细胞癌肿细胞也可能

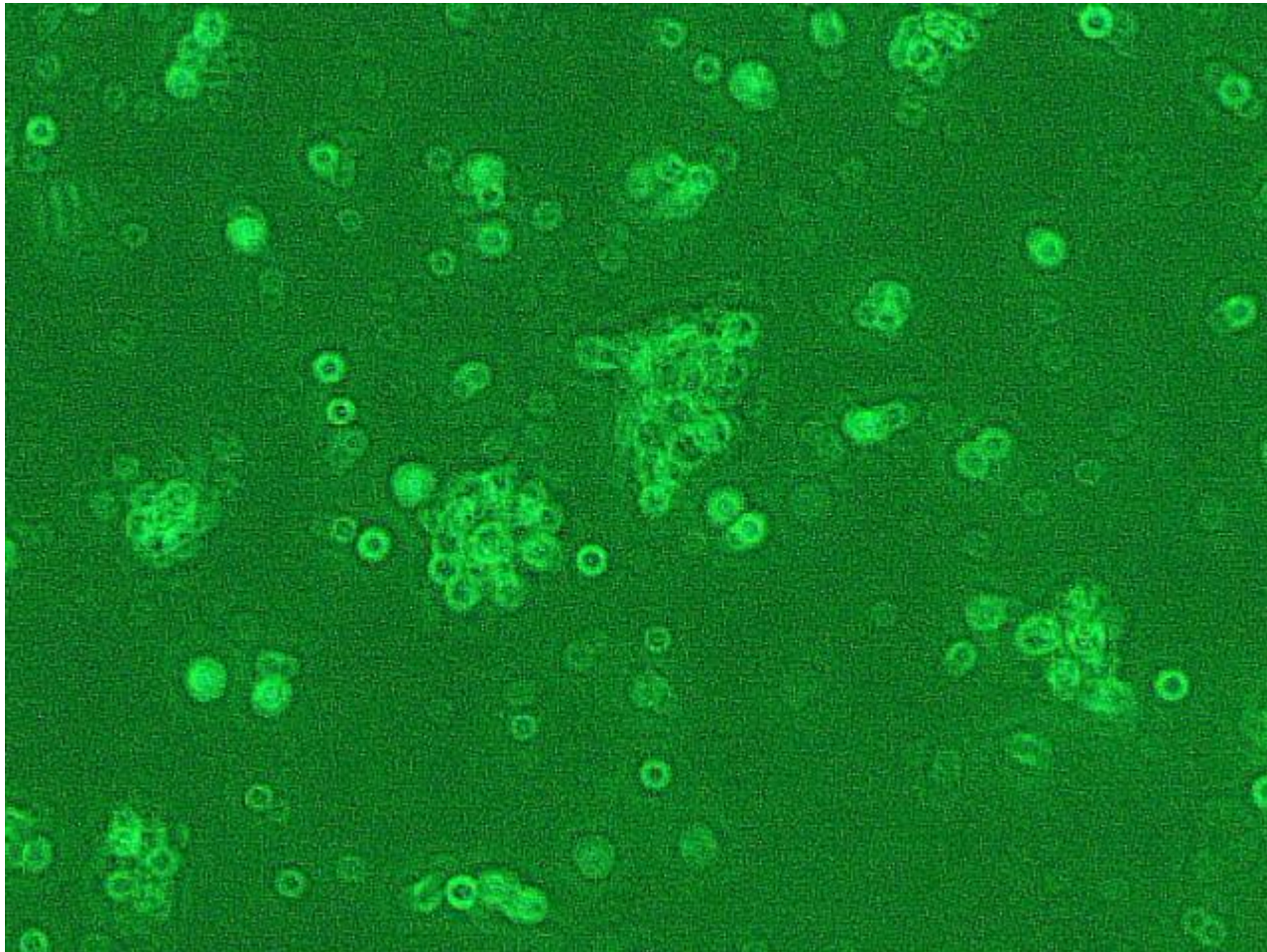
特点：在悬浮中生长良好细胞圆形，单个或小细胞团

优点：生存空间大，提供数量大，传代方便(不需消化)，
易于收获，可获得稳定状态

缺点：观察不方便，很多细胞不能悬浮生长(尤以正常细胞)

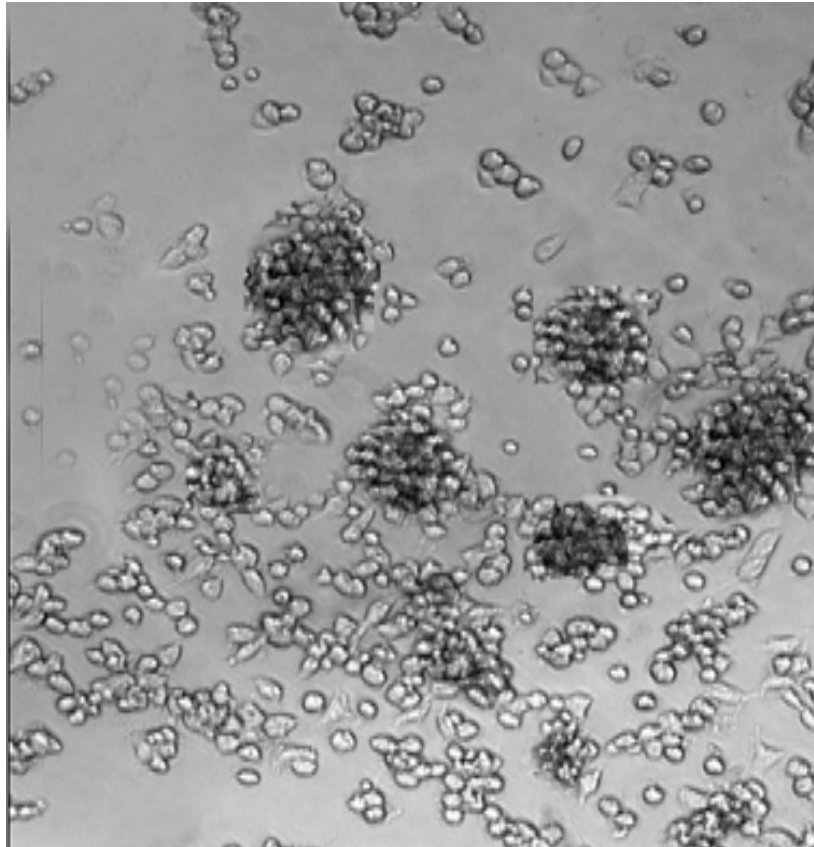
人PBMC (PHA活化剂刺激16h后) :

- 1.细胞种类: 人PBMC;
- 2.培养的天数: 36h;
- 3.放大倍速: 倒置显微镜 X10;
- 4.培养基种类: RPMI1640+10%胎牛血清;
- 5.细胞状态与特征简述: 淋巴细胞母细胞化并聚集。



人PBMC（经EB病毒转化后的淋巴母细胞）：

1. 细胞种类：人PBMC；
2. 培养的天数：2 weeks；
3. 放大倍速：倒置显微镜 X10；
4. 培养基种类：RPMI1640+15%胎牛血清（Hyclone公司）；
5. 细胞状态与特征简述：淋巴细胞母细胞化并聚集。



细胞传代方法

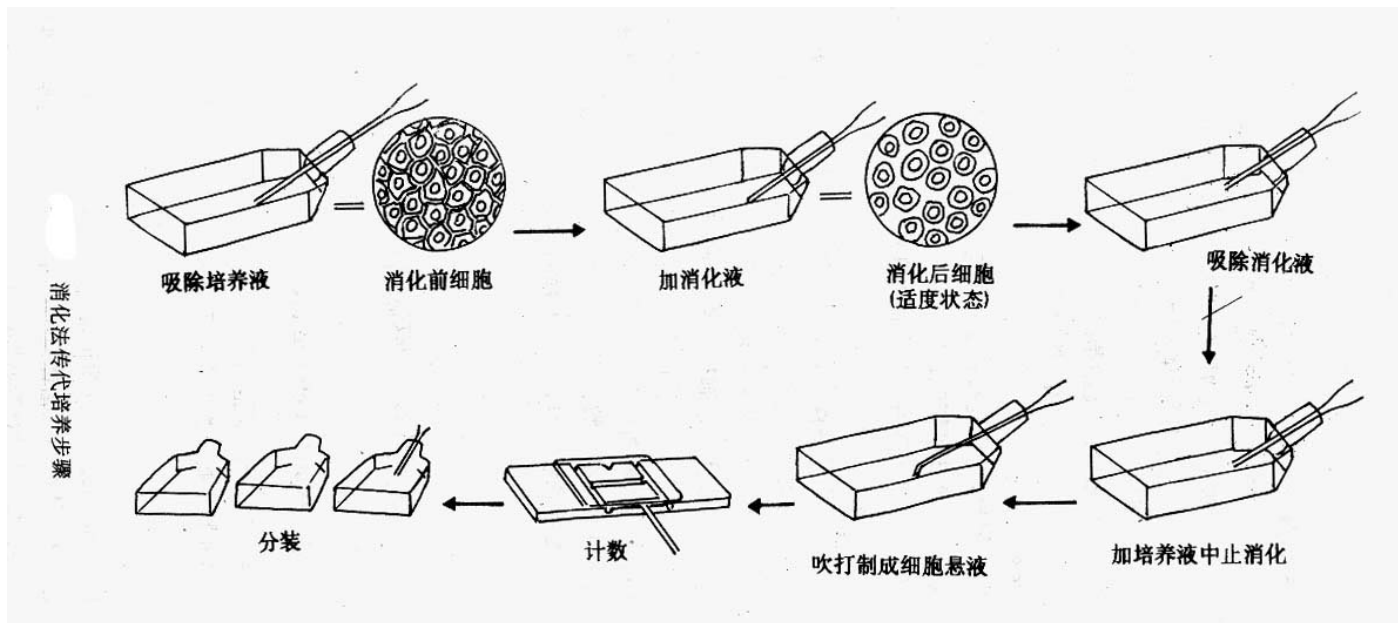


- 根据细胞生长的特点，传代方法有3种：
- 1. 悬浮生长细胞传代
 - 离心法传代：离心（1000转/分）去上清，沉淀物加新培养液后再混匀传代。
- 2. 半悬浮生长细胞传代（HeLa细胞）
 - 此类细胞部分呈现贴壁生长现象，但贴壁不牢，可用直接吹打法使细胞从瓶壁脱落下来，进行传代。
- 3. 贴壁生长细胞传代
 - 采用酶消化法传代。常用的消化液有0.25%的胰蛋白酶液。

贴壁生长细胞传代方法：



- 1 吸光培养瓶中的培养液
- 2 加入1-2 ml 0.25%的胰蛋白酶液（以消化液能覆盖整个瓶底为准）
- 静置2-10 min（显微镜下动态监测）。
- 3 吸去胰蛋白酶液，加入培养液。
- 4 用吸管吸取瓶内培养液，反复吹打瓶壁细胞，形成细胞悬液。
- 5 离心，细胞沉淀用培养液制成悬液。
- 5 吸取1/10—1/40细胞悬液，接种于新的培养瓶内。
- 6 加适量新鲜培养液于接种了细胞悬液的新培养瓶内。
- 7 将后者放入培养箱中培养。



细胞传代培养—消化法

细胞计数



- 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。细胞计数的原理和方法与血细胞计数相同。
- 血细胞计数器：手工计数细胞
- 血球计数仪：自动计数

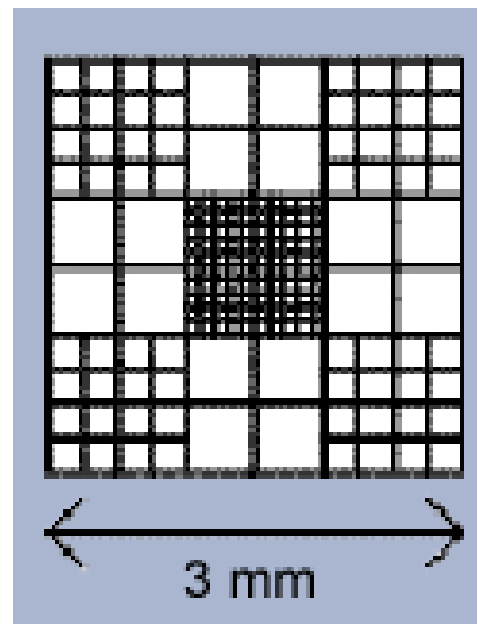


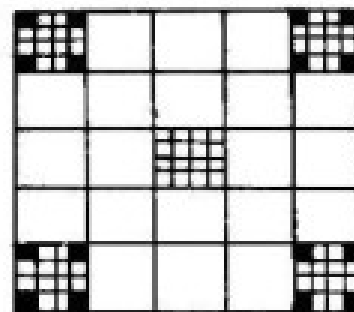
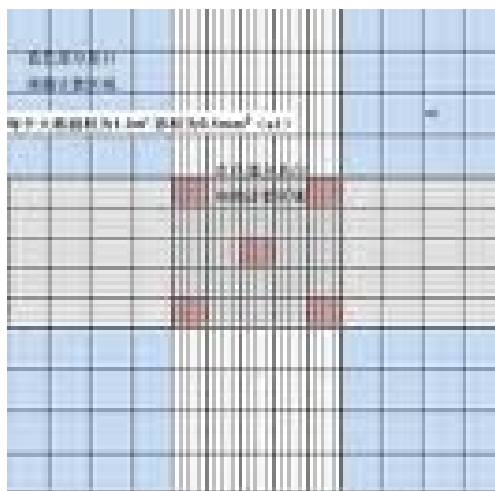
细胞计数：

- 1、将血球计数板及盖片擦拭干净，并将盖片盖在计数板上。
- 2、将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间。
- 3、静置3分钟。
- 4、镜下观察，计算计数板四大格细胞总数，压线细胞只计左侧和上方的。然后按下式计算：

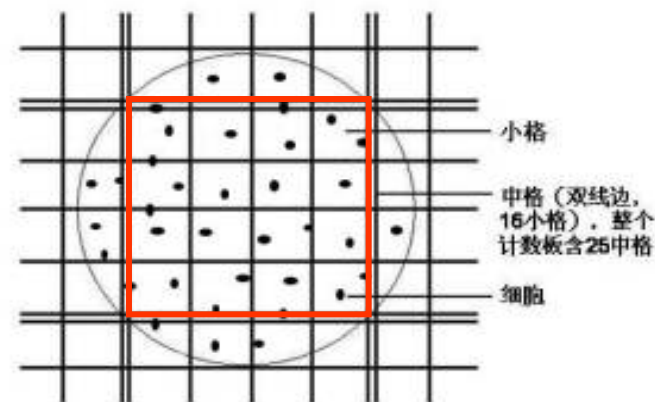
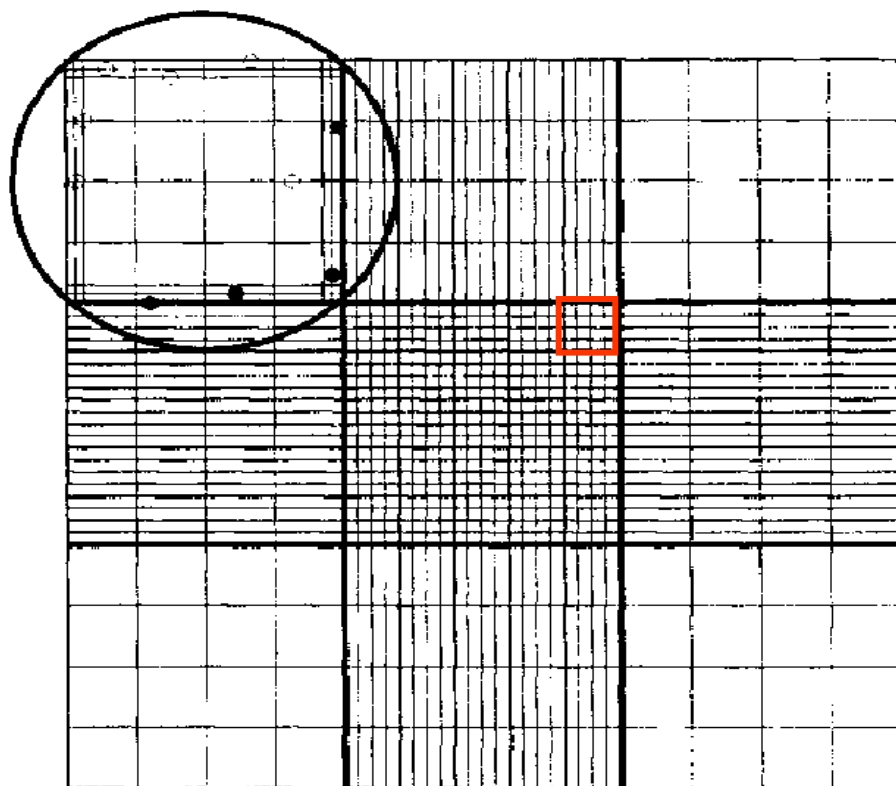
$$\text{细胞数/ml} = \text{4大格细胞总数} / 4 \times 10000$$

注意：镜下偶见由两个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团占10%以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。





(d)放大后的计数室
血球计数板的构造



培养细胞活力测定



- 任何培养瓶内生长的细胞都由死细胞和活细胞组成，从形态上区别死、活细胞是困难的。
- 在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，总细胞中活细胞所占的百分比叫做**细胞活力**，由组织中分离细胞一般也要检查活力，以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用。复苏后的细胞也要检查活力，了解冻存和复苏的效果。

• 台盼蓝法



- 活细胞不被染色，死细胞染成蓝色；
- 用活细胞占细胞中的百分比表示细胞活力；
- 方法：
 - 1、将细胞悬液以0.5ml加入试管中；
 - 2、加入0.5ml 0.4%台盼兰染液，染色2—3分钟；
 - 3、吸取少许悬液涂于载玻片上，加上盖片；
 - 4、镜下取几个任意视野分别计死细胞和活细胞数，计细胞活力；

死细胞能被台盼兰染上色，镜下可见深兰色的细胞，活细胞不被染色，镜下呈无色透明状。

活力测定可以和细胞计数合起来进行，但要考虑到染液对原细胞悬液的加倍稀释作用。

其他染色方法

未固定凋亡细胞染色：

台盼蓝法：

AO/EB双染色法：

致密浓染黄绿色：早期凋亡细胞，

致密浓染鲜红色：晚期凋亡细胞，

鲜红色膨大状：坏死细胞

凋亡细胞固定后染色观察：

MGG染色法：玻片晾干后用MGG染液染色20 min，光镜观察

Hoechst3325染色法

HE染色法

其他：

Annexin V /PI双染法：

正常活细胞Annexin V、PI均低染；

凋亡细胞Annexin V高染、PI低染；

坏死细胞Annexin V/PI均高染

TUNEL染色：检测细胞凋亡

CFSE染色：检测细胞增殖

MTT比色法：测定细胞相对数和相对活力

AO/EB双染色

原理：AO能够透过细胞膜，把细胞核内的DNA染成绿色，细胞浆内的RNA呈桔红色。早期凋亡细胞的细胞膜尚完整，细胞浆发生固缩，细胞核固缩或碎裂，因此呈致密浓染的黄绿色，有的还可见碎块状。晚期凋亡细胞的细胞膜通透性增加，EB能够通过，使其呈鲜红色固缩体或碎块。坏死细胞不仅细胞膜不完整，而且线粒体肿胀，为鲜红色的膨大细胞。

方法：25 Ld离壁漂浮的细胞悬液与2 μ lAO染液(100 μ g/ml)和2 μ l EB染液(100 μ g/ml)混合后滴片，立即用荧光显微镜观察。

结果：大部分细胞主要呈致密浓染的黄绿色染色或黄绿色碎片(早期凋亡细胞)；部分细胞呈致密浓染的鲜红色染色或鲜红色碎片(晚期凋亡细胞)；少部分为鲜红色的膨大细胞。而在正常对照细胞主要呈细胞核绿色淡染，细胞浆桔黄或桔红色。坏死对照大部分为鲜红色的膨大细胞。

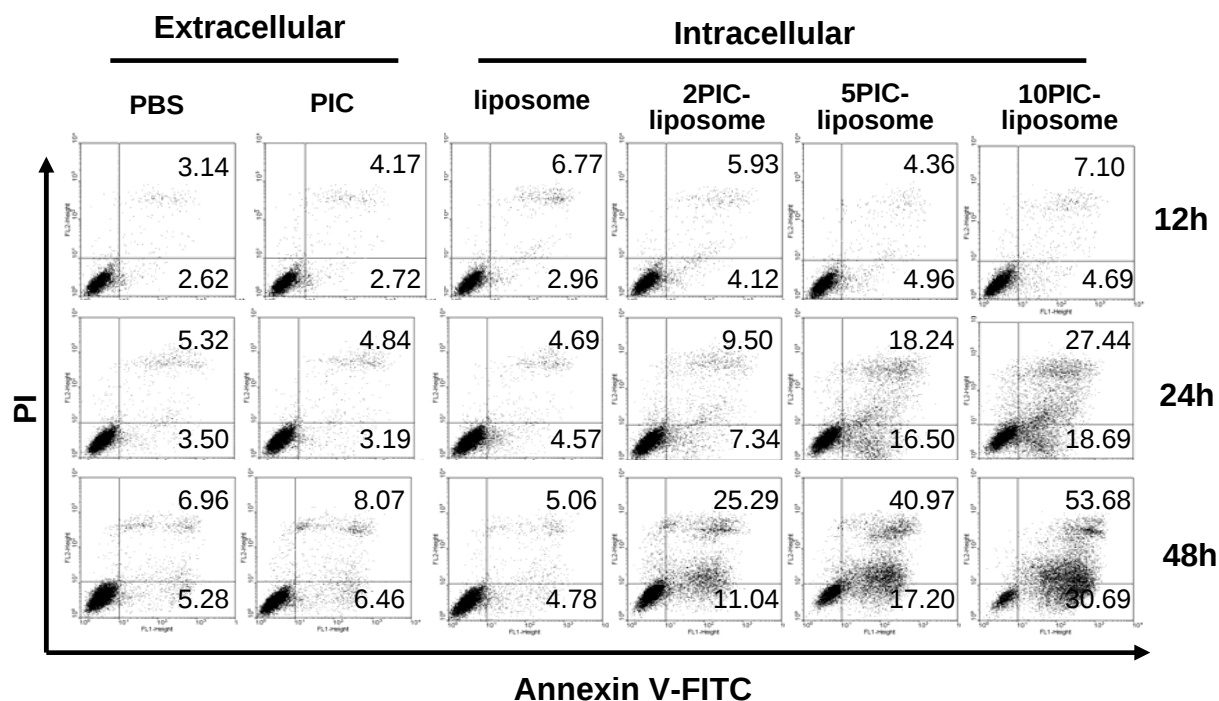
MGG染色

MGG由May-Grunwald染料和Giemsa染料组成。前者化学名为曙红亚甲基蓝II，对胞质着色较好；后者对胞核着色较好。因此MGG染色，可兼两者的优点，常用于细胞涂片染色。

正常细胞呈细胞浆淡蓝色，细胞核粉红色着色。实验组的大部分细胞固缩变圆，整个细胞呈深蓝色。坏死对照为外形不规则的淡蓝色膨大细胞。

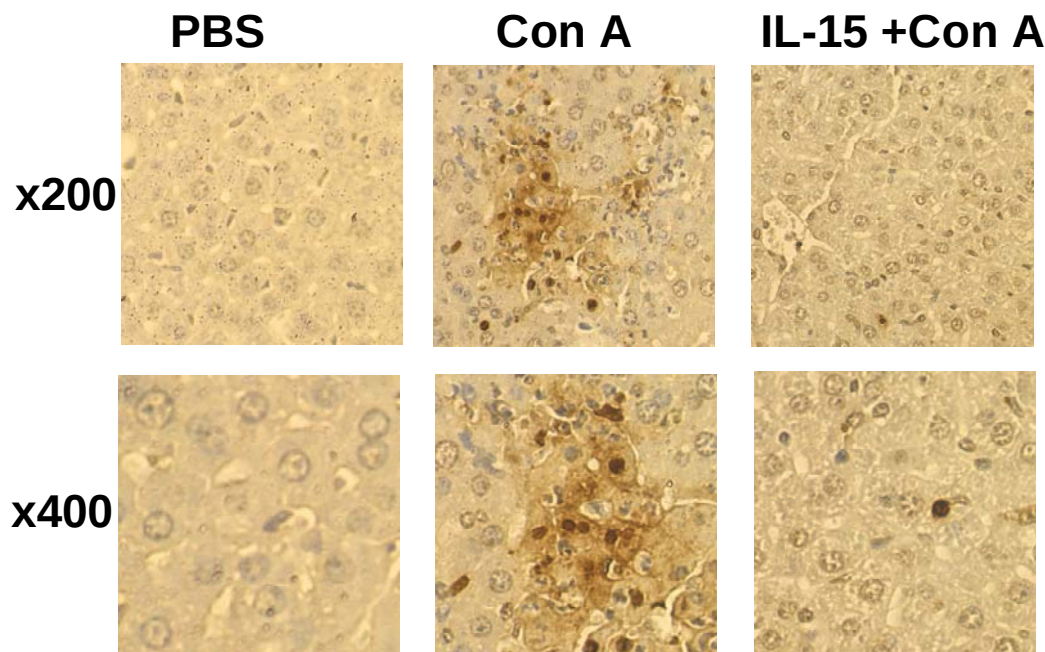
Annexin V/PI双染法:

在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的**磷脂酰丝氨酸 (PS)**迁移至细胞膜外侧。磷脂结合蛋白V (**Annexin V**) 是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白，它与PS具有高度的结合力。因此，Annexin V可以作为探针检测暴露在细胞外侧的磷脂酰丝氨酸。故利用对PS有高度亲和力的Annexin V，将Annexin V标记上**荧光素**（如异硫氰酸荧光素FITC），同时结合使用PI拒染法（因坏死细胞PS亦暴露于细胞膜外侧，且对PI高染）进行凋亡细胞双染法后用流式细胞仪即可检测凋亡细胞。



TUNEL 技术

TUNEL 是末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 介导的dUTP 原位切口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling TUNEL) 技术，是原位检测细胞凋亡情况的一种基本方法。细胞发生凋亡时，染色体DNA会发生断裂，DNA双链断裂或只要一条链上出现缺口而产生的一系列DNA的3' - OH末端可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到DNA的3' - 末端，从而可进行凋亡细胞的检测。



CFSE 染色法:

CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester 羧基荧光素双乙酸盐, 琥珀酰亚胺酯) 被动扩散进入细胞, 其本身是无色无荧光的, 被细胞内的酯酶分解后产生高强度的荧光, 该荧光产物与胞内的氨基结合长时间留存于细胞内并可被乙醛固定。未结合的试剂与副产物扩散至胞外基质中, 被洗去。传代或胚胎分裂分析, CFSE 与赖氨酸侧链或其他氨基基团反应, 共价偶联至细胞内和细胞表面的蛋白, 细胞分裂时被平均分配至子代细胞, 荧光强度降到母代细胞的一半。适合用于胞内示踪, 在细胞分裂或融合后分配至子代细胞中, 并不会被转移至邻近的细胞。

在小鼠淋巴细胞迁移实验中, CFSE注射进入小鼠体内后, 标记的淋巴细胞的检测可长达8周。肝内注射荧光显微镜定位检测可长达20天。

$T_{CD4+CD25-}$: Treg

1 : 0.5

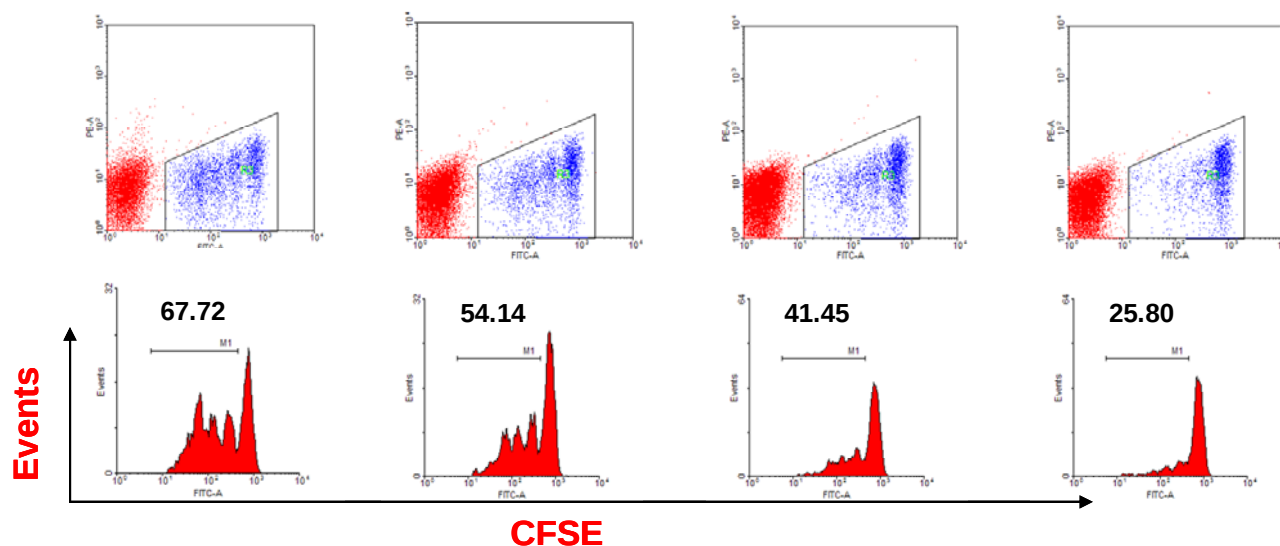
1 : 1

1 : 2

1 : 4

$T_{CD4+CD25-}$ + Treg.1

+APC+anti-CD3



细胞冻存和复苏



- 细胞低温冷冻贮存是细胞室的常规工作。细胞冻存与细胞传代保存相比可以减少入力、经费，减少污染，减少细胞生物学特性变化。

冻存和复苏的原则：慢冻快融



- 当细胞冷到零度以下，可以产生以下变化：细胞器脱水，细胞中可溶性物质浓度升高，并在细胞内形成冰晶。
- 如果缓慢冷冻，可使细胞逐步脱水，细胞内不致产生大的冰晶；相反，结晶很大，大结晶会造成细胞膜、细胞器的损伤和破裂。复苏过程应快融，目的是防止小冰晶形成大冰晶，即冰晶的重结晶。

低温保护剂的应用

- 在细胞冻存时加入低温保护剂，能大大提高冻存效果。
- 常用的低温保护剂是DMSO，它是一种渗透性保护剂，可迅速透入细胞，提高胞膜对水的通透性，降低冰点，延缓冻结过程，能使细胞内水分在冻结前透出细胞外，在胞外形成冰晶，减少胞内冰晶，从而减少冰晶对细胞的损伤。

细胞冻存方法

- 1. 预先配制冻存液：含20%血清培养基，10%DMSO，DMSO液用培养液配好，避免因临时配制产热而伤害细胞；
- 2. 取对数生长期细胞，经胰酶消化后，加入适量冻存液，用吸管吹打制成细胞悬液（ $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 细胞/ml）；
- 3. 加入1ml细胞于冻存管中，密封后标记冷冻细胞名称和冷冻日期。

慢冻程序

标准程序：

当温度在 -25°C 以上时， $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

当温度达 -25°C 以下时， $5\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

当温度达 -100°C 时，可迅速放入液氮中

程序降温仪



34立升，降温速率：0.1-50度/分，升温速率：0.1-10度/分；
温度偏差：小于2度，6个预设程序，10个用户设定程序；
每分钟1-3℃地冷冻速率可大大提高冻存细胞的复苏率。

慢冻程序

简易程序：

将冷冻管（管口要朝上）放入纱布袋内，纱布袋系以线绳，通过线绳将纱布袋固定于液氮罐罐口，按每分钟温度下降 $1\sim 2^{\circ}\text{C}$ 的速度，在40分钟内降至液氮表面，停30分钟后，直接投入液氮中。

慢冻程序

一般程序：

1. 先将冻存管放入4℃冰箱，约40min。
2. 接着置于-20℃冰箱，约30~60min。
3. 置于-80℃超低温冰箱中放置过夜。
4. 置于液氮罐中长期保存。



液氮罐



细胞复苏方法

- (1) 从液氮中取出冷冻管，迅速投入37~38℃水浴中，使其融化（1分钟左右）；
- (2) 5分钟内用培养液稀释至原体积的10倍以上；
- (3) 低速离心3-10分钟；
- (4) 去上清，加新鲜培养液培养刚复苏的细胞。

细胞培养的污染和检测

细胞污染的种类可分成细菌、酵母菌、霉菌和病毒。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是主要的污染源。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。

1、细菌的污染和检测

肉眼直接观察法

培养检查法

显微镜观察法

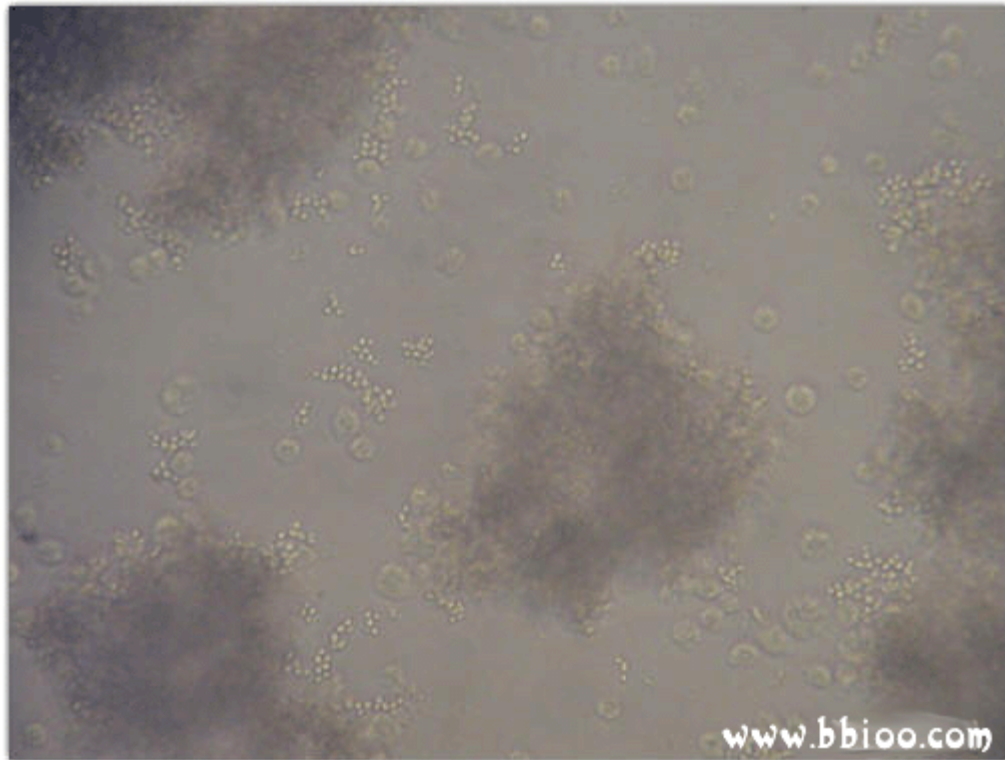
PCR检测

细菌污染是实验室细胞培养中常见的污染，即使在细胞培养液中加入了抗菌素，也可能因为操作不慎而引起污染。最常见的有革兰氏阳性菌，如枯草杆菌、白色葡萄球菌，以及大肠杆菌、假单胞菌等革兰氏阴性菌。

培养细胞受细菌污染后，会出现培养液变混浊，pH改变。污染后细胞发生病理改变，胞内颗粒增多、增粗，最后变圆脱落死亡。

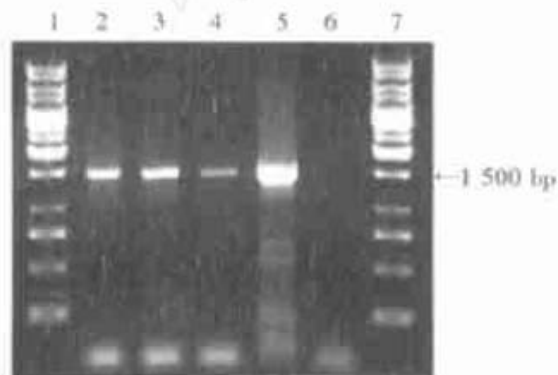


细菌污染



小鼠胃癌细胞的球菌感染图片

原核细胞16S rRNA 基因序列通用引物 检测细菌污染



1 和 7: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder marker; 2 - 5: 分别被 *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* 和 *M. fermentans* 污染的 HeLa 细胞培养上清中的 DNA 扩增产物; 6: 空白对照

图 1 PCR方法的通用性检测结果

染绿脓杆菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌, 以及支原体 *M. fermentans* 的 HeLa 细胞的培养上清

表 1 本实验检测的体外培养细胞株

细胞系	细胞株数量	阳性结果冻存批次
Vero 细胞	2	-
ECV 细胞	2	-
C6/36 细胞	2	20010130
CHO 细胞	1	-
Hep G2 细胞	2	20020610
BHK 细胞	1	-
COS7 细胞	1	-
HeLa 细胞	1	19990921
Sf 9 细胞	1	-
Sf21 细胞	1	-
SP2/0 细胞	1	-

16S rRNA 特异性序列通用引物

上游引物(A - 17):

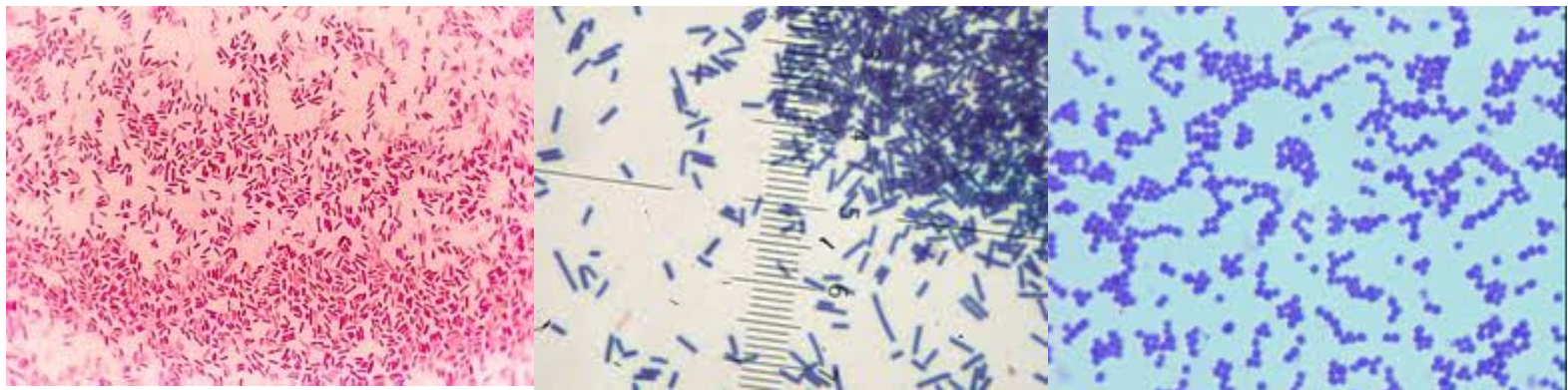
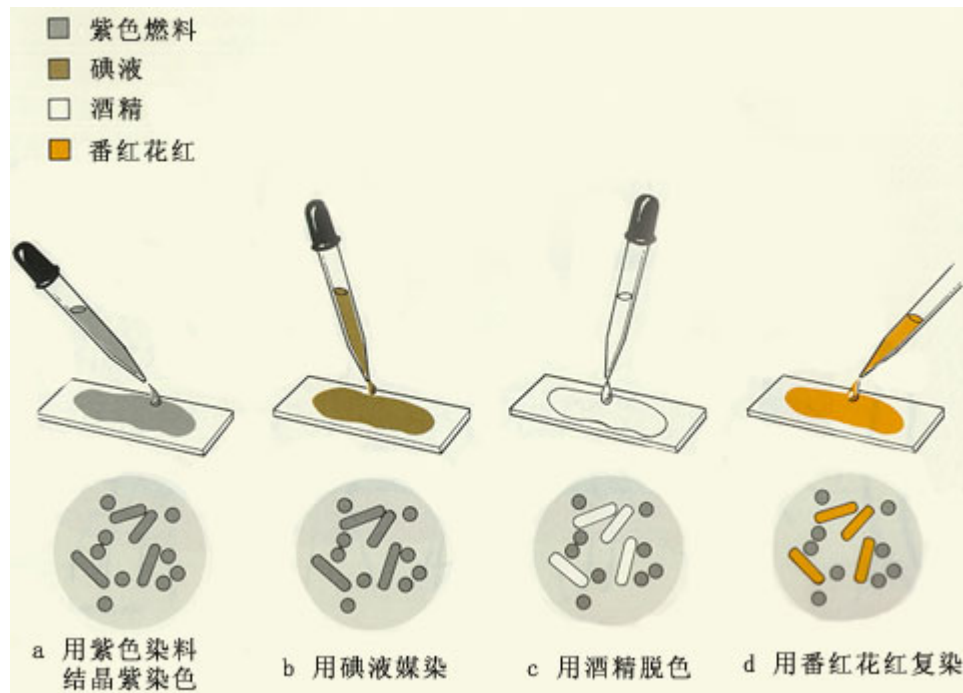
5' 2 GTT TGA TCC TGG CTC AG23' ;

下游引物(3 - 17):

5' 2 AAG GAG GTA ATC CAG CC23' ;

扩增片段大小约1 500 bp 。

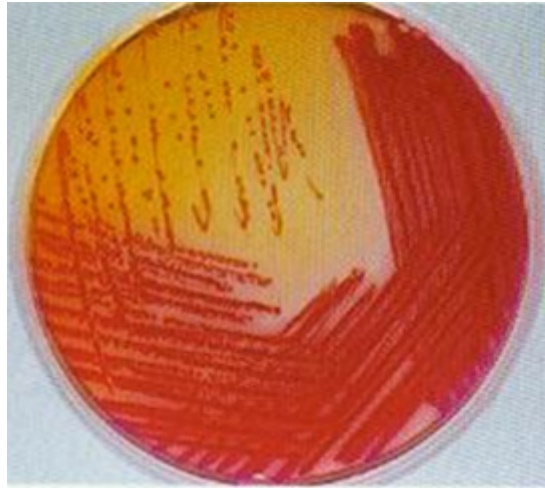
革兰氏染色检测细菌污染



培养检测细菌污染



血平板



SS平板



麦康凯平板

生化鉴定



标准管

痢疾杆菌

伤寒杆菌

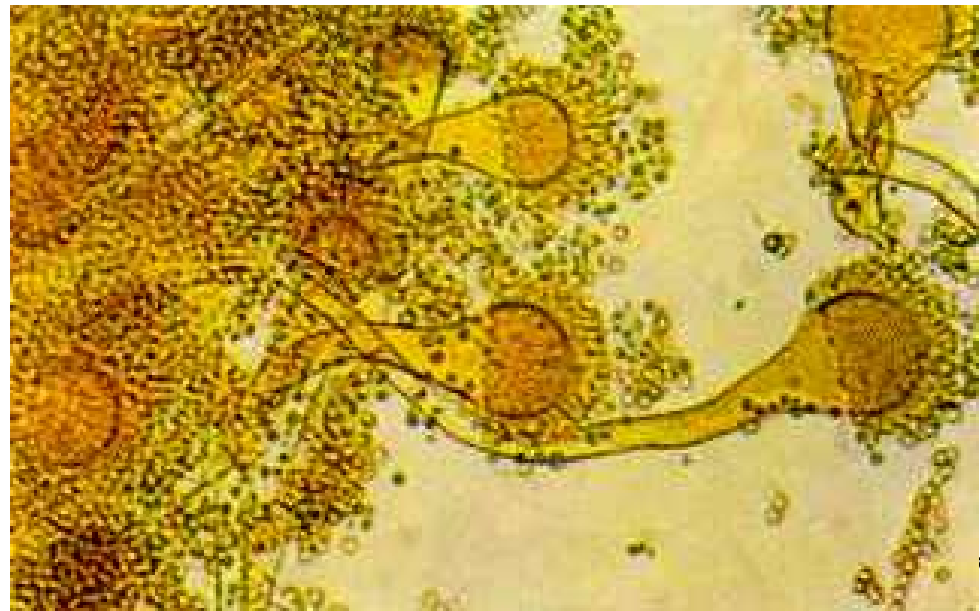
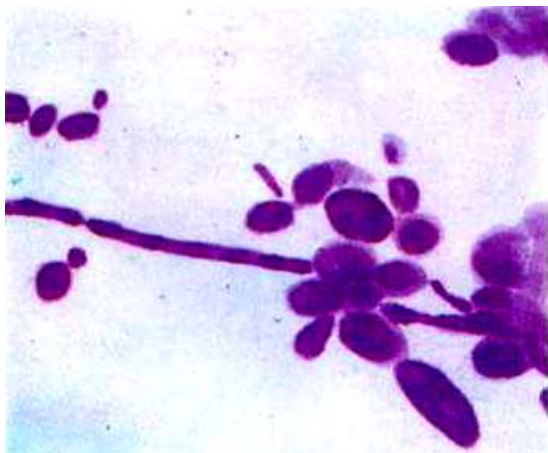
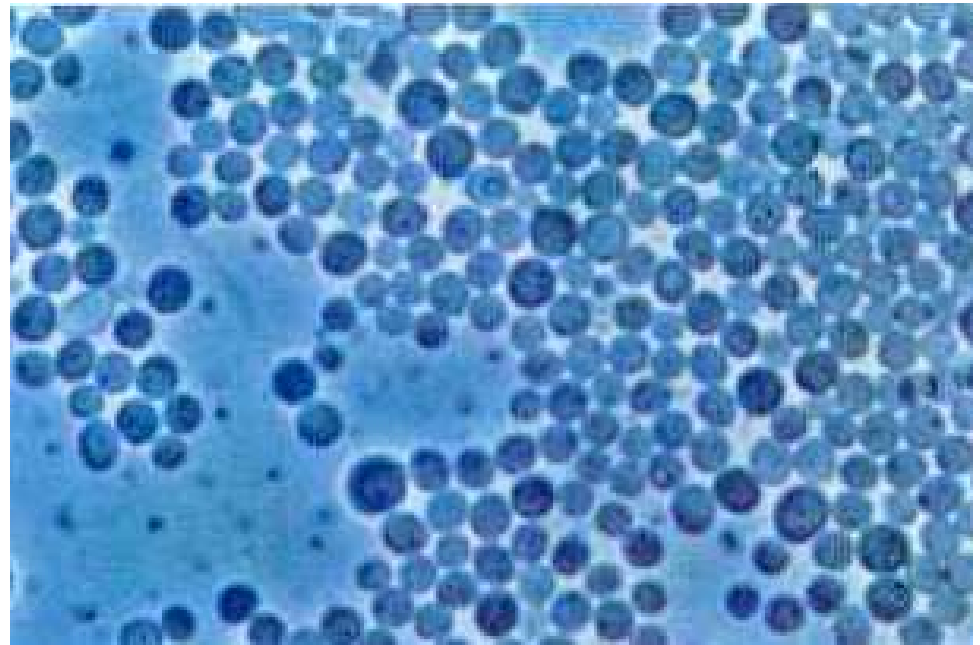
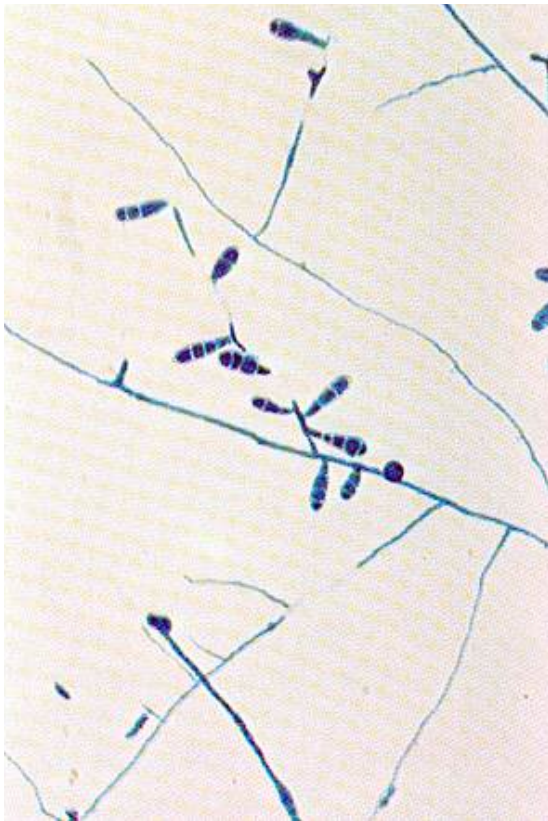
大肠杆菌

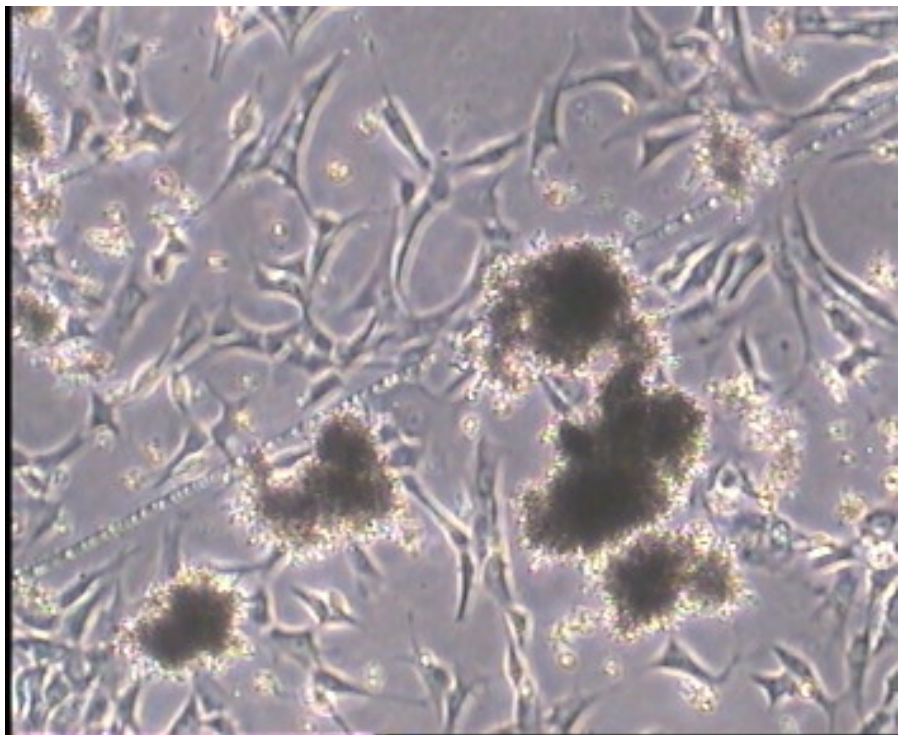
2、真菌的污染和检测

真菌污染是细胞培养过程中最常见的一种，最常见的真菌有烟曲霉、黑曲菌、孔子霉、毛霉菌、白色念珠菌和酵母菌。

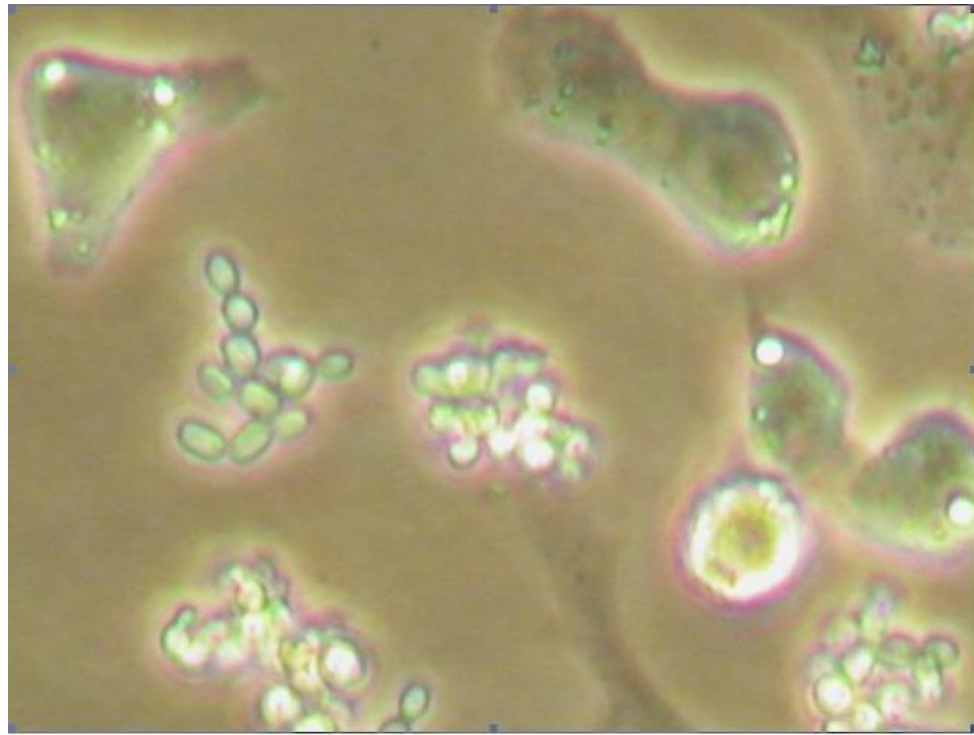
培养细胞受真菌污染后，可见培养液中漂浮着白色或浅黄色的小点，有的散在生长，培养液一般不发生混浊；倒置显微镜下可见丝状、管状或树枝状的菌丝纵横交错在细胞之间或培养基中，有的呈链状排列。

真菌污染后，细胞生长变慢，但最后由于营养耗尽及毒性作用而使细胞脱落死亡。

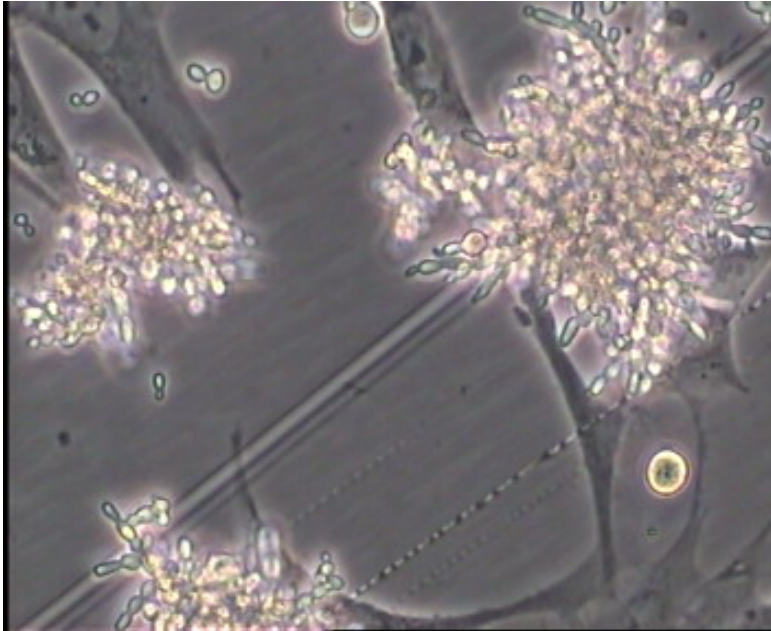




细胞被霉菌污染的镜检图



细胞被白色念球菌污染的镜检图



细胞被真菌污染的镜检图



丝状菌污染图片

无菌试验和测定菌数用培养基

品名	英文名	用途
硫乙醇酸盐培养基	Thioglycollate Medium	需氧菌、厌氧菌无菌试验
霉菌培养基	Mould Medium	霉菌无菌试验
改良马丁培养基	Modified Martin Medium	生物制品霉菌无菌试验
支原体半流体基础培养基	Mycoplasma Semifluid Base	生物制品支原体检查

外源性因子检测结果图

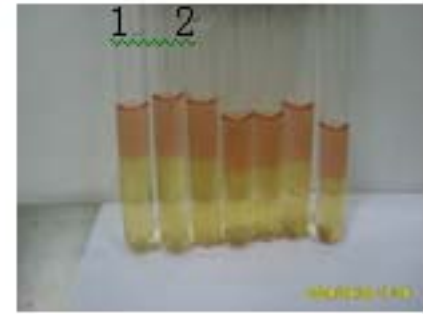
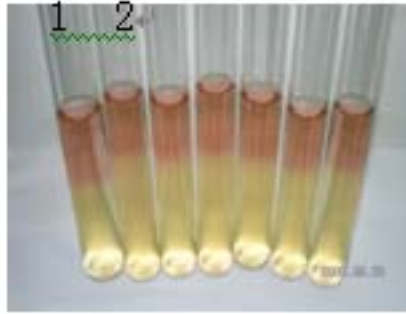
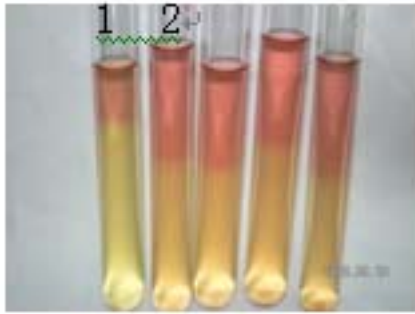


图1. 35度培养的接种14天后硫乙醇酸盐流体培养基

注：1，2为对照管；其余为实验管；各管均未见细菌生长



图2. 25度培养的接种14天后改良马丁培养基

注：1，2为对照管；其余为实验管；各管均未见真菌生长

3、支原体的污染和检测

支原体是介于细菌与病毒之间能独立生活的最小微生物，最小直径0.2 μm ，一般过滤除菌无法去除它，光镜下难以看清它的形态结构。开始不易发现，能在偏碱条件下生存，对青霉素有抗药性。多吸附于细胞表面或散在于细胞之间。

培养细胞受支原体污染后，部分敏感细胞可见细胞生长增殖变慢，部分细胞变圆，从瓶壁脱落。但多数细胞污染后无明显变化，或略有变化，若不及时处理，还会产生交叉污染。

造成支原体高污染率的原因

1. 支原体大小**0.1-0.8 um**，无细胞壁，可透过一般过滤膜（**0.22-0.45 um**）；
2. 支原体污染时，没有明显的肉眼或一般光学显微镜可观察到的特征变化；
3. 过去缺乏简单、快速且可靠的检测方式；
4. 细胞流通之间缺乏物品管理，造成实验室间的相互污染；
5. 研究或操作人员忽略污染问题；
6. 已受污染的细胞；
7. 已受污染的培养基、血清。

How frequently should I test my cells?

检测频率？

- **Whenever new cells enter the lab**
- **Before each liquid nitrogen storage**
- **Routinely every 2-3 months**
- **Weekly after contamination has been found in the laboratory**
- **When you believe that cells characteristics have been modified**
- 新细胞进入实验室
- 液氮保存前
- 定期每**2—3**个月
- 发现污染后每周
- 发现细胞特性改变

支原体之检测：

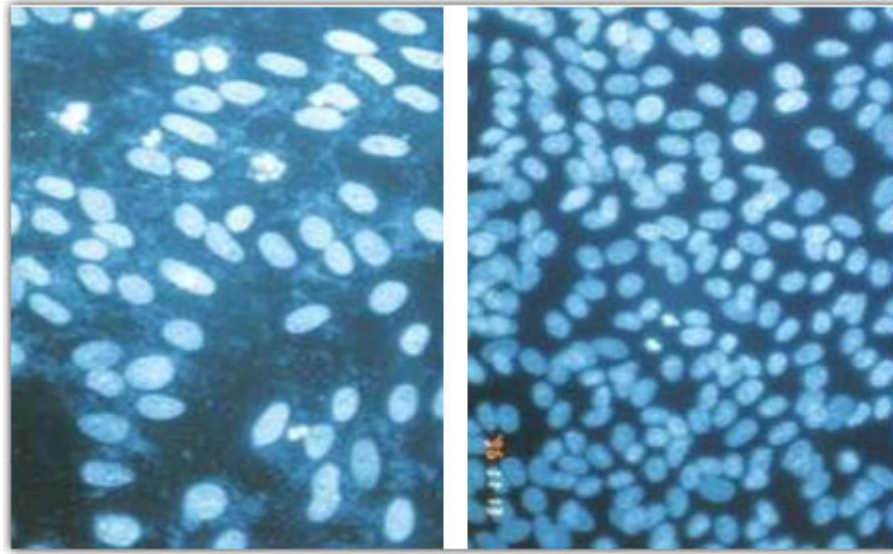
相差显微镜观察法

Hayflick培养基直接培养法

原理：直接培养支原体于培养基中，观察其生长及菌落生成。

特点：是目前最直接与灵敏之步骤，亦是用来评估其它侦测新步骤之标准步骤。

缺点：培养时间长，须3-5星期才能判断。有些支原体不能在培养基培养出来（例如**M. hyorhinis**）。需同时培养支原体株作为正反应对照组，可能会造成污染。



支原体污染照片。左图为阳性右图为阴性。

DNA荧光染色法

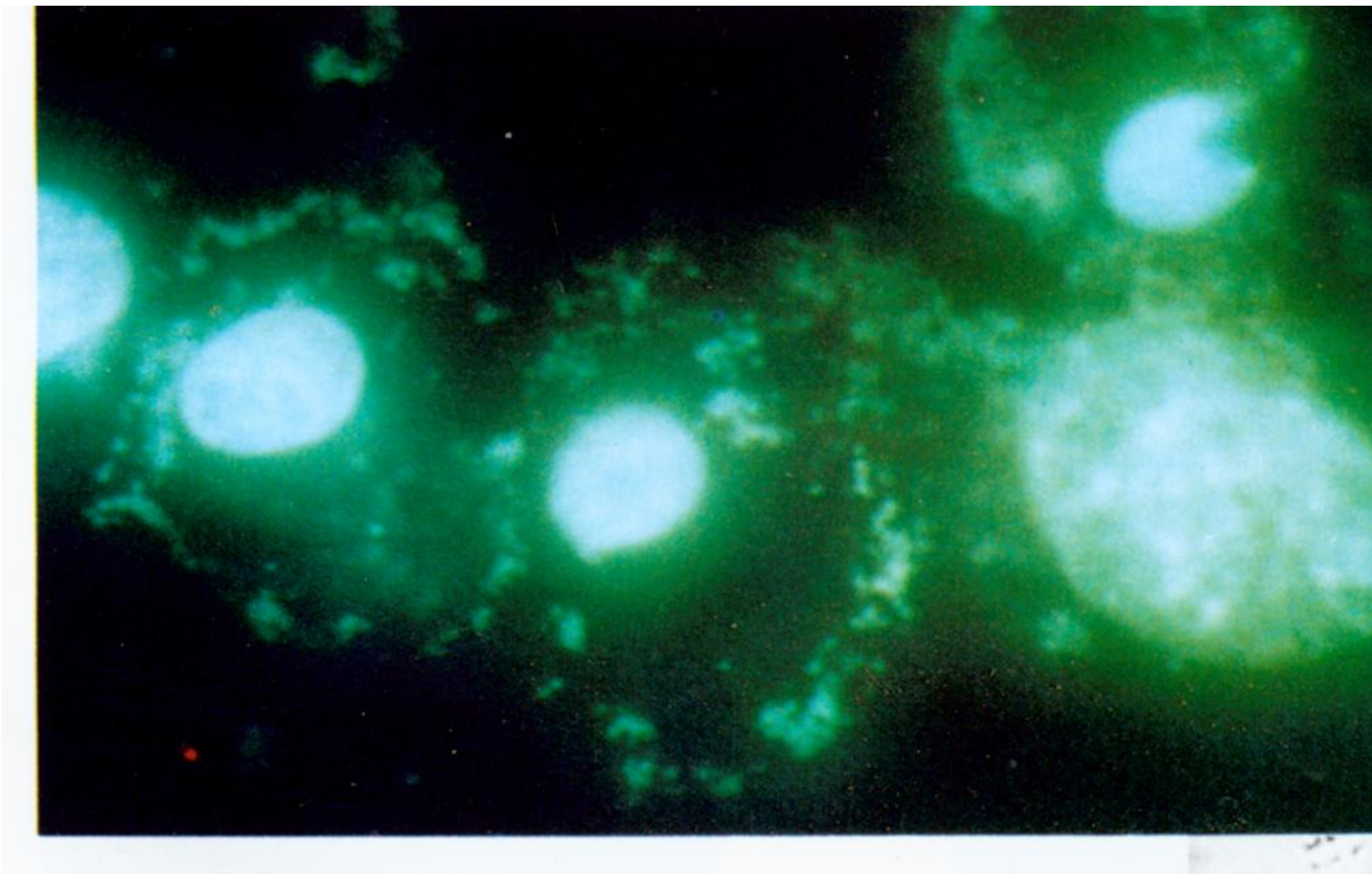
原理：利用荧光染料（bisbenzimidazole, **Hoechst 33258**）检测支原体污染。此染料会结合到DNA之Adenosine-Thymidine (A-T) rich区域，因为**支原体之DNA中A-T含量占多数（55~80%）**，所以可将其染色而检测。被支原体污染之细胞经染色后，在细胞核外与细胞周围可看到许多大小均一之荧光小点，即为支原体之DNA，证明有支原体之污染。

测试步骤用间接步骤，将待测细胞悬浮液或细胞培养液接种于指示细胞培养液中（indicator cell，例如Vero cell or 3T3 cell），然后培养指示细胞再作荧光染色。正负反应对照组亦可以接种于indicator cell内作为对照。

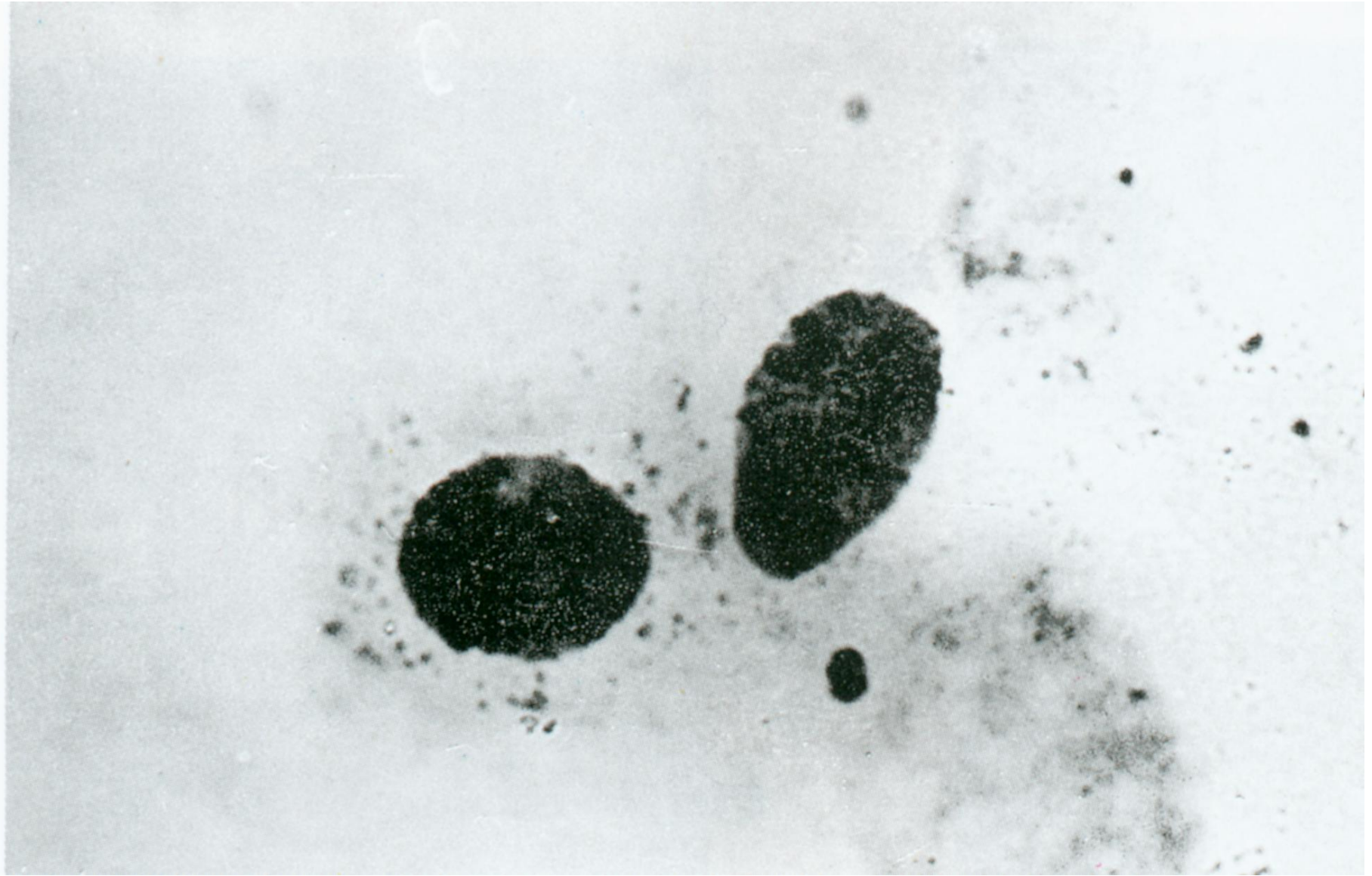
待测细胞亦可作直接测试，但需为吸附型细胞，培养后直接作荧光染色。有些细胞易有荧光背景，而干扰结果判读，则建议使用接种于指示细胞之步骤。

特点：简单、经济与灵敏，广泛使用，可作为例行之侦测步骤。可以侦测不易培养之支原体，例如M. hyorhinis，较直接培养法快，约一星期即可知道结果。

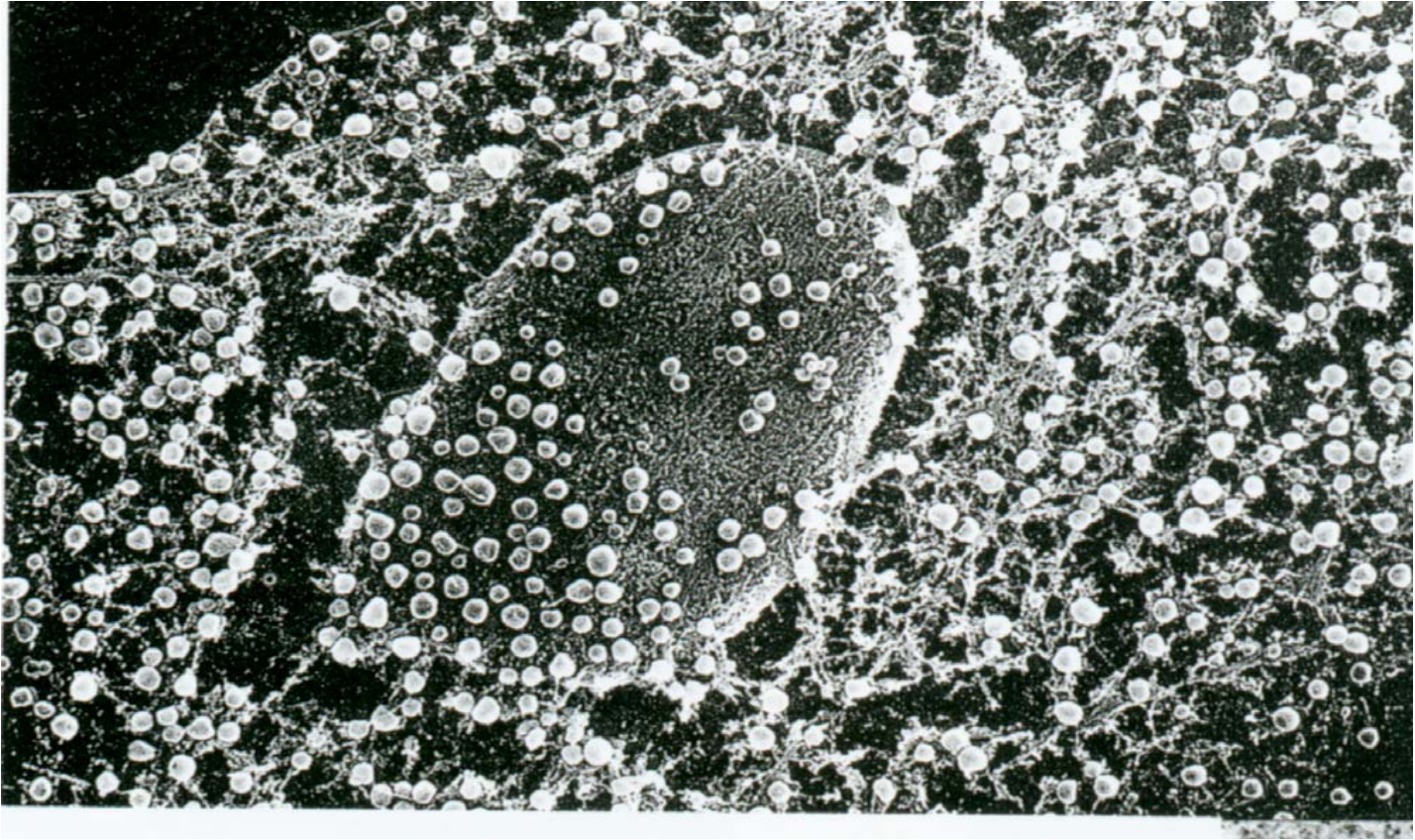
缺点：有时仍会有荧光背景，影响判读。



荧光染色法(33258)显示染色体，细胞周围亮点为支原体



Giemsa染色法，附于胞质上黑点为支原体



扫描电镜法显示支原体，附于细胞表面众多的圆形颗粒为支原体

PCR方法

支原体菌株来源：M.Arginini ATCC23838 精氨酸支原体，
M.Fermentane ATCC19989发酵支原体， M.Salivarium
ATCC23064唾液支原体，M.Hominis ATCC23114人型支原
体，M.Orale ATCC23714口腔支原体，M.Hyorhinis ATCC29052猪
鼻支原体。

其共同引物序列来自16s和23s保守区域：

外部引物为：

F 1 5' -ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT-3'，

R 1 5' -GTT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT-3'；

内部引物为：

F 2 5' - GTT CTT TGA AAA CTG AAT-3'，

R 2 5' -GCA TCC ACC CAA AAA CTC T-3'。

EZ-PCR Mycoplasma Test Kit

Cat. # 20-700-10 (10 assays)

Cat. # 20-700-20 (20 assays)

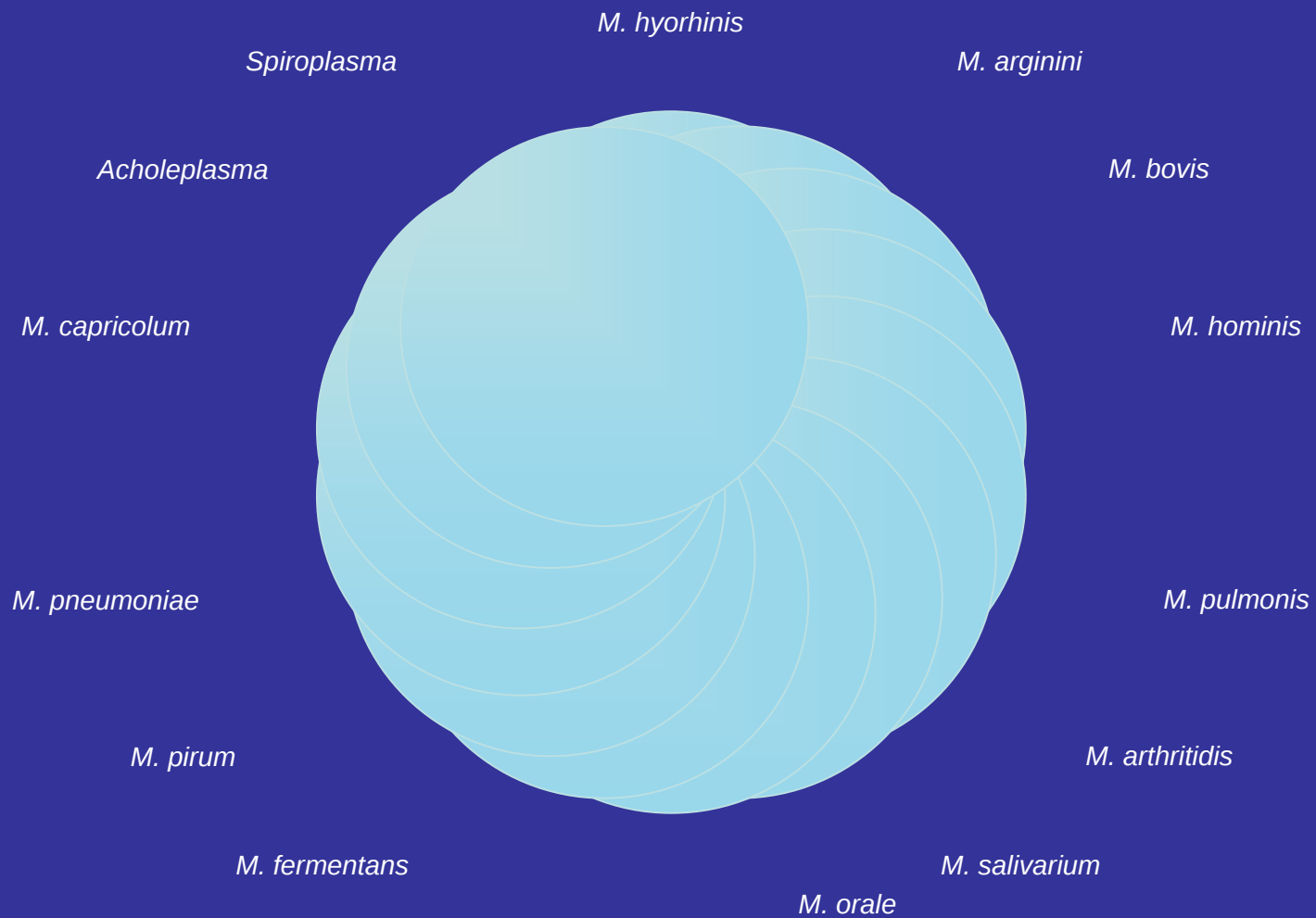
*Ready to use PCR mix for the detection
of mycoplasma in cell culture*

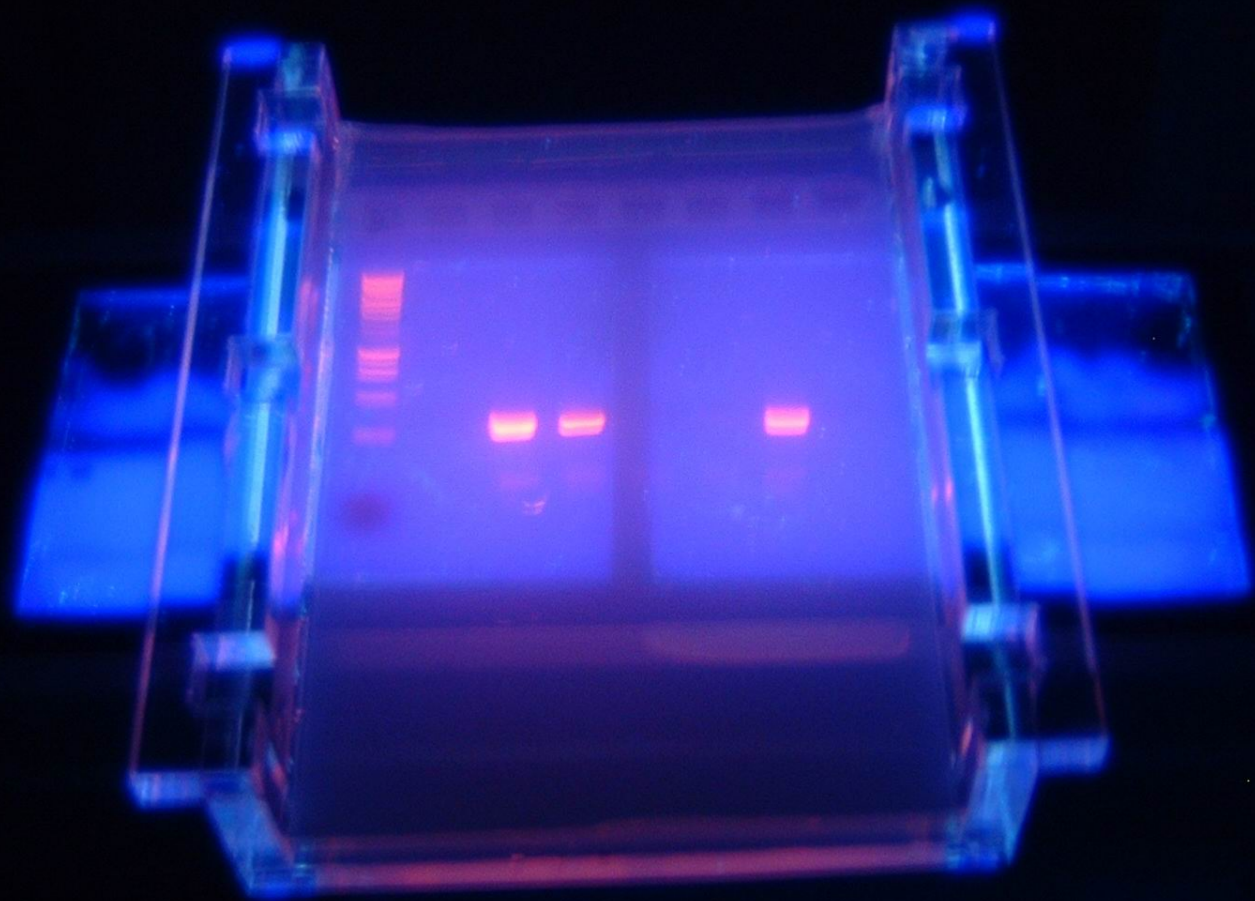
即用型细胞培养中支原体检测**PCR**试剂盒



The primer set allows detection of various mycoplasma species, with high sensitivity and specificity:

系列引物可以高特异性和高灵敏度地检测很多种支原体





支原体污染后的抗生素处理:

内酰胺类、万古霉素等: 不敏感

多粘菌素 (polymycin)、利福平、磺胺: 耐药

四环素类、大环内酯类及一些氟喹诺酮: 抑制

氨基糖苷类、氯霉素: 较小抑制作用

M-Plasmocin: InvivoGen公司研究开发, 有效地杀灭支原体

Biological Industries is now offering a combination of antibiotics, which have been shown to be effective in the elimination of mycoplasma species that account for 90% of the contamination found in cell cultures.

Biological Industries的抗生素系列产品能有效杀灭细胞培养中的**90%**以上的支原体

BIOMYC-3
(cat. # 03-038-1)



BIOMYC-1
(cat. # 03-036-1)
&
BIOMYC-2
(cat. # 03-037-1)

BIOMYC-1 & BIOMYC-2

BIOMYC-1 is based on the antibiotic tiamutin, which is produced by the fungus *pleurotus mutilus*.

成分为泰妙菌素.

BIOMYC-2 is based on minocycline, which is a tetracycline derivative.

二甲胺四环素，四环素衍生物.

These two antibiotic solutions are generally used sequentially in combination.

以上抗生素溶液一般按顺序联合使用.

BIOMYC-3

BIOMYC-3 is based on the ciprofloxacin antibiotic, which is a member of the fluoroquinolone group. Many mycoplasma species have been found to be sensitive to BIOMYC-3.

BIOMYC-3成分为氟喹酮类的环丙沙星，多种支原体对其敏感。

- Biomyc-1 + Biomyc-2 sequentially, or Biomyc-3 alone
- **Biomyc-1 + Biomyc-2**按顺序联合使用， **Biomyc-3** 单独使用
- Biomyc-1, Biomyc-2, Biomyc-3 together cover 90% of the species
- 三种同时能去除**90%**支原体
- There is no single antibiotic that covers the whole spectrum
- 没有一种抗生素能去除全部支原体
- We recommend to work in parallel to save time; Biomyc-1 + 2 with half the dishes and Biomyc-3 with the other half.
- 建议平行使用节约时间， **Biomyc-1 + 2** 用在一半的**Dish**中， 而**Biomyc-3** 用在另一半中。

常用抗生素用量和效应

抗生素	抗菌谱			常用浓度
	细菌	真菌	支原体	
青霉素	G+			100IU/ml
链霉素	G-			100μg/ml
庆大霉素	G+,G-		+	200μg/ml
卡那霉素	G+,G-		+	50μg/ml
四环素	G+,G-		+	10μg/ml
两性霉素		+		2 μg/ml
制霉菌素		+		25 μg/ml

4、病毒的污染和检测

细胞的直接观察

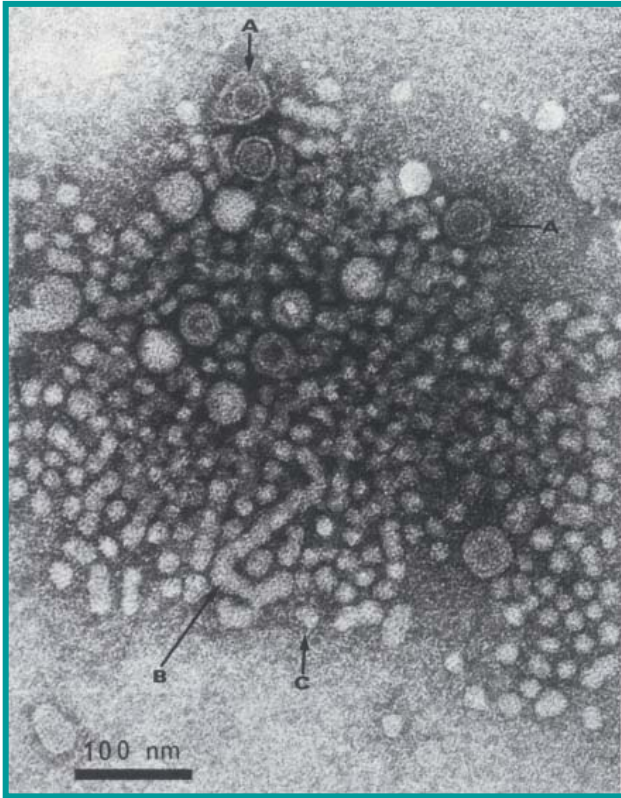
动物接种检查

电子显微镜观察

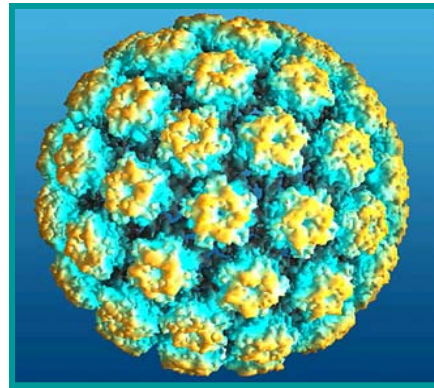
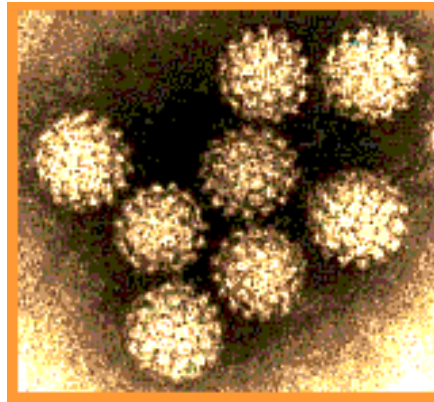
免疫学检查

PCR技术

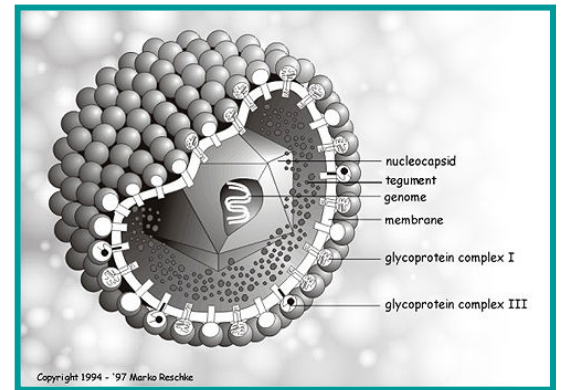
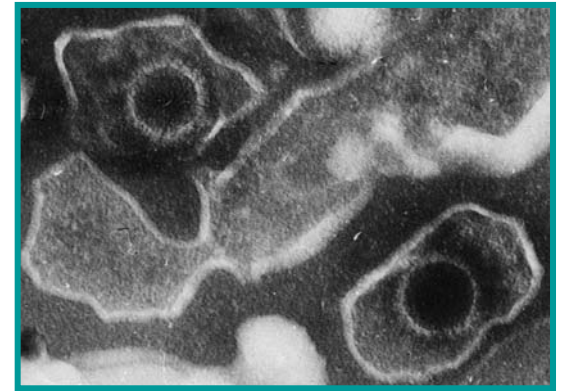
组织细胞培养过程中，如果没有除去潜在的病毒，就会产生病毒污染。
目前，从原代猴肾细胞的培养中已发现不少于20种血清性病毒。



HBV/HepG2.2.15



HPV/Hela

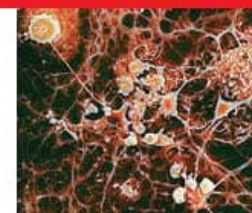


EBV/永生化B细胞

5、非同种细胞污染

由于细胞培养操作时各细胞株所需的器材和溶液没有严格分开，往往会使一种细胞被另一种细胞污染。目前，世界上已有几十种细胞都被HeLa细胞所污染，致使许多实验宣告无效。

非细胞培养物所造成的化学成分的污染也偶有发生，大多是由于细胞培养所需物品清洗消毒不彻底而带入一些有毒化学物质所致。

**HEALING CELLS**

Bone-marrow transplants cure obsessive-compulsive mice.

go.nature.com/TCIhZs

J. ZAJICEK/SPL

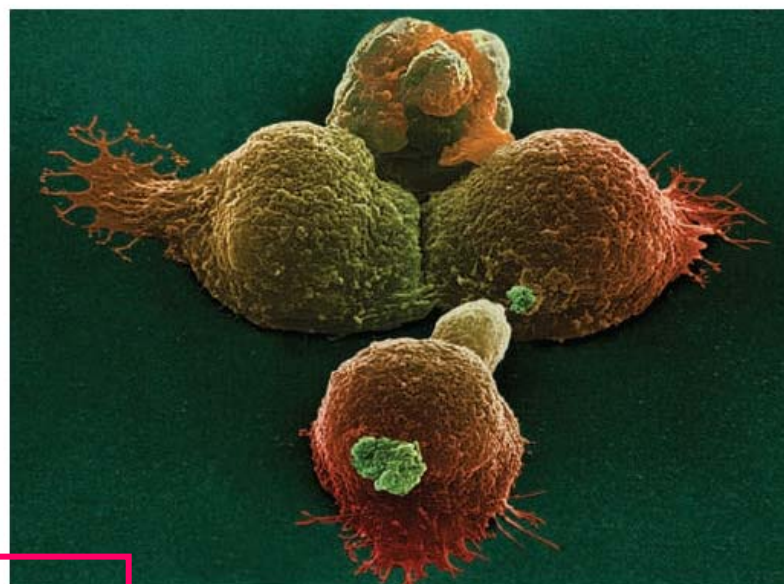
Biologists tackle cells' identity crisis

DNA fingerprinting scheme aims to make sure researchers are working on the right cells.

Ever since biologists learned how to grow human cells in culture half a century ago, the cells have been plagued by a problem of identity: many commonly used cell lines are not actually what researchers think they are.

Cell-line misidentification has led to mistakes in the literature, misguided research based on those results and millions wasted in grant money. Last year, *Nature* described the situation as a scandal¹.

But a universal system for determining the identity of cell lines may now be in view. Next month, a working group led by the American Type Culture Collection (ATCC), a nonprofit biological repository based in Manassas, Virginia, that stores 3,600 cell lines from more than 150 species, plans to unveil standardized protocols for verifying the identity of cultured cells using DNA fingerprinting. Labs worldwide — including repositories such as



Breast cancer cells: not always what they're supposed to be.

The working group, composed of representatives from academia, government and industry, as well as from other cell repositories, advocates verifying cells' identities by comparing their DNA in regions where short stretches of three

a universally accepted approach will allow different facilities to compare their cell lines with each other, he adds.

Fingerprinting has its limits, cautions Michael Johnson, a cancer researcher at Georgetown University in Washington DC. "Just because a cell fingerprints out as the same [as another cell] doesn't mean they will behave the same," he says, noting that a cell's properties can also be affected by the way it has been grown, the number of times it has been cultured anew and small genetic changes that wouldn't show up in a fingerprint test. One classic example, he notes, is an immortalized breast cell line called MCF10A, which can form organized hollow structures similar to those found in mammary tissue; MCF10A cells currently distributed by ATCC do not do this nearly as efficiently.

Cell solution

S. GSCHNEISSNER/SPL

6、黑胶虫污染

对于黑胶虫的分类，学术界没有明确给予说法。关于黑胶虫的分类，目前大部分人认为黑胶虫污染是微生物感染。在一些文章论述上把黑胶虫归为生物污染类型，但是没把它归为确定的生物分类类型，只是把黑胶虫独立为一种未知生物。而根据中国病毒所和军科院鉴定是一种寄生于牛血清内的一种原虫，似乎和草履虫和变形虫有类似之处，但是由于课题经费不够而不能继续下去，最终也没有有力证明黑胶虫是属于原虫。也有一些学者不认为所谓的黑胶虫污染是一种生物污染，而认为是细胞碎片类物质，是在细胞培养时，细胞衰亡破裂产生的；也有在文献中报道说是玻璃瓶中类似氧化硅的物质，那个文献很少人找得到；还有报道黑胶虫是一种纳米级的细菌。

形态上类似与杆状细菌，但长度比细菌长，直径约在0.5~1微米，不染色观察为黑色；胶虫成熟后呈线状，而且形态是椭圆形。

运动形式：在400X倒置显微镜小，有典型的布朗运动（不规则的原地小距离抖动），即很多细胞培养者看到的，像黑色的小虫游来游去。可以穿透滤膜，也可以通过空气传播，低倍下为黑色点状，高倍下可看见黑色的小虫游来游去。但是在物理学上来说，颗粒足够小，在液体中也是做布朗运动的，这不足以说明黑胶虫的布朗运动就证明它是生物。

成品检定

质量标准

检测项目	检测方法	质量标准
外观	肉眼观察（签发）	白色悬浊液
细胞数量	血球计数法（签发）	$\geq 1 \times 10^8$
存活率	台盼兰染色法（签发）	$\geq 90\%$
纯度	免疫荧光染色流式细胞仪检测法（签发）	$\geq 99\%$
无菌	革兰染色（签发）	阴性
	培养法：2005年中华人民共和国药典第三部》附录 XII A 支原体无菌检查法	阴性
支原体	PCR法（签发）	阴性
	培养法：《2005年中华人民共和国药典第三部》附录 XII B 支原体检查法	阴性
内毒素	鲎实验-LAL（签发）：《2005年中华人民共和国药典第三部》附录 XII E 细菌内毒素检查法	$\leq 1 \text{ EU/ml}$
生物学活性	体外杀伤（对人卵巢癌细胞系SKOV3或人肺鳞癌细胞系NCI-H520）MTT法	具有杀伤功能（效靶比为20:1时>20%）
鼠源性IgG残留	ELISA法：《2005年中华人民共和国药典第三部》附录 IX L 鼠IgG残留量测定法	$\leq 100 \text{ ng}$ 剂量 即 $\leq 1 \text{ ng/ml}$



Thank You