

常見的細胞培養問題

整理：洪啟仁/生資中心 副研究員

1. 解凍後觀察：

1-1 鏡檢 (Microscopic)	可能引起的原因	解決方式
1-1-1 細胞數少	<ol style="list-style-type: none"> 解凍後若以離心方式去除 DMSO，部分細胞未有效沈澱，細胞數將會減少。 有些細胞容易絮聚而沈積在冷凍管底部，若吸取細胞懸浮液前沒有充分混合均勻，則可能只吸到細胞數較少的上清液。 	<ol style="list-style-type: none"> 考慮直接將解凍後的細胞懸浮液加入含新鮮培養基中直接培養，細胞貼附後，第二天再更換培養基。 細胞解凍後 pipetting 5 至 7 次，混合均勻。
1-1-2 存活率不佳	<p>1-1-2-1</p> <p>有些細胞本身冷凍後存活率不佳或細胞數較少。</p>	<p>解凍後先培養在 T25 flask。</p>
	<p>1-1-2-2</p> <p>解凍後受 DMSO 毒害：</p> <ol style="list-style-type: none"> 細胞對 DMSO 的毒性較為敏感，例如：HL-60 細胞。 細胞解凍後，細胞懸浮液在冷凍管內時間拖太久。 解凍後的細胞懸浮液種至 (seeding) 含新鮮培養基的 flask 內，但由於培養基量太少而不足以稀釋 DMSO 的毒性。 	<ol style="list-style-type: none"> 解凍後的細胞必須立刻經由離心方式去除 DMSO。 先將所有實驗材料準備齊全，培養基預熱好再進行解凍。 至少加入 10ml 以上的新鮮培養基或使 DMSO 濃度在 1 % 以下。
	<p>1-1-2-3</p> <p>解凍前後受溫度變化之傷害：</p> <ol style="list-style-type: none"> 收到本所寄出的細胞後沒有馬上解凍培養或是暫存在 -80 °C 冰箱的時間太久。 	<ol style="list-style-type: none"> 收到細胞後最好是儘速解凍培養或暫存於 -80 °C 冰箱，並於翌日轉移到液氮筒內。若暫存

1-1-2 存 活 率 不 佳	<ol style="list-style-type: none"> 2. 從液氮筒將冷凍管取出至解凍這段期間沒有以乾冰或液氮攜帶。 3. 以瞬間加溫使冷凍管內的冰塊外圍融解，並將細胞冰塊取出加至新鮮培養基的方式解凍。(未待冷凍細胞完全溶解即操作)。 4. 有些細胞須培養於 28°C，培養基亦必須預熱至 28°C，但若以 37°C 操作則會使細胞凍後存活不佳。 	<p>於 -80°C 冰箱時，時間不宜太久，以 1-2 天為宜。</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 以乾冰或液氮暫存筒移送。 3. 將冷凍細胞迅速完全解凍後，經酒精擦拭冷凍管後，立刻移入無菌操作台操作。 3. 以 28°C 快速解凍。培養基亦預熱於 28°C 水浴槽，而非 37°C，如一般魚類細胞、昆蟲細胞、蚊子細胞等。
	<p>1-1-2-4</p> <p>滲透壓傷害(Osmotic damage)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 冷凍後的細胞懸浮液直接快速加入培養基中。 2. 解凍後的細胞懸浮液加入 PBS 以稀釋 DMSO 的毒性。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 將培養基以一滴一滴加入的方式加至細胞懸浮液中。若是直接 seeding 至 flask 中，除了上述的做法外，可將已裝有培養基的 flask 傾斜，然後加入細胞懸浮液使其沿著瓶壁慢慢滑入培養基中。 2. 改用培養基稀釋。
	<p>1-1-2-5</p> <p>沒有依照本所所建議使用的培養基。</p>	<p>冷凍細胞的活化，請絕對依照建議使用的培養基。待細胞生長良好且已保存一批冷凍備份細胞後，再進行其他培養基之置換工作。</p>

2. 解凍後數日及繼代培養後觀察:(參考文獻 1 和 2)

2-1 巨觀(Macroscopic)		
依培養基顏色判斷	可能引起的原因	解決方式
2-1-1 呈黃色混濁	污染。很可能是細菌或酵母菌污染。	丟棄已污染的細胞。
2-1-2 黃色澄清	<ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞已長滿或過度長滿。 2. 培養基太酸，但並不是因為細胞代謝所導致的，而是因為培養箱中過高濃度 CO₂ 造成。 3. 黴漿菌污染。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 立刻繼代培養。 2. 根據細胞的需求給予適當濃度的 CO₂，並檢查培養箱之 CO₂ 濃度是否正確。 3. 進行黴漿菌檢測，若為 positive，丟棄之。
2-1-3 明亮紫紅色	培養基太鹼 <ol style="list-style-type: none"> 1. 最有可能是培養箱中過低濃度的 CO₂ 所造成。 2. 瓶蓋鎖太緊或未鬆開。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 檢查 CO₂ 供應是否正常。 2. 將蓋子稍微旋鬆。
2-1-4 類似綿花狀的漂浮物	可能是真菌污染。這類的污染在早期並不會使得培養基變黃。但在顯微鏡下可觀察到菌絲體。	丟棄已污染的細胞。另外，必須檢視培養箱內有無這類真菌的污染，因為污染的細胞培養基溢出時可能會促進該類真菌的生長。
2-2 鏡檢(Microscopic)		
	可能引起的原因	解決方式
2-2-1 細胞生長狀態不佳	<ol style="list-style-type: none"> 1. 黴漿菌污染。 2. 細菌所引起的慢性、較低程度的感染。 3. 培養基成分改變。有些細胞對此種改變特別敏感，例如更換新的血清；使用過 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 做污染檢測，若有黴漿菌污染則丟棄。 2. 污染檢測。 3. 培養基及其它添加物使用前必須更特別注意。

(附註 ^a)	<p>期的 glutamine 及其它添加成分、較差的水質、或是少加了某些添加物(例如 nonessential amino acid)。</p> <p>4. 貼附性細胞繼代培養時過度地 trypsinized, 或是稀釋比例(split ratio)過高。</p>	<p>4. Trypsin 作用時應以倒立顯微鏡觀察細胞脫落的情形, 並適時終止 trypsin 作用。使用 trypsin 時應注意其保存期限及使用的次數, 避免 trypsin 失活。</p>
<p>2-2-2 一串串珠狀物</p>	<p>酵母菌生長而成之成串的珠狀物。大約比細胞小 5~10 倍。</p>	<p>直接丟棄。</p>
<p>2-2-3 生長太慢</p>	<p>通常是黴漿菌所引起, 但仍有許多其它的可能性會導致生長過慢:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培養基過期或是沒有適當的貯存。 2. Glutamine 貯存時間太長。 3. 血清-更換使用其它批號或品牌的血清或是血清種類使用錯誤, 又或者是濃度配製錯誤。 4. 培養箱的溫度或是二氧化碳的濃度不對。 5. 培養器材和培養基成分應選用細胞培養用的等級。 6. 處理細胞之程序不佳, 例如 trypsin 作用時間過長; 細胞長太滿才繼代培養; 或是繼代培養的稀釋比例太高。 	
<p>2-2-5 特性改變</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 培養基不正確(但細胞仍可生長)。 2. 長期繼代, 自然篩選結果。 3. 培養基不正確(但細胞仍可生長)。 4. 長期繼代, 自然篩選結果。 	<p>建議停止繼續使用, 除非對這種特性改變, 有研究之價值, 另當別論。</p>

附註^a: 細胞生長狀態不佳可能產生的現象:

懸浮細胞會以半貼附、暗沈、生長不良、粗糙不平整、細胞周圍含有囊泡並含有大量的細胞碎片。貼附性細胞除了上述特徵外, 細胞容易脫離底部。

參考文獻:

1. Darling, D.C. and Morgan, S.J. (1994) Animal cells culture and media. Wiley. John Wiley & Sons. Inc., publication.
2. Freshney, R.I.(2000) Culture of animal cells.4th ed. Wiley-Liss. John Wiley & Sons. Inc., publication.