

# 细胞培养技术常见问题解答

## 一、细胞培养基础问答

### 1.BHK 细胞就是指 BHK21 吗？

答：BHK 细胞是指幼年叙利亚地鼠肾细胞（Baby Hamster Syrian Kidney），1961 年建株。原始的细胞株是成纤维细胞，贴壁依赖性。1963 年获得单细胞克隆细胞。后经无数次传代后细胞可悬浮生长，它广泛用于增殖各种病毒，生产兽用疫苗。最常用的是 BHK21 的一个亚克隆细胞，即克隆 13 或 C13。

### 2.二倍体细胞有什么特点？

答：二倍体细胞的染色体组型是 2n 核型；贴壁依赖接触抑制；一般可传代 50 代；无致癌性。如 W1-38：正常胚肺组织人二倍体细胞系。MRC-5：从正常男性肺组织中获得的人二倍体细胞系。

### 3.什么是动物细胞大规模培养？

答：所谓动物细胞大规模培养技术（large-scale culture technology）是指在人工条件下（设定 pH、温度、溶氧等），在细胞生物反应器（bioreactor）中高密度大量培养动物细胞用于生产生物制品的技术。目前可大规模培养的动物细胞有鸡胚、猪肾、猴肾、地鼠肾等多种原代细胞及人二倍体细胞、CHO（中华仓鼠卵巢）细胞、BHK-21、Vero 细胞(非洲绿猴肾传代细胞)等，并已成功生产了包括狂犬病疫苗、口蹄疫疫苗、甲型肝炎疫苗、乙型肝炎疫苗、红细胞生成素、单克隆抗体等产品。

在过去几十年来，细胞培养技术经有了很大发展，从使用转瓶(roller bottle)、CellCube 等贴壁细胞培养，发展为生物反应器（Bioreactor）进行大规模细胞培养。

### 4.细胞体内外培养的差别是什么？

答：细胞离体后，失去了神经体液的调节和细胞间的相互影响，生活在缺乏动态平衡相对稳定环境中，日久天长，易发生如下变化：分化现象减弱；形态功能趋于单一化或生存一定时间后衰退死亡；或发生转化获得不死性，变成可无限生长的连续细胞系或恶性细胞系。因此，培养中的细胞可视为一种在特定的条件下的细胞群体，它们既保持着与体内细胞相同的基本结构和功能，也有一些不同于体内细胞的性状。实际上从细胞一旦被置于体外培养后，这种差异就开始发生了。

### 5.什么是无血清培养基？与普通培养基有什么区别？

答：无血清培养基(serum free medium,SFM):是不需要添加血清就可以维持细胞在体外较长时间生长繁殖的合成培养基。但是它们可能包含个别蛋白或大量蛋白组分。基本成分为基础培养基及添加组分两大部分。添加组分可能包括纤连蛋白、层粘连蛋白等贴壁因子、胰岛素、转铁蛋白、硒等。

## 6.什么是无血清无动物组分培养基、无蛋白培养基和限定化学成分培养基？

答：无血清无动物组分培养基是不含任何动物来源成份的无血清培养基，但可能添加植物蛋白或重组蛋白。无蛋白培养基（protein free medium,PFM）：即不含有蛋白的培养基，无论是植物蛋白或动物蛋白。成分培养基(chemical defined medium,CDM):是指培养基中的营养成分都是明确的，它同样不含有蛋白，也不是添加了植物水解物，而是使用了一些已知结构与功能的小分子化合物，如短肽等。这种培养基更有利于分析细胞的分泌产物和产品纯化。

## 7. HEPES 在细胞培养过程中起什么作用？

答：HEPES 溶液：是一种弱酸，中文名字是羟乙基哌嗪乙磺酸，主要作用是防止培养基 pH 迅速变动。在开放式培养条件下，观察细胞时培养基脱离了 5%CO<sub>2</sub> 的环境，CO<sub>2</sub> 气体迅速逸出，pH 迅速升高，若加了 HEPES，此时可以维持 pH7.0 左右。一般在进行克隆化培养时要添加 HEPES。

## 8.CO<sub>2</sub> 培养箱之水盘如何保持清洁？

答：定期(至少每两周一次) 以无菌蒸馏水或无菌去离子水更换之。

## 二、 培养基生产和使用常见问题

### 1. 低血清培养基能用肉眼判断其 pH 值吗？

答：低血清培养基中酚红的含量与普通培养基中的酚红含量不同，不能通过肉眼观察或通过经验来判定 pH 值，建议使用 pH 计进行测定。

### 2.低血清培养基的缓冲系统是什么？

答：平衡盐一般是由无机盐及葡萄糖组成的。平衡盐有 Hanks'系统、Earle's 系统、Dulbecco's 磷酸缓冲盐系统等。199 系列培养基、MEM 系列培养基均有 Hanks'系统的培养基及 Earle's 系统的培养基。但是有些培养基均不是以上常规的平衡盐系统，例如 RPMI 1640 培养基、F12 培养基。MEM(SLM)低血清培养基的平衡盐系统也不是常规的平衡盐系统，该平衡盐系统的缓冲能力强于常规平衡盐系统的缓冲能力。

### 3.谷氨酰胺溶液和碳酸氢钠的配制方法是什么？

答：以 0.2mol/L 的 L-谷氨酰胺配制为例：称取 L-谷氨酰胺 2.92g，加注射用水 100ml，充分搅拌混匀。用 0.2μm 滤膜正压过滤除菌。溶液应在 4℃下避光保存，2 周内使用。以 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 的配制为例：称取 NaHCO<sub>3</sub> 37.5g 溶于 100ml 蒸馏水中过滤除菌。

#### 4.什么培养基中可以省去加酚红？

答：酚红在培养基中用作 pH 值的指示剂：中性时为红色，酸性时为黄色，碱性时为紫色。酚红本身对生物制品质量并不会产生影响，可以通过纯化技术去除，但酚红在无血清培养基可能带来胞内钠/钾失衡，影响细胞生长，当然这种作用能被血清所中和或减轻。酚红并不是培养基中必需的一种成分，很多国外的疫苗或抗体生产企业在生产过程中都使用无酚红培养基。

#### 5.放置在冰箱中的培养基颜色会发生变化，为什么？

答：培养基保存于 4℃ 冰箱中，培养基内 CO<sub>2</sub> 会逐渐溢出，造成培养基越来越偏碱性。而培养基中酸碱指示剂（通常为 phenol red）的颜色也会随碱性增加而更偏暗红。培养基偏碱后再用于细胞培养将造成细胞生长停滞或死亡。培养基偏碱时，可以通入无菌过滤的 CO<sub>2</sub>，以调整 pH 值。

#### 6.无血清培养与有血清培养使用的抗生素量一样吗？

答：当在无血清培养基中添加抗生素时，降低至少在有血清培养基中所使用浓度的 50%。因为血清中的蛋白会结合和灭活一些抗生素。而在无血清培养条件下，抗生素不被灭活。

#### 7.培养基中添加了血清和抗生素后，可长期保存吗？

答：一旦您在新鲜培养基中添加了血清和抗生素时，您应该在两到三周内使用它。因为一些抗生素和血清中的基本成分在解冻后就开始降解。

#### 8.什么是个性化培养基？它有什么优点？

答：根据细胞类型、培养方式和生产工艺等特点所定制的培养基，即个性化培养基。个性化培养基在国外生物制药企业被普遍采用，个性化培养基可以为细胞生长提供充足的营养物质，能提高细胞的生长速率、培养密度、以及延长细胞维持时间；也可以为细胞生长提供均衡的营养供给，减少细胞有害代谢物质的积累，降低对细胞生长的危害；同时对贴壁细胞而言，能增加细胞的贴壁性，并降低培养过程中剪切力对细胞的损伤；个性化培养基可以根据各户的特殊需求减少或不使用动物源成分，从而使生物制品安全性更有保障。

。

#### 9.细胞培养基偶然被冻，可否继续使用？

答：如果细胞培养基偶然被冻，您应该自然溶解培养基并观察是否有沉淀产生。如果没有沉淀产生，培养基可以正常使用，如果出现沉淀，只能丢弃这些培养基。

#### 10.细胞冷冻培养基之成份为何？

答：动物细胞冷冻保存时最常使用的冷冻培养基是含 5 - 10%DMSO (dimethyl sulfoxide) 和 90 - 95%原来细胞生长用的新鲜培养基均匀混合。注意：由于 DMSO 稀释时会放出大量热能，故不可将 DMSO 直接加入细胞液中，必须使用前先行配制完成。

#### **11.培养基及其它添加物和试剂可反复冻融吗？**

答：大部分添加物和试剂最多可以冻融 3 次，如果次数过多会将使含有的蛋白发生降解和沉淀，这将会影响它的性能。

#### **12.液体培养基的保存是冷藏好？还是冷冻好？**

答：要冷藏！！通常液体培养基在冷藏条件下可存放 6 个月到一年。

### **三、常见血清使用问题**

#### **1.血清使用时一定需要灭活么？**

答：实验显示，经过正确处理的热灭活血清对大多数的细胞而言是不需要的。经此处理过的血清对细胞的生长只有微小的促进，或完全没有任何作用，甚至因为高温处理影响了血清的质量，而造成细胞生长速率的降低。而经过热处理的血清，沉淀物的形成会显著的增多，这些沉淀物在倒置显微镜下观察，像是“小黑点”，常常会让研究者误以为是血清遭受污染，而把血清放在 37℃环境中，又会使此沉淀物更增多，使研究者误认为是微生物的分裂扩增。若非必须，可以不需要做热处理这一步。不但节省时间，更确保血清的质量。

#### **2.何谓 F, FCS, CS, HS？**

答：F (fetal bovine serum) 和 FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，两者都是指胎牛血清，FCS 乃错误的使用字眼，请不要再使用。CS (calf serum) 则是指小牛血清。HS (horseserum) 则是指马血清。

#### **3.保存血清最好的方法是什么？**

答：我们建议血清应保存在-5℃至-20℃。若存放于 4℃时，请勿超过一个月。若一次无法用完一瓶，建议无菌分装血清至恰当的灭菌容器内，再放回冷冻。

#### **4.如何解冻血清才不会使产品质量受损？**

答：将血清从冷冻箱取出后，先置于 2~8℃ 冰箱使之融解，然后在室温下使之全融。但必须注意的是，融解过程中必须规则地摇晃均匀。

#### 5.血清解冻后发现絮状沉淀物出现，该如何处理？

答：血清中沉淀物的出现有许多种原因，但最普遍的原因是由于血清中脂蛋白的变性所造成，而血纤维蛋白(形成凝血的蛋白之一)在血清解冻后，也会存在于血清中，亦是造成沉淀物的原因之一。但这些絮状沉淀物，并不影响血清本身的质量。若欲去除这些絮状沉淀物，可以将血清分装至无菌离心管内，以 400g 稍微离心，上清液即可接着加入培养基内一起过滤。最好不使用过滤的方法去除这些絮状沉淀物，因为它可能会阻塞过滤膜。

#### 6.如何避免血清中沉淀物的产生？

答：(1)解冻血清时，请按照所建议的逐步解冻法(-20℃ 至 4℃ 至室温)，若血清解冻时改变的温度太大(如-20℃ 至 37℃)，非常容易产生沉淀物。

(2)解冻血清时，请随时将之摇晃均匀，使温度及成分均一，减少沉淀的发生。

(3)请勿将血清置于 37℃ 太久。若在 37℃ 放置太久，血清会变得混浊，同时血清中许多较不稳定的成分会因此受到损害，而影响血清的质量。

(4)血清的热灭活非常容易造成沉淀物的增多，若非必要，可以无须做此步骤。

(5)若必须做血清的热灭活，请遵守 56℃，30 分钟的原则，并且随时摇晃均匀。温度过高，时间过久或摇晃不均匀，都会造成沉淀物的增多。

### 四、细胞培养常用试剂使用问答

#### 1.谷氨酰胺使用方法是什么？

答：谷氨酰胺在溶液中很不稳定，故 4℃ 下放置 1 周可分解 50%，使用中最好单独配制，置-20℃ 冰箱中保存，用前加入培养液中。

#### 2.碳酸氢钠在室温条件存放是否稳定？

答：碳酸氢钠白色粉末，或不透明单斜晶系细微结晶。比重 2.159。无臭、味咸，可溶于水，微溶于乙醇。其水溶液因水解而呈微碱性，受热易分解，在 65℃ 以上迅速分解，在 270℃ 时完全失去二氧化碳，在干燥空气中无变化，在潮湿空气中缓慢分解。

#### 3.培养细胞生长减慢的原因有哪些？其解决办法有哪些？

答：可能得原因有：更换了不同的培养液或血清；培养液中一些细胞生长必需成分如谷氨酰胺或生长因子等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找出可能的原因。

解决办法：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等；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；分离培养物，检测支原体。

#### 4.L-谷氨酰胺在细胞培养中重要吗？它在溶液中不稳定吗？

答：L-谷氨酰胺在细胞培养时非常重要的。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，降解率随保存温度而变。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。

#### 5.细胞传代消化时所用胰酶浓度越高越好吗？

答：不见得！因为胰蛋白酶溶液的消化能力是和溶液的pH、温度、胰酶浓度及溶液中是否含有Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>离子和血清等因素有关。通常情况下，pH 8.0，温度 37 °C 其作用能力最强。另外，钙、镁离子及血清均能大大降低其消化能力。我们每次进行传代消化前，一定要用D-Hanks液或液反复冲洗细胞培养瓶，以便于将含血清的培养基冲洗干净，这样就能大大提高消化液的消化能力。通常使用的消化液浓度为：

（1）0.05%胰蛋白酶+0.02%EDTA；

（2）0.25% 胰蛋白酶

多数细胞传代消化可使用0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA这种消化液。

#### 6.二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？

答：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。

#### 7.GlutaMAX-I是什么？培养细胞如何利用GlutaMAX-I？这个二肽有多稳定？

答：GlutaMAX-I即谷丙氨酸二肽，是一个L-谷氨酰胺的衍生物，其不稳定的alpha-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

#### 8.培养基中丙酮酸钠的作用是什么？



答：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(H)和 Earle's 平衡盐溶液(E)有什么本质的功能差别？

答：H 和 E 的主要差别在于碳酸氢钠的水平,在 Eagle's (2.2g/L)中比在 Hanks' (0.35g/L) 中高。碳酸氢钠需用高水平的 CO<sub>2</sub> 平衡，以维持溶液的 PH 值。Eagle's 液在空气水平的 CO<sub>2</sub> 中，溶液会变碱，Hanks' 液在 CO<sub>2</sub> 培养箱中会变酸。如果希望在 CO<sub>2</sub> 培养箱中保存组织，需要用 Eagle's 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。

## 五、细胞培养过程常见问题

### 1.为什么培养的细胞要及时传代？

答：体外培养的细胞大多具有生长接触抑制的特性，也就是说当一个细胞被其他细胞包围的时候，它就会停止生长，及时传代后，细胞的生长得以继续。

### 2.培养液 pH 下降很快可能原因有哪些？其解决办法是什么？

答：通常细胞生长得非常快时，pH 值通常下降得很快。此时可以及时传代、提高传代比例或降低血清量等方法进行解决。此外，培养瓶盖拧得太紧、NaHCO<sub>3</sub> 缓冲系统缓冲能力不够、培养液中盐浓度不正确、细菌、酵母或真菌污染等也能导致 pH 值通常下降得很快。

（1）按培养液中 NaHCO<sub>3</sub> 浓度增加或减少培养箱内 CO<sub>2</sub> 浓度，2.0g/L 到 3.7g/L 浓度 NaHCO<sub>3</sub> 对应 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%到 10%。

（2）改用不依赖 CO<sub>2</sub> 培养液。

（3）松开瓶盖 1/4 圈。加 HEPES 缓冲液至 10 到 25mM 终浓度。

（4）在 CO<sub>2</sub> 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。

（5）如果是污染造成的则丢弃培养物或用抗生素除菌。

### 3.培养液 pH 对细胞生长的影响？

答：由于大多数细胞适宜 pH 为 7.2-7.4，偏离此范围可能对细胞生长将产生有害的影响。但各种细胞对 pH 的要求也不完全相同，原代培养细胞一般对 pH 变动耐受差，无限细胞系耐受力强。但总体来说，细胞耐酸性比耐碱性强一些。在配制培养用液时，需要注意一点：培新配的培养基在经过 0.10um 或 0.22um 滤膜过滤时，溶液的 pH 还会向上浮动 0.2 左右。

### 4.购买之细胞冷冻管经解冻后，为何会发生细胞数目太少之情形？

答：研究人员在冷冻细胞之培养时出现细胞数目太少，大都是因为离心过程操作上的失误，造成细胞的物理性损伤，以及细胞流失。建议细胞解冻后不要立刻离心，应待细胞生长隔夜后再更换培养基即可。但对于 DMSO 敏感的细胞，还是复苏细胞时，用离心去除 DMSO 比较好。

#### 5.购买之细胞死亡或细胞存活率不佳可能原因？

答：研究人员在细胞培养时出现存活率不佳，原因比较复杂，常见原因可归纳为：培养基使用错误或培养基品质不佳；血清使用错误或血清的品质不佳；解冻过程错误；冷冻细胞解冻后，加以洗涤细胞和离心；悬浮细胞误认为死细胞；培养温度使用错误；细胞置于-80℃太久等。建议严格参照 ATCC 或 ECACC 的标准操作规程进行细胞复苏、冻存等工作。

#### 6.支原体污染会对细胞培养有何影响？

答：支原体污染几乎可影响所有细胞之生长参数、代谢及研究之任一数据。故进行实验前，必须确认细胞为 mycoplasma-free，实验结果之数据方有意义。

#### 7.冷冻保存细胞之方法？

答：冷冻保存方法一：冷冻管置于 4℃（30—60 分钟）→-20℃（30 分钟）→ -80℃（16—18 小时或隔夜）→ 液氮罐长期储存。

冷冻保存方法二：冷冻管置于已设定程序之可程序降温机中每分钟降 1-3℃至-80℃以下，再放入液氮中长期储存。注意：-20℃不可超过 1 小时，以防止冰晶过大，造成细胞大量死亡，亦可跳过此步骤直接放入-80℃冰箱中，惟存活率稍微降低一些。

#### 8.悬浮细胞应如何继代处理？

答：一般仅需持续加入新鲜培养基于原培养瓶中，稀释细胞浓度即可。若培养液太多时可分瓶取出一部份含细胞之培养液至另一新的培养瓶中，加入新鲜培养基稀释至适当浓度，重复前述步骤即可。

#### 9.欲将一般动物细胞离心下来，其离心速率应为多少转速？

答：欲回收动物细胞，其离心速率一般为 300×g (约 1,000rpm)，5 - 10 分钟，过高之转速过长时间都将造成细胞死亡。合适的离心转速是根据相对离心力决定。  $RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$ ，其中 r 为离心机转轴中心与离心套管底部内壁的距离；rpm 为离心机每分钟的转数；RCF(relative eentrifugal force)为相对离心力，以重力加速度 g（980.66cm/s<sup>2</sup>）的倍数来表示单位。



#### 10.培养细胞时应使用 5%还是 10%CO<sub>2</sub>，或者根本没有影响？

答：一般培养基中大都使用 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/H<sup>+</sup> 作为 pH 的缓冲系统，而培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 的含量将决定细胞培养时应使用的 CO<sub>2</sub> 浓度。当培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 含量为每公升 3.7g 时，细胞培养时应使用 10% CO<sub>2</sub>；当培养基中 NaHCO<sub>3</sub> 为每公升 1.5g 时，则应使用 5%CO<sub>2</sub> 培养细胞。

#### 11.细胞冷冻管解冻培养时，是否应马上去除 DMSO？

答：除少数特别注明对 DMSO 敏感之细胞外，绝大部分细胞株（包括悬浮性细胞），在解冻之后，应直接放入含有 10-15ml 新鲜培养基之培养方瓶中，待隔天再置换新鲜培养基以去除 DMSO 即可，如此可避免大部分解冻后细胞无法生长或贴附之问题。

#### 12.冷冻管应如何解冻？

答：取出冷冻管后，须立即放入 37℃ 水槽中快速解冻，轻摇冷冻管使其在 1—2 分钟内大部分融化，特别注意，需残留一小块冰块，就可拿到超净工作台操作细胞，用 75%消毒冻存管，用新鲜培养基将细胞转移至培养瓶。另外冷冻管由液氮桶中取出解冻时，必须注意安全，预防冷冻管之爆裂。

#### 13.如何用台盼兰计数活细胞？

答：将样品适当稀释后，用稀释后的样品和 0.4% 的台盼兰溶液按 1:1 混合后，用移液枪点样到血球计数板，置于倒置显微镜下观察、计数，其中蓝色细胞是死细胞，因活细胞排斥台盼兰，不被染色。

#### 14.细胞欲冷冻保存时，细胞冷冻管内应有多少细胞浓度？

答：冷冻管内细胞数目一般为 1-8×10<sup>6</sup> cells/ml vial。

#### 15.细胞冷冻培养基之成份为何？

答：动物细胞冷冻保存时最常使用的冷冻培养基是含 9 - 10 %DMSO (dimethyl sulfoxide) 和 90 - 95 % 原来细胞生长用之新鲜培养基均匀混合之。注意：由于 DMSO 稀释时会放出大量热能，故不可将 DMSO 直接加入细胞液中，必须使用前先行配制完成。

#### 16.如何消除组织培养的污染？

答：当重要的培养细胞污染时，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。

#### 17.培养细胞出现死亡其可能的原因有什么？解决办法有哪些？

答：可能的原因有培养箱内无 CO<sub>2</sub>；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等。解决办法可以检测培养箱内 CO<sub>2</sub> 浓度，检查培养箱内温度；取新的保存细胞种；检测培养液渗透压等；换入新鲜培养液等。

#### 18.国内可以买到细胞株的地方有哪些？

答：可以从国内多家代理厂家买到 ATCC 或 ECACC 的细胞株，同时国内可以买到细胞株的地方还有中国医学科学院（协和医科大学）基础医学部，中国科学院细胞研究所以及武汉大学冷藏中心等。

#### 19.细胞的渗透压耐受性是多少？

答：细胞必须生活在等渗环境中，大多数培养细胞对渗透压有一定耐受性。人血浆渗透压 290mOsm/kg，可视为培养人体细胞的理想渗透压。鼠细胞渗透压在 320mOsm/kg 左右。对于大多数哺乳动物细胞，渗透压在 260—320mOsm/kg 的范围都适宜。

#### 20.支原体(mycoplasma) 污染的细胞，是否能以肉眼观察出异状？

答：不能。除极有经验之专家外，大多数遭受支原体污染的细胞株，无法以其外观分辨之。

#### 21.怎样查到一个特定细胞株的相关知识和培养条件？

答：ATCC (American Type Culture Collection) 收集了绝大多数细胞的详细资料。打开 ATCC 网页的 Cells and hybridomas 链接，输入细胞名称就可以搜索 ATCC 的细胞数据库。数据库中有每一种细胞的详细描述，包括细胞的来源，培养和冻存条件，以及相关文献等资料。

**22.为什么要在溶解的一周内使用贮存在 4℃冰箱中的液体胰蛋白酶溶液?**

答：胰蛋白酶在 4℃就可能开始降解，如果在室温下放置超过 30 分钟，就会变得不稳定。