

动物细胞培养技术

A clear microcentrifuge tube with a white cap, containing a white substance, is shown on the left side of the slide.

分子生物学实验室
微生物资源与生态组
所级公共技术中心

张致淳

2024. 12. 04



目录

Contents

1

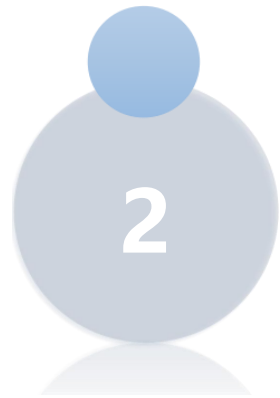
细胞培养基本概念

2

细胞培养基本操作

3

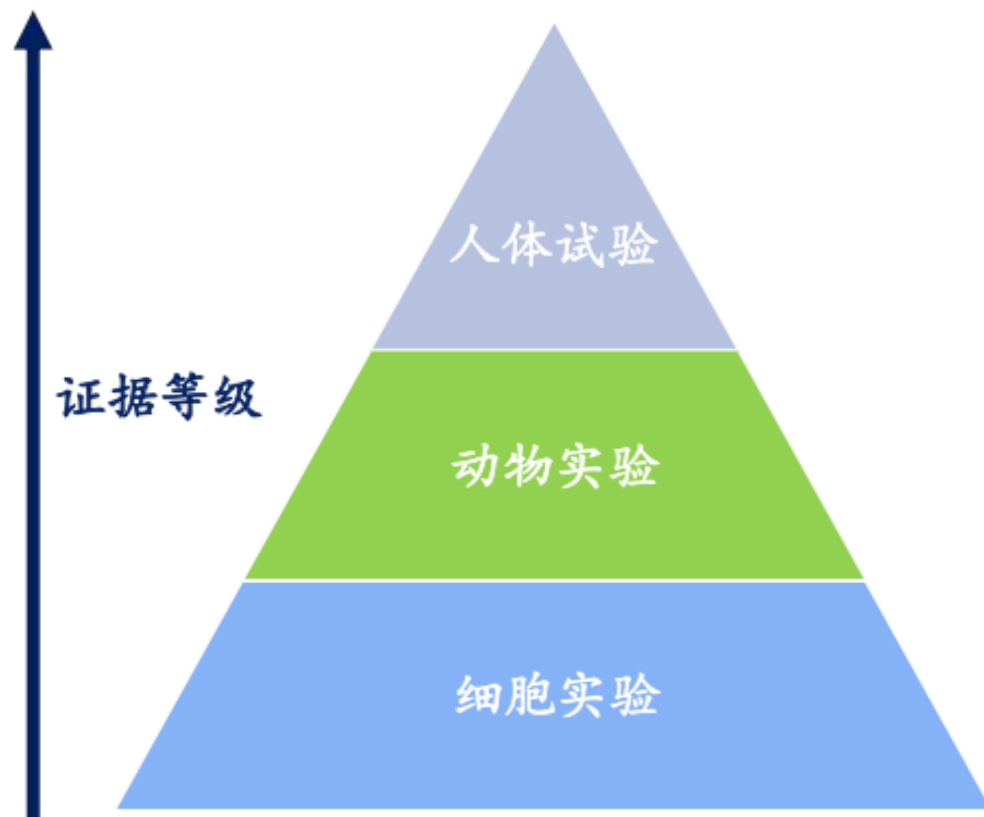
细胞培养常见问题及对策



细胞培养基本概念

细胞培养基本概念

细胞实验在科学研究中的优势与劣势



科学研究可分为观察性研究和实验性研究，后者包括
细胞实验 → 动物实验 → 人体试验

劣势：证据等级低

优势1：研究对象来源容易获取 (尤其是细胞系)

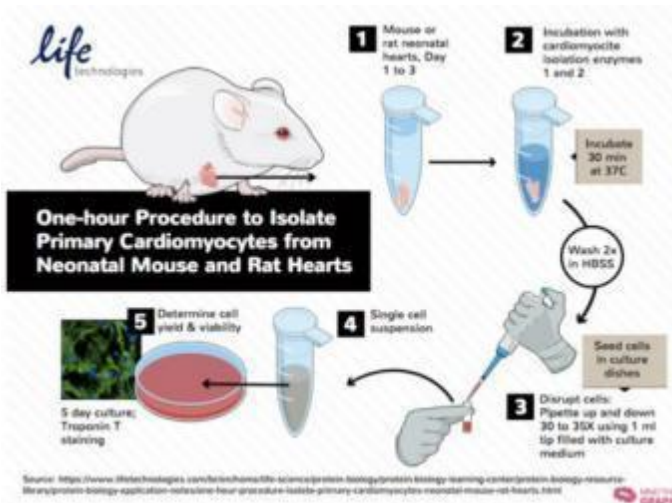
优势2：有细胞特异性，揭示疾病发病机制

优势3：实验周期短，实验成本低

细胞培养基本概念

原代细胞，细胞株与细胞系

- ①原代细胞，即直接从体液或组织中提取培养的细胞，培养的第一代与传代10代以内的细胞统称为原代细胞；
- ②细胞株，原代细胞传代10次以上大部分衰老死亡，极少数存活细胞能够传到40-50代，这些细胞被称为细胞株；
- ③细胞系，适应在体外培养条件下持续传代50次以上的细胞株，具有癌变特点可无限传代，即细胞系



分离培养原代细胞



直接购买（无限）细胞系

	原代细胞	细胞系
优点	更接近细胞的在体状态和特性	易获取、易培养
缺点	获取较难、培养较难	可能与细胞的在体状态相差较大（尤其是传代次数大时）

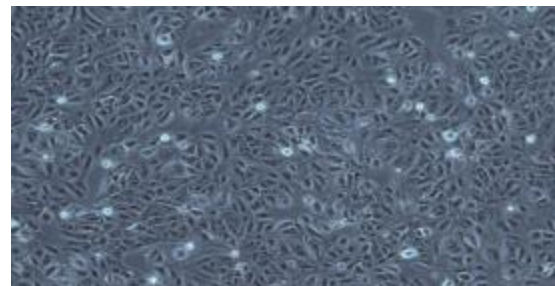
细胞培养基本概念

细胞形态

上皮细胞样细胞或类上皮细胞

01

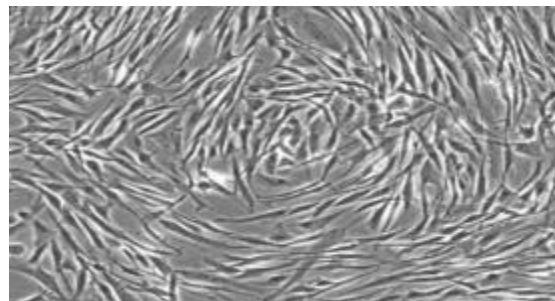
细胞呈**扁平多角形**，有圆形细胞核位于细胞中央，细胞间**紧密连接**，有连接成片的能力，细胞密集稍高时集结成单层斑片状生长



成纤维细胞样细胞

02

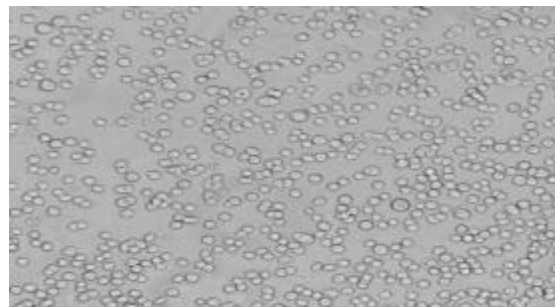
生长时呈**梭形**或**不规则三角形**，中央有卵圆形细胞核，胞质向外伸出长短不同的突起，生长时呈放射状、涡旋状或栅栏状



悬浮细胞

03

不贴附于培养皿，细胞呈**圆形**，呈单个细胞或者细小细胞团，悬浮细胞生长空间大，传代方便，能够大量增殖



细胞培养基本概念

细胞形态

游走细胞样细胞

04

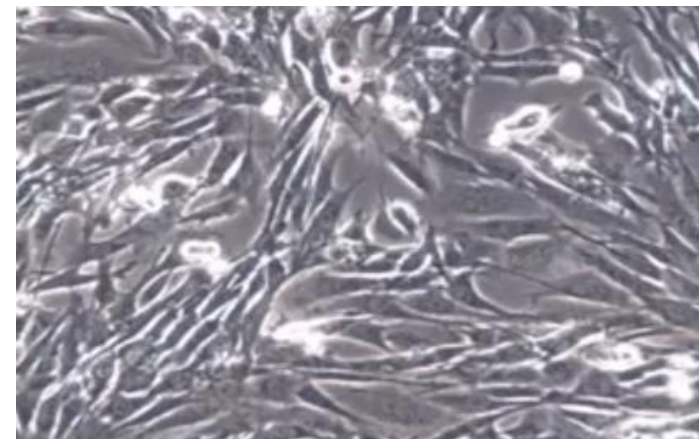
呈**散在生长**，一般不连接成片，胞质常伸出**伪足或突起**，细胞能速度较快且方向不规则地游走或呈活跃的变形运动，较难区分，常见于单核巨噬细胞系统和培养早期的羊水细胞



多型细胞

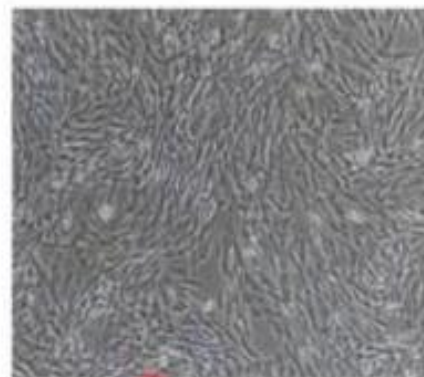
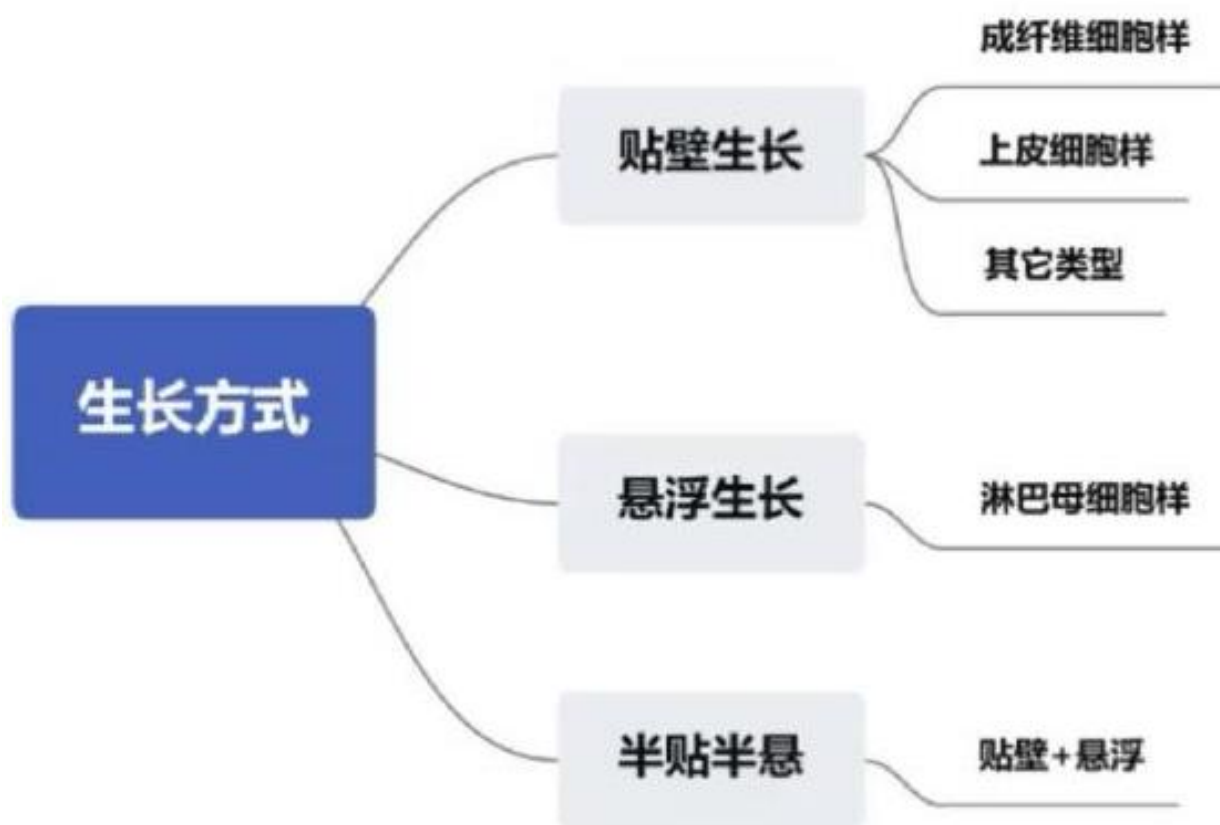
05

形态不规则，一般分为胞体和胞突，胞体略呈多角形，胞突细长，如神经细胞等难以确定其规律和形态特点的细胞可归为此类

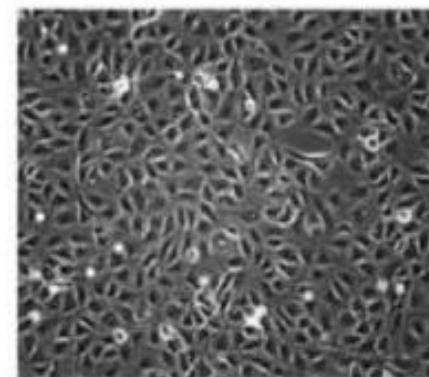


细胞培养基本概念

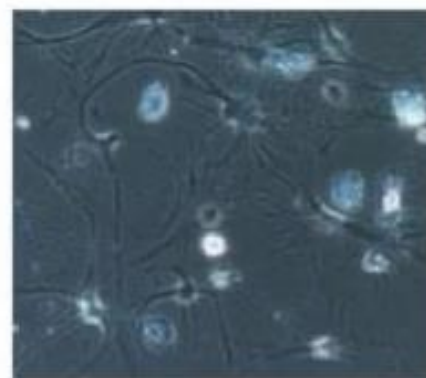
细胞的生长方式



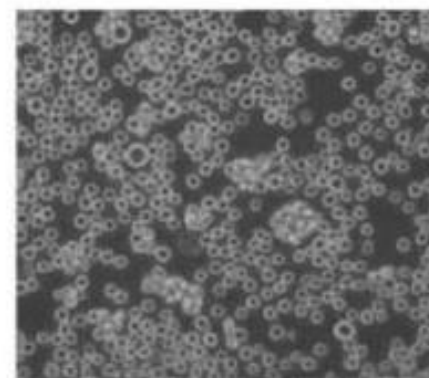
成纤维细胞样



上皮细胞样



神经元细胞形态



淋巴母细胞样

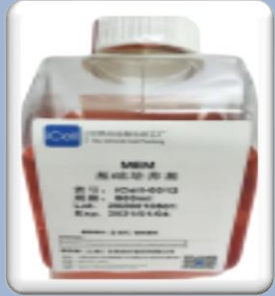
细胞培养基本概念——细胞实验常用培养器皿



培养皿	面积cm ²	加液量ml	培养板	面积cm ²	加液量ml	培养瓶	面积cm ²	加液量ml	摇瓶	加液量ml
3.5cm	8	2	96孔板	0.3	0.1	T25	25	5-7.5	125ml	25
6cm	21	5	24孔板	2	0.5-1	T75	75	15-22.5	250ml	60
9cm	49	10	12孔板	4.5	1-2	T175	175	35-52.5	500ml	150
10cm	55	10	6孔板	9.6	2-2.5	T225	225	45-67.5	1000ml	350

在选择培养器皿时需**综合考虑**实验需要和细胞数量、细胞种类和形态等因素，选择合适的细胞培养器皿及大小以便获得有效和稳定的实验结果。

细胞培养基本概念——细胞实验常用培养基



MEM

- 含12种必须氨基酸、谷氨酰胺和8种维生素，**成分简单**，可广泛适应各种已建成细胞系的培养；
- **易于添加或减少某些成分**，也特别适于特殊研究的细胞培养



DMEM

- 在MEM的基础上改良，根据葡萄糖用量可以分为高糖和低糖；**低糖**适用于一般代谢水平的细胞如干细胞，防止分化；**高糖**则适用于培养代谢旺盛的细胞



RPMI 1640

- 最初是针对淋巴细胞培养设计的培养基，但在实际使用过程中发现它能适应许多种类细胞的培养，包括正常细胞和肿瘤细胞



HamF-12

- 使用了一些微量元素和无机离子，**成分丰富**，常用于无血清培养基的配制；
- 常用作单细胞克隆化培养

细胞培养基本概念——血清

胎牛血清 Fetal Bovine serum , FBS

在基础培养基中加入合适浓度的血清后，称为完全培养基

- **提供基本营养物质**

氨基酸、维生素、无机盐、脂类物质、核酸衍生物等。

- **提供激素和各种生长因子**

胰岛素、肾上腺激素等；

成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、血小板生长因子等。

- **提供结合蛋白**

结合蛋白在细胞代谢中起重要作用，携带重要的低分子量物质；

如白蛋白携带维生素、脂肪、激素等，转铁蛋白携带铁等。

- **促进细胞贴壁**

- **对细胞起到保护作用**

血清中含抗蛋白酶成分，起中和作用，终止胰酶消化。



细胞培养基本概念——胎牛血清



优质血清的标准

透明清亮，土黄色或棕黄色，无沉淀或极少沉淀，比较粘稠



血清浑浊、不透明、含许多沉淀物

说明血清污染或血清中的蛋白变性

血清呈棕红色：说明血清中的血红蛋白含量过高，取材时有溶血现象



摇晃时感觉液体稀薄

说明血清中渗入生理盐水



血清的解冻和储存

-20°C → 4°C 冰箱溶解

-70°C -- 20°C 长期储存，4°C 不超过一个月

避免反复冻融

细胞培养基本概念——细胞获取

1. 中科院上海细胞库

<https://www.cellbank.org.cn/>



国家模式与特色实验细胞资源库
中国科学院细胞库/干细胞库
中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库
National Collection of Authenticated Cell Cultures

2. 国家细胞资源共享平台

<http://www.cellresource.cn/>



3. ATCC (American Type Culture Collection)

<https://www.atcc.org/>



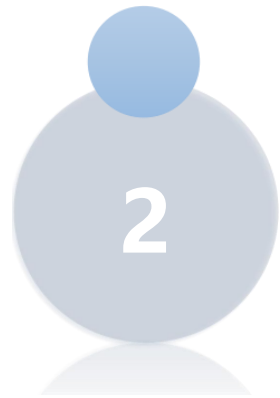
4. JCRB Cell Bank

<https://cellbank.nibiohn.go.jp/>



National Institutes of
Biomedical Innovation, Health and Nutrition
JCRB Cell Bank

为保证细胞株的正确，在获得细胞株进行试验前须进行**细胞STR鉴定**



细胞培养基本操作

细胞培养基本操作

细胞复苏

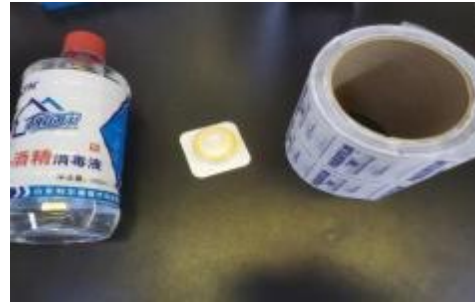
细胞传代

细胞冻存

细胞培养基本操作

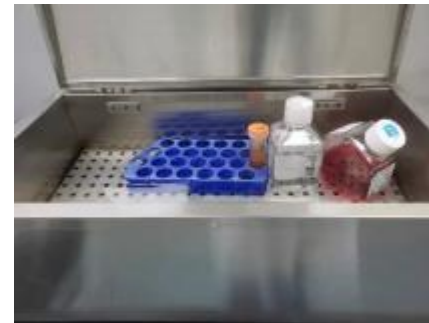
细胞培养的两个关键原则

A 无菌原则（环境、材料、操作者、操作）



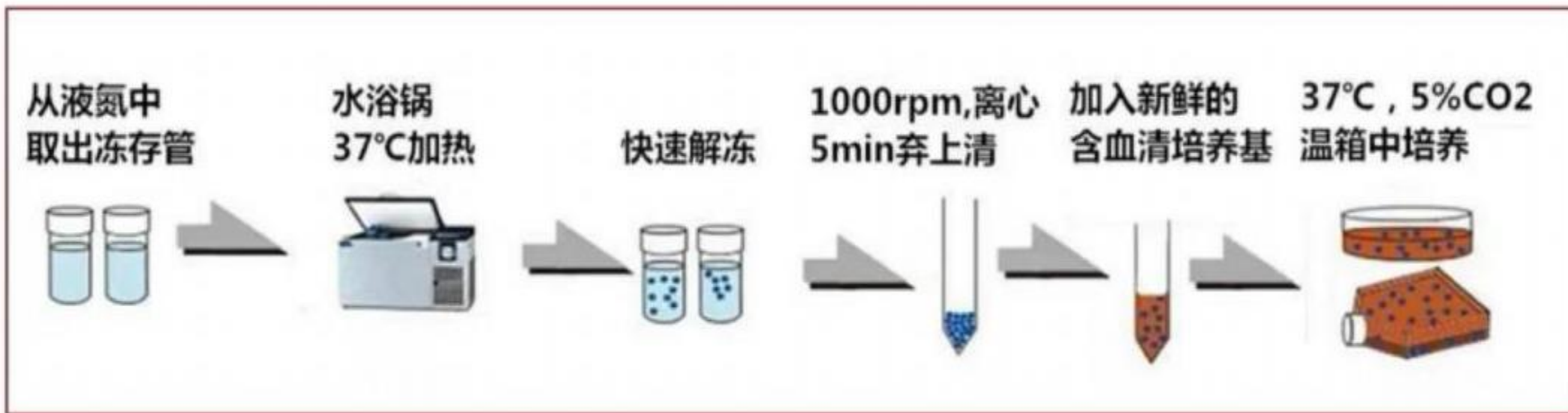
- 操作台环境无菌：紫外(房间+**生物安全柜**)+75%酒精
- 实验材料(固体类：移液枪,枪头,培养皿/板)无菌：紫外
- 实验材料(液体类)：双抗（青霉素100U/ml, 链霉素100 μ g/ml），液体过滤（滤网）、封口膜。
- 实验者手部无菌:75%酒精
- 实验操作无菌：尽量少跨越，避免从开盖区域上方经过

B 减少细胞环境扰动原则



- 温度（孵箱37 $^{\circ}$ C，培养基预热）
- 震动（转移细胞时轻拿轻放）
- **高CO₂浓度**（5%，缩短细胞在孵箱外的时间）
- 枪头吹打（轻柔）

细胞培养基本操作——细胞复苏



细胞复苏失败因素

冻存时细胞数量少或生长状态不良

液氮罐保管不善, 没有及时补充液氮

复苏方法不得当

细胞受细菌或支原体污染

细胞复苏注意事项

- 1.注意无菌操作；
- 2.细胞用完全培养基需要提前放置到室温环境；
- 3.液氮操作有一定的危险性，打开液氮罐取出细胞时注意防护；
- 4.取出的细胞应在最短的时间内放入水浴锅；
- 5.解冻时，细胞可放入一次性PE手套中，在放入水浴锅中快速晃动，“速溶”，最好在1min左右完成；
- 6.冻存管打开前，用75%酒精将冻存管消毒并晾干；
- 7.离心后重悬动作要尽量轻柔，避免吹打产生大量气泡；
- 8.复苏后首次培养，尽量保证细胞浓度，减少第一次传代时间。



细胞培养基本操作——贴壁细胞传代

01

前期准备

准备物品预热，观察细胞状态，细胞密度达80%-90%左右进行传代；

02

清洗细胞

吸去旧培养基；缓慢加入PBS润洗细胞，去除残余血清和死细胞；吸弃PBS；

03

消化细胞

加入消化液，轻柔晃动均匀覆盖整个培养皿；37°C 孵育至细胞变圆变亮；

04

终止消化

加入适量完全培养基，终止消化；用移液枪将细胞轻柔吹散，转移至离心管内，离心；

05

细胞传代

离心后，弃上清，加入完全培养基，轻柔吹打，使细胞悬液均匀；

接种合适密度于新培养皿中，记录细胞名称、代数、操作人及日期；

8字或十字轻柔晃动均匀，转移至培养箱中培养



贴壁细胞传代-消化液选择

胰酶

- 作用原理:
水解细胞之间的蛋白质，使细胞之间相互离散
- 常用浓度
0.25% 和 0.125%
- 影响效果因素
浓度、温度、作用时间
- **血清中含有大量蛋白成分，通过竞争抑制，过量蛋白消耗胰酶，可终止胰酶消化反应**

EDTA溶液

- 作用原理:
通过结合细胞质中的二价离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 从而破坏细胞之间的连接，达到分散细胞的目的
- 常用浓度:
0.02%，配制时应加碱助溶
- **毒性小，消化作用缓和，但分散效果较差**

胶原酶溶液

- 作用原理:
从溶组织梭状芽胞杆菌发酵，提取，精制的酶制品，主要对胶原组织和细胞间质有较强的消化作用
- 作用效果:
多用于原代培养中将特殊组织的细胞与胶原成分分离散开来

细胞培养基本操作——悬浮细胞传代

离心全换液法

通过离心去除旧的培养基，更换新鲜培养基；该方法适合“好养的悬浮细胞”（如K562，人慢性粒细胞白血病细胞），或当前细胞状态良好，密度较高导致培养基消耗较大的情况；该方法换液彻底，能去除部分细胞碎片，但会对细胞造成一定程度的机械损伤；

离心半换液法

通过离心50%细胞悬液，更换50%体积的新鲜培养基。该方法适合“矫情”难养的细胞（如THP-1，人单核细胞白血病细胞），或正在调整状态中、密度较低但碎片较多需要去除的情况；

沉降换液法

利用重力自然沉降，将培养基与细胞分离，达到全部或部分更换新鲜培养基；只适合能成一定大小细胞团（否则无法自然沉降，只能低速离心）的细胞，尤其是处理依赖细胞聚集才能增值的细胞，如NK-92、Jurkat；可最大限度避免离心过程造成的机械损伤，同时保留聚集的细胞团。

细胞传代注意事项

1. 细胞重悬时，**尽量吹散**，尤其是容易结团的细胞，结团率过高影响细胞的活率和生长；
2. 不管是贴壁细胞/悬浮细胞，吹打时**动作轻柔**，避免产生气泡；
3. 每次移液后需及时更换枪头，避免造成溶液交叉污染；
4. 贴壁细胞用胰酶消化时，需要严格**控制消化时间**；
5. 选择**适合的传代比例**，保证细胞在使用时是处于良好的生长状态；
6. 尽量使用一次性无菌移液管，减少污染的风险



细胞培养基本操作——细胞冻存

将细胞置于-196℃液氮中低温保存，使细胞暂时脱离生长状态但仍然保持细胞特性，起到了细胞保护的作用。

冻存液配置（现配现用）

DMSO : 血清 = 1 : 9（原代细胞）

DMSO : 血清 : 培养基 = 1 : 2 : 7（永生化细胞）

DMSO : **降低溶液冰点**，并在缓慢冻结的条件下，快速进入细胞，使细胞内水分渗出，**减少冰晶的形成**，避免细胞损伤



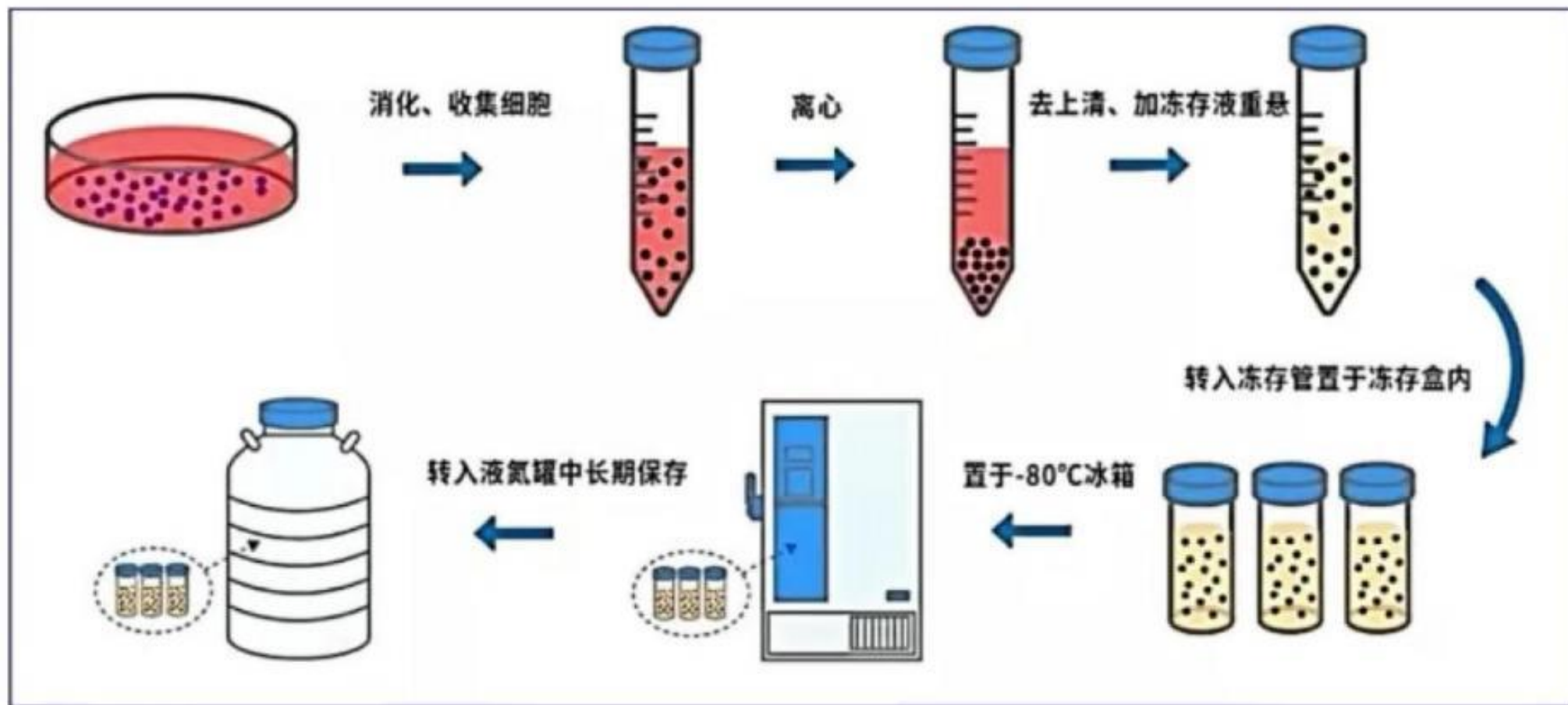
01

要实现慢冻，可将冻存管分别置于4℃、-20℃、-70℃冰箱一段时间，进行梯度降温

02

可以使用程序降温盒冻存细胞，这种**程序降温盒**可以实现每分钟1℃降温，大大提高冻存细胞的存活率

细胞冻存的步骤

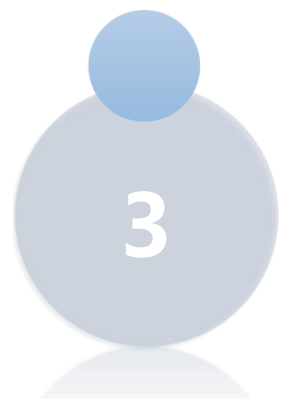


标记：细胞名称；代次；冻存人姓名；冻存时间

细胞冻存的注意事项

1. 冻存液**现配现用**或者使用无血清冻存液；
2. 冻存细胞处于对数生长期，细胞活率大于**90%**；
3. 冻存的细胞保证无微生物污染，有条件冻存前做支原体检测；
4. 最好使用程序降温盒，每分钟下降 1°C ，遵循“**慢冻**”原则；
5. 冻存记录要**标记**好细胞的种类、代次、时间和姓名；
6. 冻存细胞应尽快转入**液氮**，不要在 -80°C 冰箱放置超过一个月

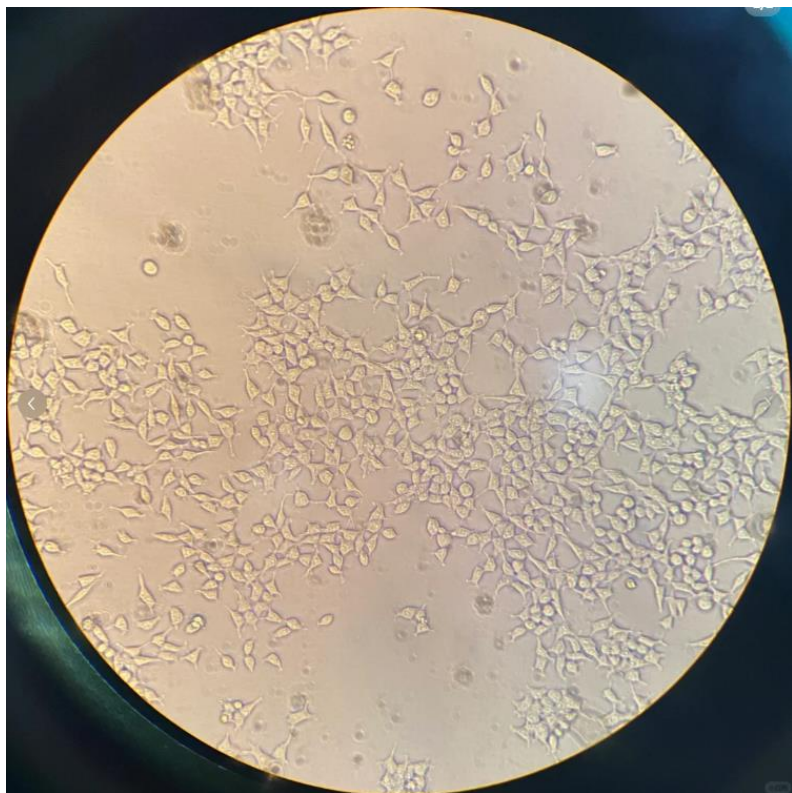




细胞培养常见问题及对策

细胞形态异常-人肾上皮细胞系

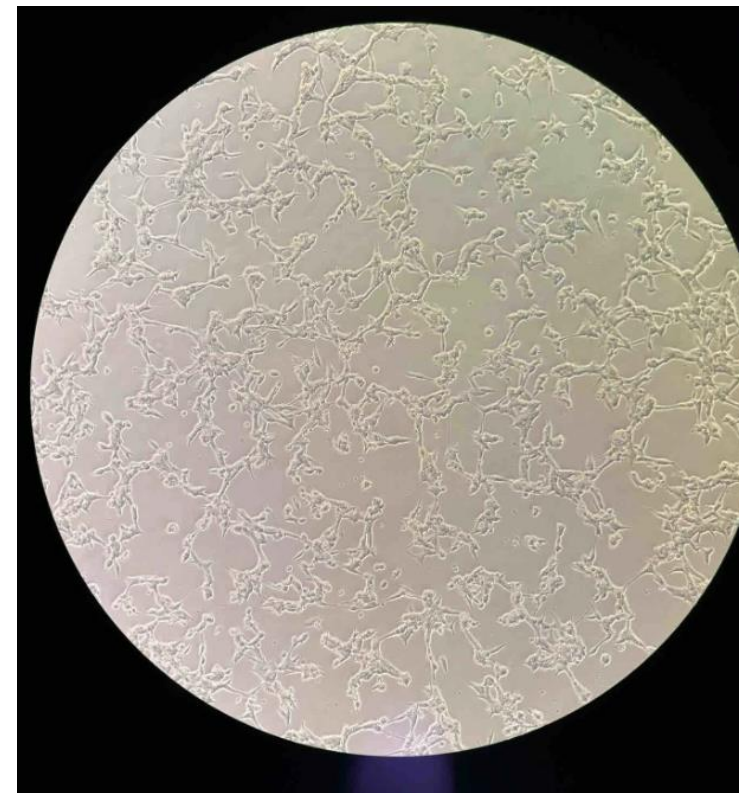
293T 正常形态



293T 异常形态



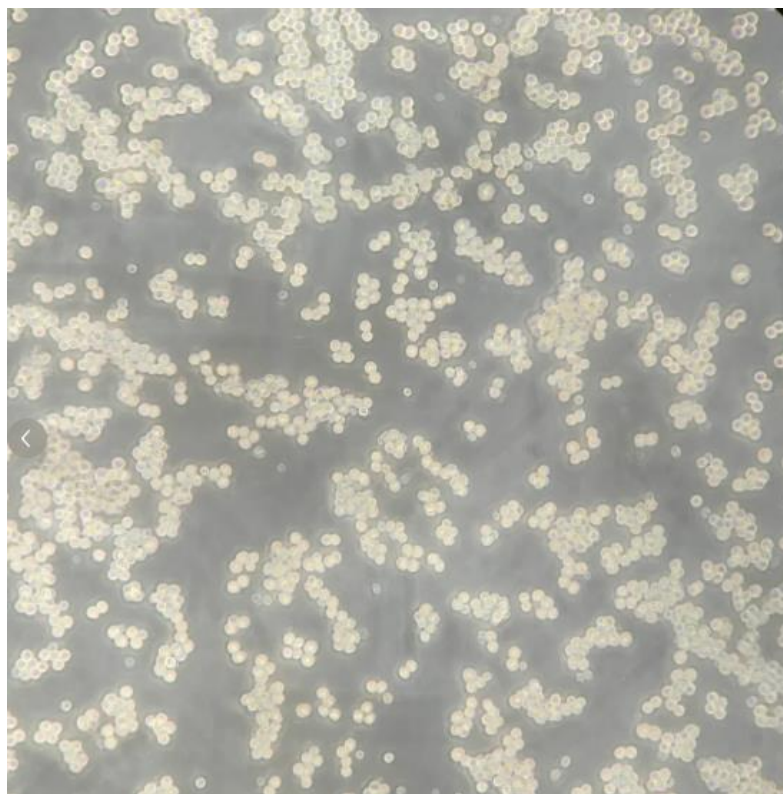
293T 异常形态



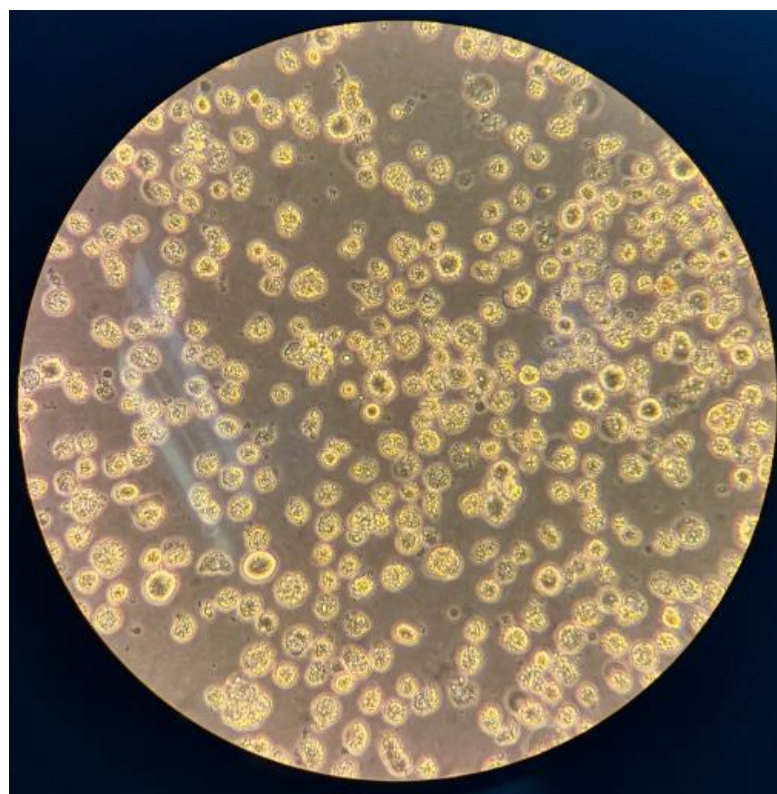
细胞生长缓慢，贴壁效果差，形态不饱满，聚团，触角多且长

细胞形态异常-人慢性粒细胞白血病细胞系

K562 正常形态



K562 异常形态



K562 异常形态



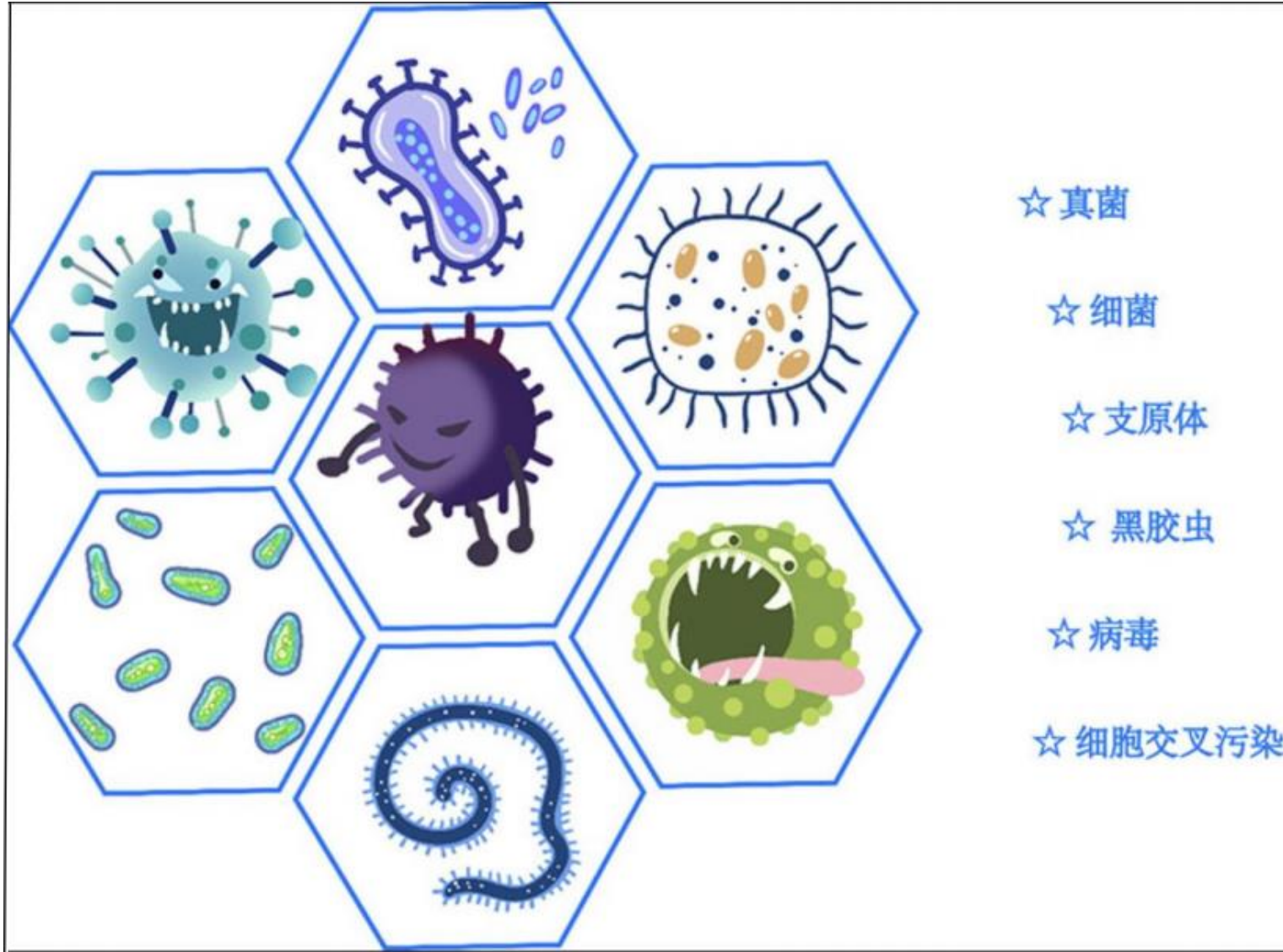
细胞边缘呈现不规则突起，亮度不均匀，大小不均一，碎片细胞多

细胞形态异常-非污染造成的细胞生长异常

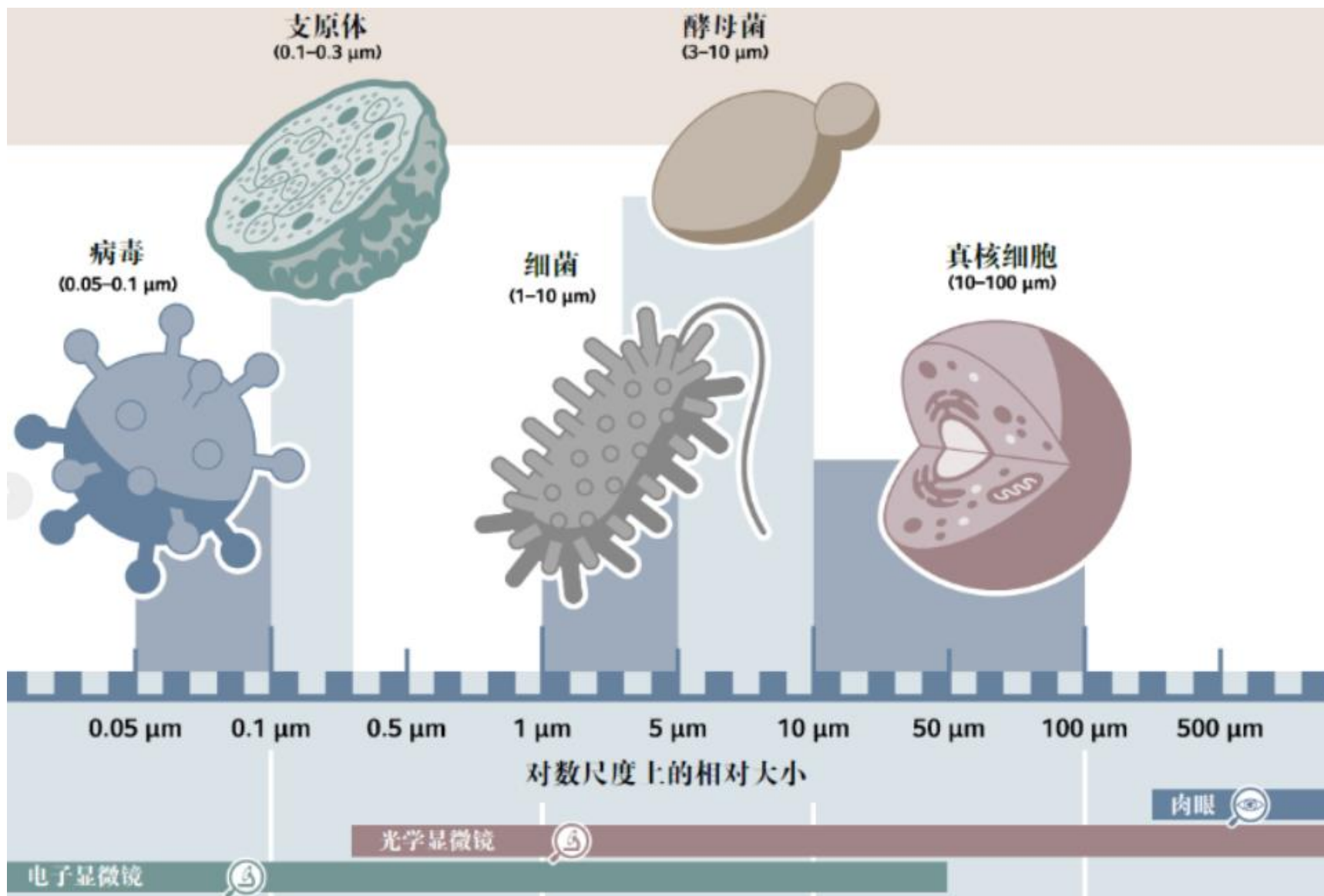
细胞生长异常的可能原因及解决方案

- 细胞老化——正常生理老化不可逆，须更换更低代数细胞或购买新的细胞系
- 渗透压和pH改变——尽量购买液体培养基和商业化无菌试剂溶液，自配试剂注意pH调节
- 胰酶消化过度——选择合适的胰酶浓度和消化时间
- 离心过度——选择合适的离心速度和离心时间
- 血清或者药物刺激——更换血清品牌批次或增大血清浓度
- 缺乏营养引发自噬——增加血清浓度/选择质量好的血清/缩短更换培养基的时间

细胞常见污染及防治



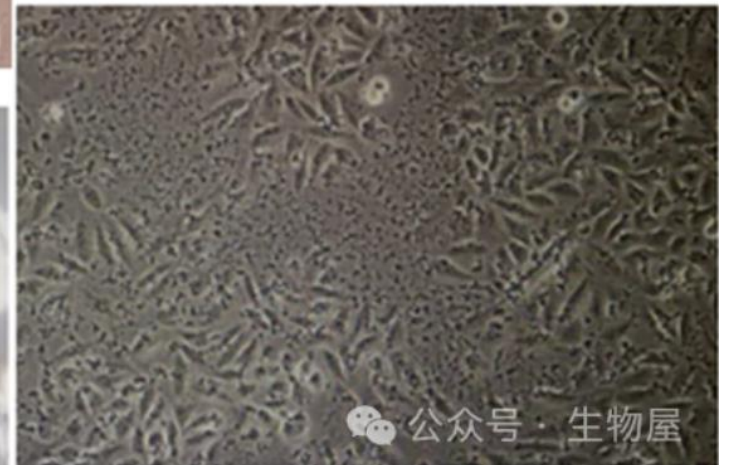
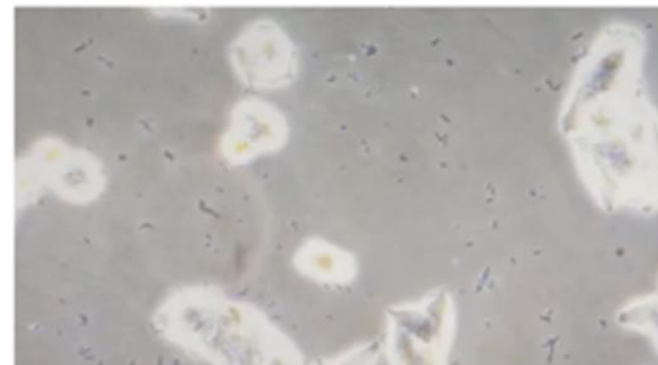
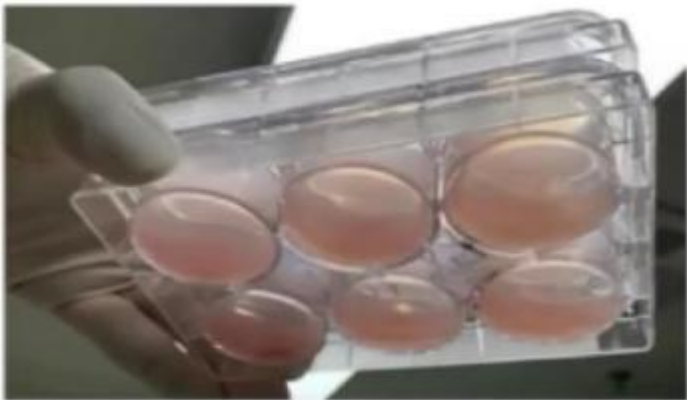
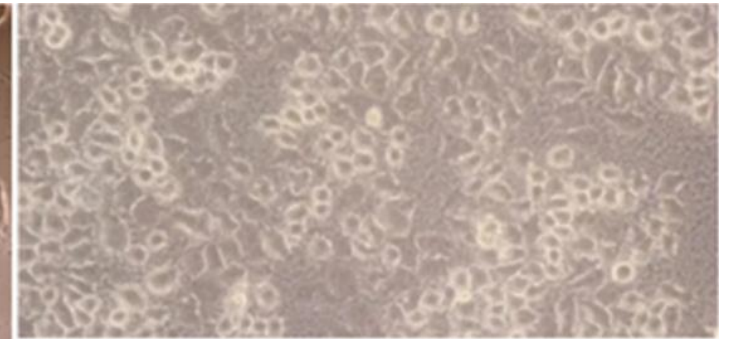
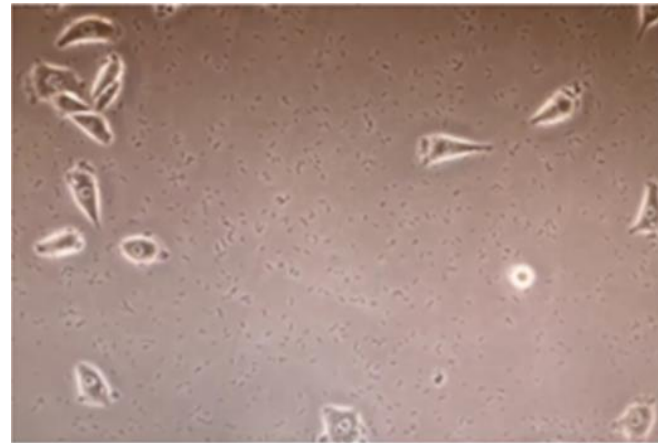
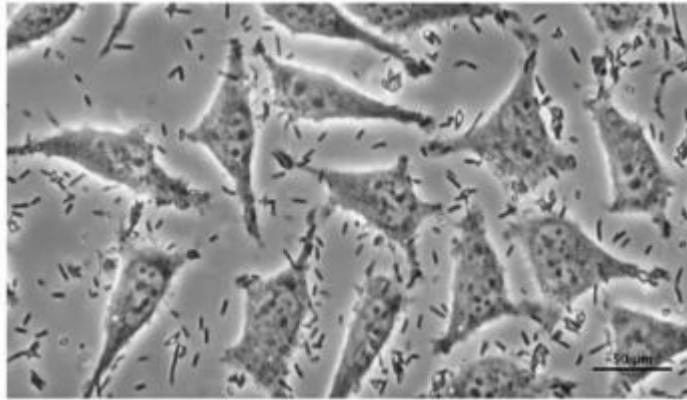
细胞常见污染及防治



细菌污染

特点：一般在污染后48 ~ 72h爆发式增殖，培养液变**浑浊**，呈**黄色**，细菌在显微镜下呈**细沙状**

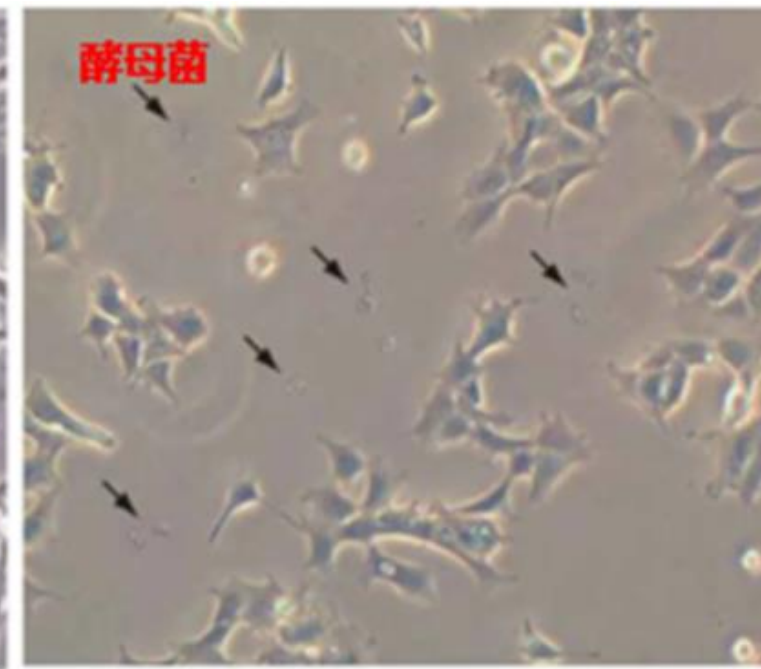
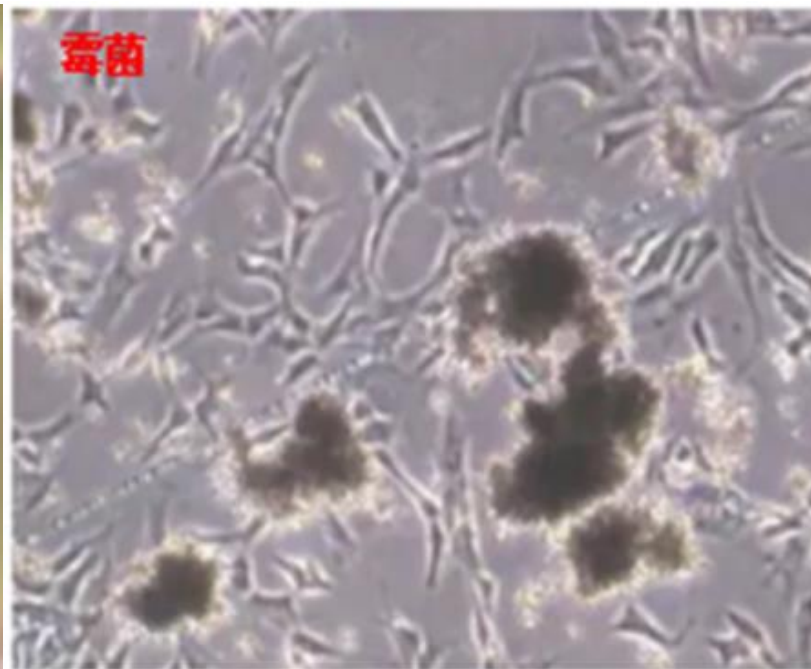
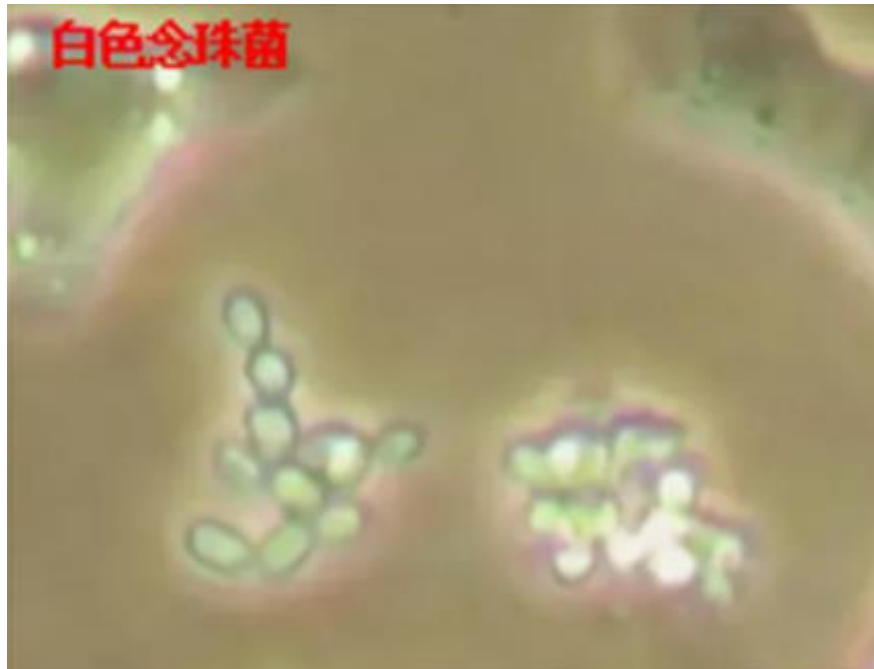
危害：产生大量**酸性物质**，细胞内颗粒增多，胞质中出现大量堆积物，细胞**生长变慢**，大量死亡



真菌污染

特点：短期内培养液不浑浊，后期污染严重时形成**白色或黄色漂浮物**；镜下可见丝状、管状或树枝状菌丝，纵横交错，念珠菌或酵母菌形态呈卵圆形；

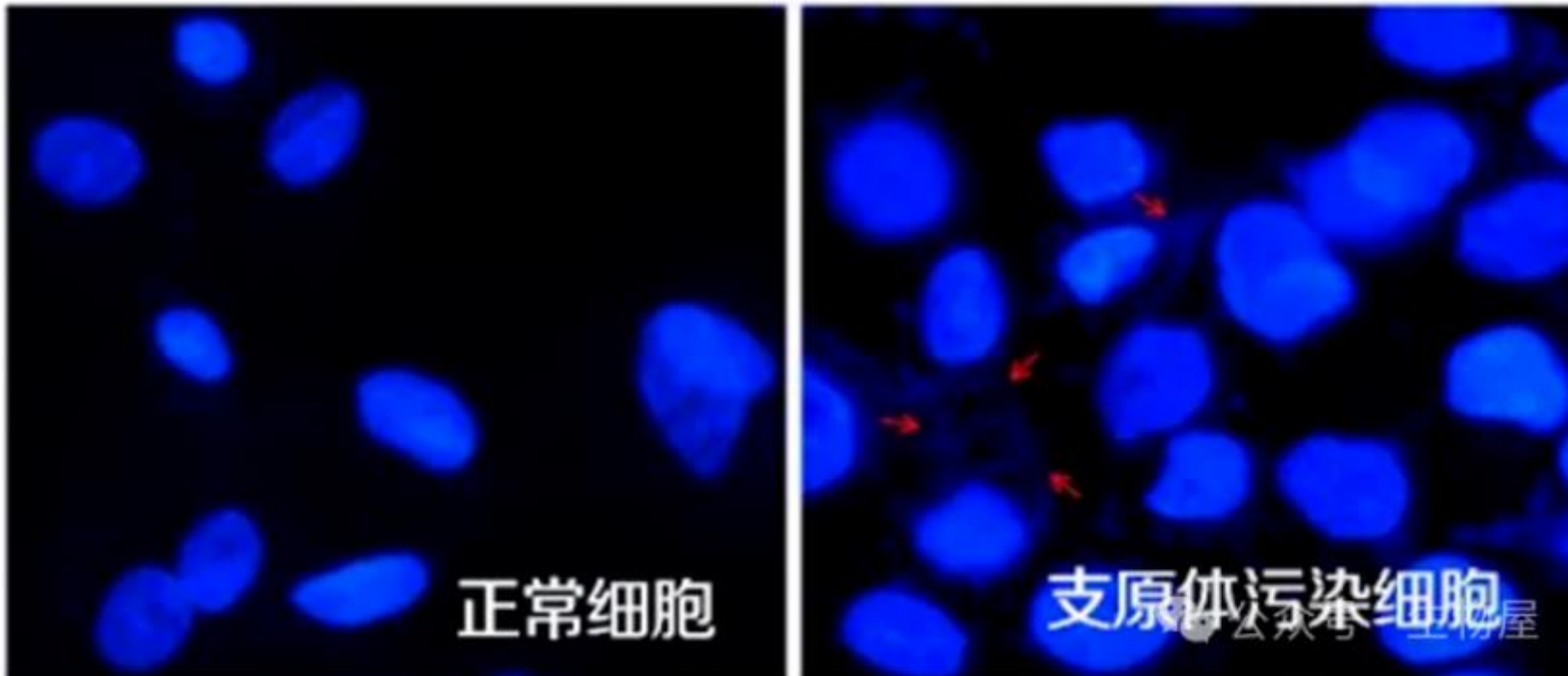
危害：导致培养液**浑浊**；与细胞营养缺乏，并释放次级代谢物毒害细胞；细胞活力变差，生长速度变慢



支原体污染

特点：支原体污染具有**隐蔽性**，可以与细胞**长期共存**，培养基一般不浑浊；不能用肉眼和光学显微镜观察到；

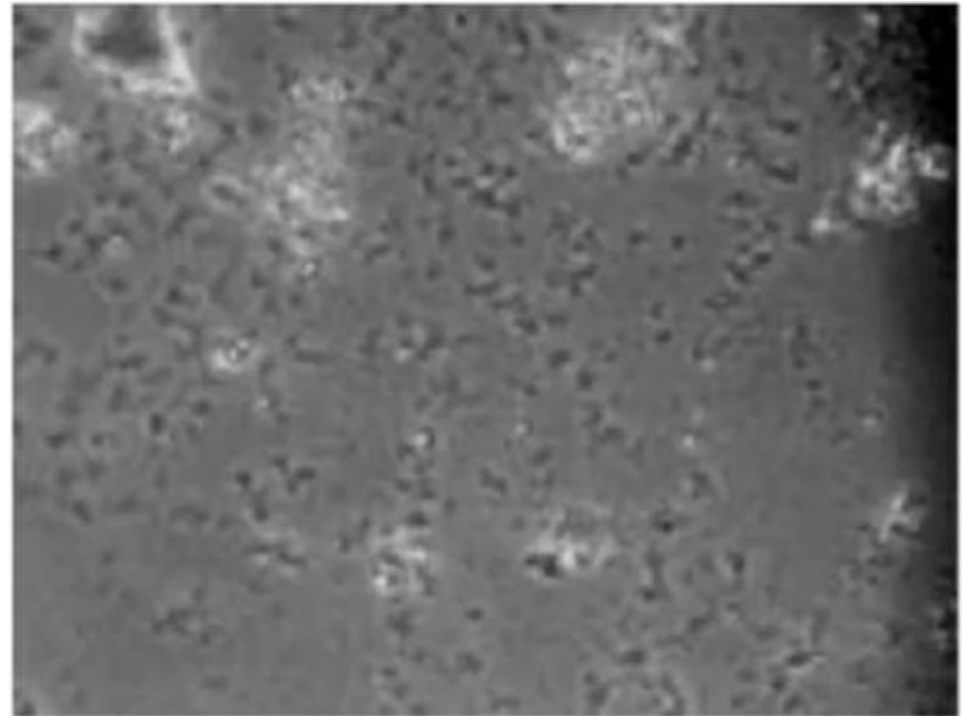
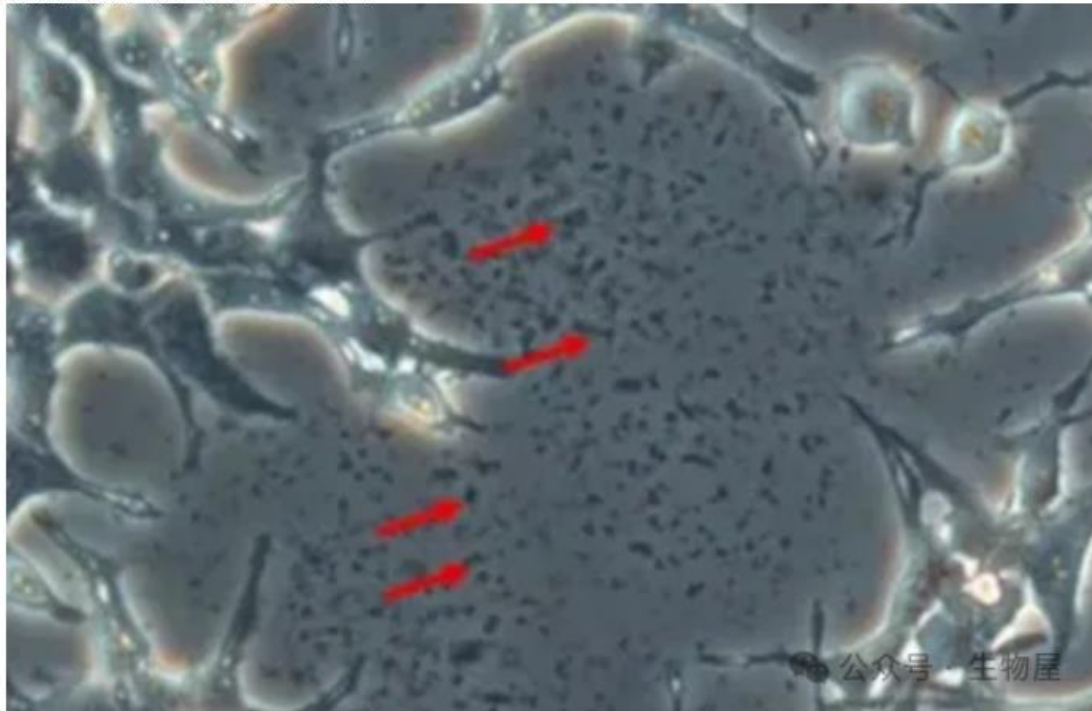
危害：细胞增殖减慢，饱和密度下降，细胞形态异常，细胞出现萎缩和碎片化；吸收、破坏培养基中的精氨酸，抑制细胞生长、引发细胞凋亡，造成细胞活性降低、脱落等现象；常规的MTT实验结果会受到严重干扰；可显著改变某些基因的表达水平



黑胶虫污染

特点：起初对细胞并无影响，与细胞共生，随细胞传代而传代，通常抗生素对其无效；在**低倍**显微镜下通常为**黑色点状或碎片状**；**高倍**镜下，在原地进行**布朗运动**；一般情况下，细胞数量与黑胶虫数量呈负相关关系；

危害：与细胞竞争行性生长，对细胞生长不利，严重时导致细胞死亡

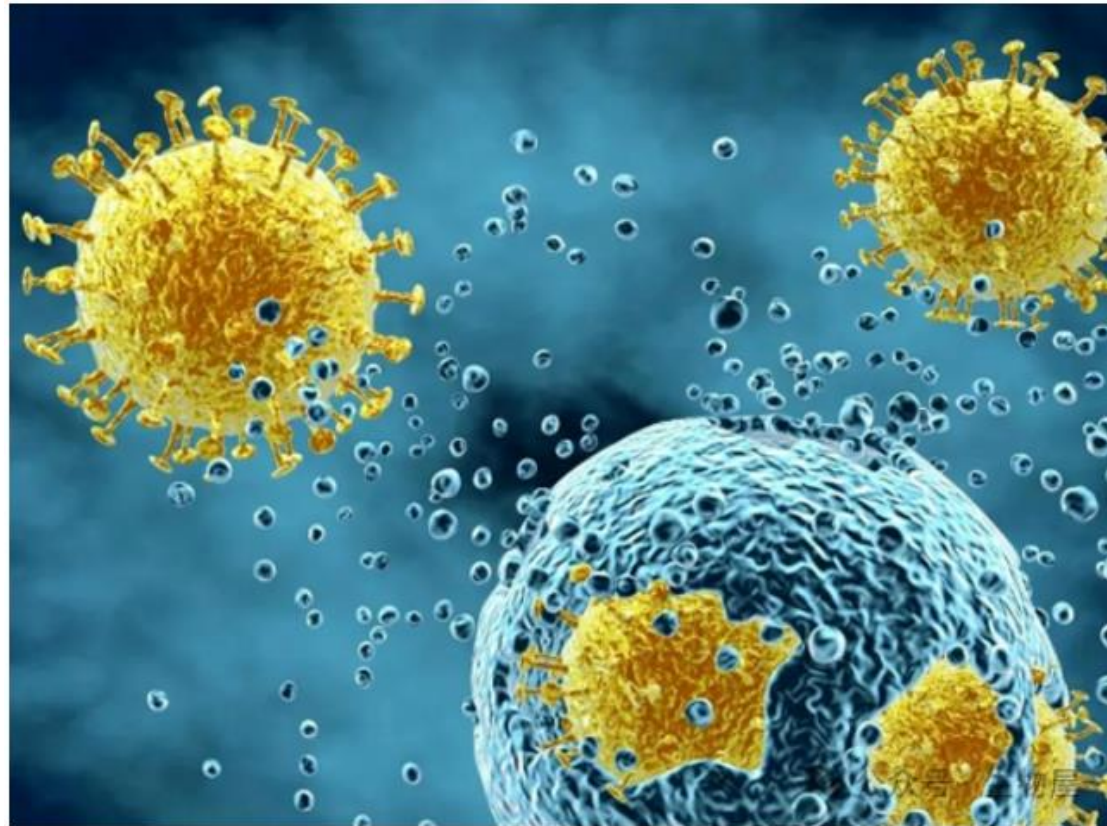


光学显微镜400X 观察黑胶虫

病毒污染

特点：病毒污染的细胞液通常清亮无变化，大部分被污染的细胞也不会产生形态及病理现象，小部分病毒会造成细胞变圆、肿胀、脱落。病毒清除是十分困难的，一旦不幸被污染，只能更换新的高质量细胞株

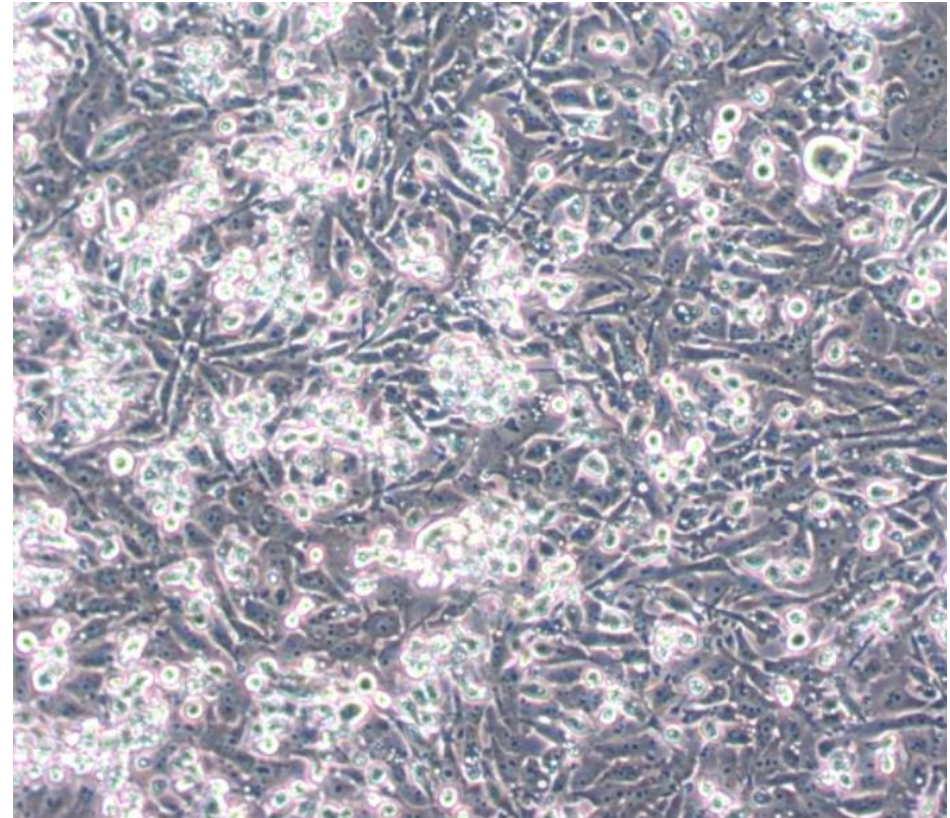
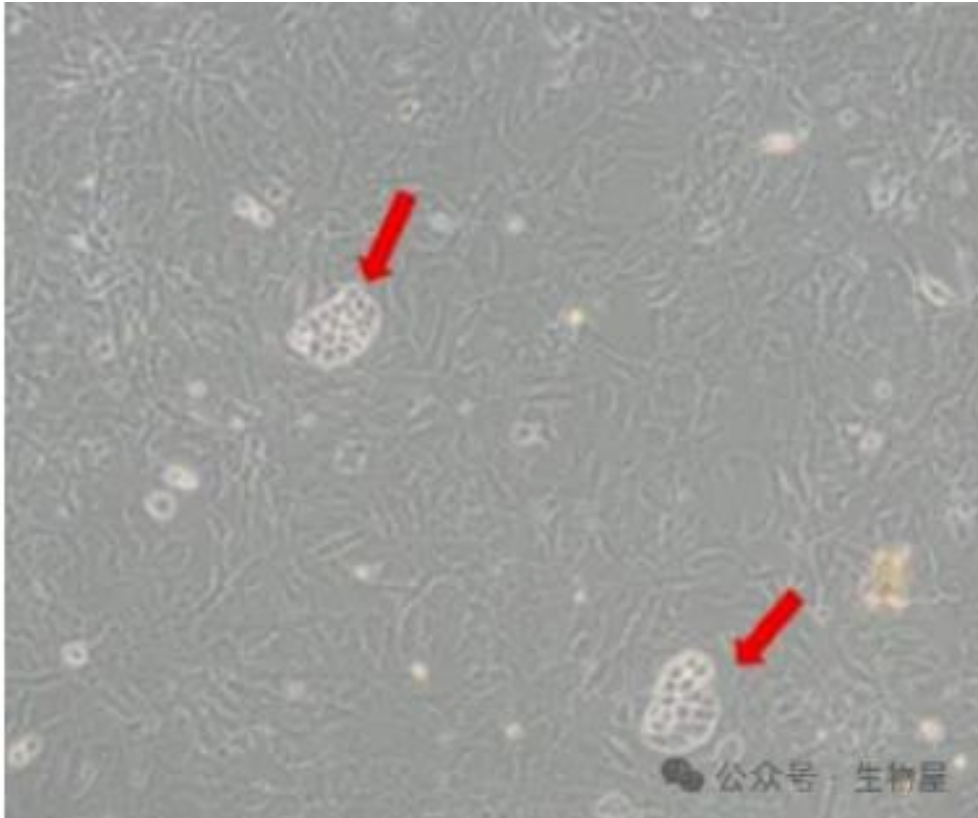
危害：尽管病毒污染的细胞不影响原代培养，但对于疫苗开发等相关研究是不安全的



细胞交叉污染

特点：在两种或两种以上细胞的实验中，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，使一种细胞被另一种细胞污染，镜下观察出现明显的不同种形态的细胞，或表型不一致的细胞

危害：研究对象的错误选择对后续实验结果造成影响



细胞常见污染及防治



应对策略：污染的细胞和试剂更换，对培养箱，水盘，水浴锅等，用除菌剂处理，可用琼脂平皿检测生物安全柜和空气质量

对于重要细胞：用DBSS清洗三遍，消化离心后清洗两遍，重新接种后用高浓度抗生素培养基，重复三次，换成无抗生素培养基培养三次，观察细胞状态

细胞污染的预防

细胞房环境控制

- 环境消毒：每周一次定期消毒灭菌。
- 地面/墙面：84消毒液、新洁尔灭交叉使用。
- 定期紫外照射，臭氧熏蒸。
- 仪器设备表面：75%酒精擦拭。

实验人员管理

- 着装：着连体衣，戴口罩、手套，头发、手腕等要包好，减少皮肤外露。
- 行为：减少走动，出入关门，操作时不要讲话。
- 技能：养成良好的无菌操作习惯。
- 其他：减少共用物品，公共使用区域统一使用习惯，区分洁净区域和有风险的区域。

实验用品管理

- 试剂、耗材：所使用全部试剂及耗材确保无菌。
- 仪器设备：定期擦拭消毒，培养箱、显微镜等高风险区域需经常清洁，培养箱水盘和复苏用的水浴锅需添加抑菌剂。
- 其他：当出现培养物泄漏时，应及时清理干净；出现局部污染时，应找出污染源并对环境整体消毒。

细胞污染的预防

常用消毒剂:

- **高效消毒剂**: 甲醛、戊二醛、过氧化物类、环氧乙烷等, 可有效杀死各种细菌繁殖体及芽孢, 真菌, 病毒等;
- **中效消毒剂**: 乙醇、含碘化合物、酚类, 能杀灭除芽孢以外的各种微生物;
- **低效消毒剂**: 季铵盐类、二胍类, 只能杀死部分细菌繁殖和病毒;

最常用的消毒剂为乙醇, 适用于操作台面和操作者皮肤, 工作浓度为70-80%

灭菌物品	物理灭菌法					化学灭菌法	抗生素法
	紫外线	电离辐射	高温湿热	干热	过滤	消毒剂	抗生素
空气/工作台	√					√	
玻璃器皿		√	√	√			
橡胶制品		√	√			√	
塑料制品		√				√	
金属器械		√	√	√		√	
培养液			√		√		√

The image features a laboratory setting with two graduated cylinders on a blue stand. The cylinders are marked with numbers from 5 to 15. A large, dark blue arrow with a white outline points from the right side of the image towards the cylinders. The background is a blurred laboratory environment. The text '感谢聆听' is overlaid on the right side of the image.

感谢聆听