

真核细胞培养常见问题分析

本文主要介绍了真核细胞培养时可能遇到的问题，包括可能的原因及对应的解决方案。

1. 细胞培养不贴壁

可能原因

- 胰蛋白酶消化过度
- 支原体污染
- 培养液中无贴壁因子

解决方法

- ① 缩短胰蛋白酶消化时间或降低胰蛋白酶浓度
- ② 分离培养物，检测支原体
- ③ 清洁支架和培养箱

2. 培养液 PH 变化过快

可能原因

- 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

解决方法

- 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
- ③ 加 HEPES 缓冲液至 10 到 25mM 终浓度
- ④ 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 Hank' s 盐配制的培养液
- ⑤ 丢弃培养物或用抗生素除菌

3. 细胞生长缓慢

可能原因

- 更换了不同培养液或血清
- 试剂保存不当
- 培养物中有少量细菌或真菌污染
- 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

解决方法

- ① 比较新培养液与原培养液成分
- ② 比较新血清与旧血清支持细胞生长实验
- ③ 增加起始培养细胞浓度
- ④ 换入新鲜配制培养液，让细胞逐渐适应新培养液
- ⑤ 补加谷氨酰胺或生长因子
- ⑥ 用无抗生素培养液培养，如发现污染，丢弃
- ⑦ 用抗生素除菌

4. 细胞培养时死亡

可能原因

- 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

解决方法

- ① 检测培养箱内 CO₂
- ② 检查培养箱内温度
- ③ 取新的保存细胞种
- ④ 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 260–350mOsm/kg。加入额外试剂如 HEPES 或药物都有可能影响培养液渗透压。

5. 黑胶虫污染

黑胶虫污染常在培养条件改变、细胞接种密度降低、细胞状态不佳时显现，尤其在冻存细胞复苏时可造成大量细胞死亡。

感染黑胶虫细胞的表现

- 细胞培养时生长的旺盛，小黑点会越来越少，反之则多
- 可以穿透滤膜，也可以通过细胞培养箱空气进行污染
- 换液冲洗后也无多大作用
- 低倍镜下观察为黑色点状，高倍镜（400X）下作不规则布朗运动

解决办法

- ① 体外细胞培养时更换好一点的血清
- ② 如果是贴壁细胞的话，可用无菌的 PBS 洗几次，可一定程度上缓解。若是悬浮的话，可以向其中少加一点滋养细胞（从小鼠腹腔内取的巨噬细胞），加滋养细胞对有黑胶虫的刚复苏的细胞很有一定作用
- ③ 在换液前先加入生理盐水并轻轻拍打，冲洗干净后再加入细胞培养液，坚持天天洗，细胞传代时加生理盐水再

离心一次，稍微加大接种密度，一段时间后，黑胶虫数目会显著减少

④ 环丙沙星+哌拉西林，各 10ug/ml，选择片剂，1.5 一盒/6 片，每片含环丙沙星 0.25g，磨成粉，PBS 溶解，稀释到适当浓度，过滤，4 度保存。哌拉西林用的注射粉剂，2.5g/瓶，溶解到相应浓度，加入 PBS 和培养基中，可以观察到黑胶虫数量明显减少

6. 支原体污染

支原体污染表现

- 细胞形态改变，一般是有梭形变成圆形，不再贴壁生长，漂浮
- 光镜下，可以看到细胞膜上吸附很多圆点，40*16 倍下约有 0.1mm，分布多集中于细胞核周围和细胞边缘，中间部位较少
- 消化时可以看到圆点从细胞膜上游离出来，很多，还会动
- 细胞培养液变碱，有大量小黑点游离

解决办法

- ① 添加抗支原体剂量的 pbs 或者其他平衡盐液进行润洗，然后消化
- ② 常规离心，用添加抗支原体（沙星类较为有效）的完全培养液重悬，植入新的培养瓶
- ③ 培养并且密切观察（抗支原体推荐使用的浓度及时间如下）

恩诺沙星 25μ/ml，治疗时间一周

环丙沙星 10μ/ml，治疗时间两周

司氟沙星 10μ/ml，治疗时间一周

治疗时间满后撤药换用普通双抗培养基或者无抗培养基，另外特别说明因为以上药物均抗 G+-，所以添加的时候不需要再添加常规双抗

相关阅读

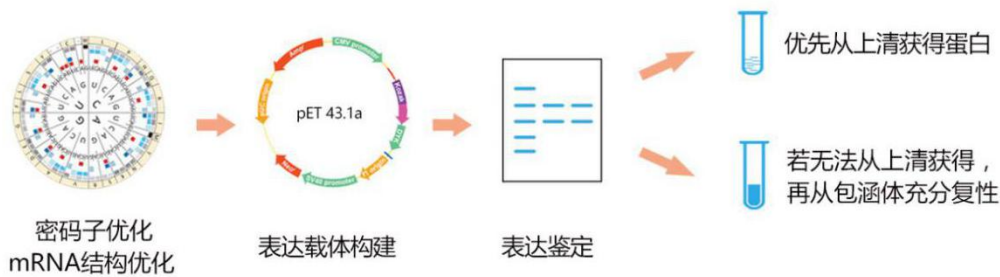
- [细胞传代培养](#)
- [细胞培养常见问题（细胞污染）](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

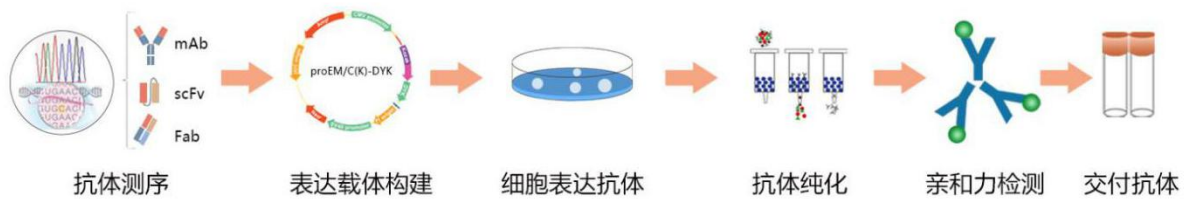
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

