

细胞培养常见问题分析解决

摘要：细胞转染时，细胞状态的好坏对转染效率有很大影响。细胞污染可能会导致细胞死亡，本文主要总结了细胞培养中常见污染现象和解决方法。

细胞污染

凡是对细胞生长有危害的成分或者造成细胞不纯的异物都视为污染。细胞污染根据污染源可以分为化学污染，物理污染和生物污染。

化学污染

细胞培养所用到的培养基，水要高压蒸汽锅灭菌。其中，血清作为细胞培养中常用的培养基，血清存在潜在的化学污染，此外血清成分具有不确定性，血清对不同细胞的生长影响包括毒副作用等存在差异。

物理污染

物理污染，主要指温度、振动、放射线、辐射等物理因素对细胞的破坏。如将细胞液培养基等暴露于放射线或紫外线下，会引起细胞代谢改变。恒温培养箱的周围存在能够产生机械振动的设备，可能也会对细胞生长存在一定影响。

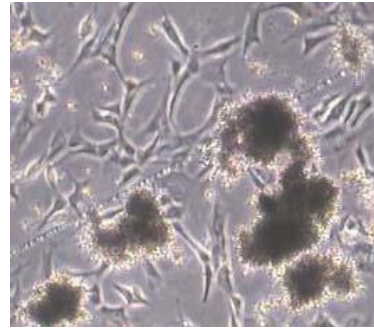
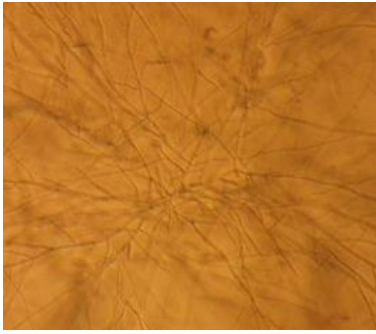
微生物污染

1. 细菌：细菌污染常见的有大肠杆菌，葡萄球菌等。细菌污染较易发现，在普通倒置显微镜下为黑色细沙状，培养液一般会在短时间内变黄，有时静置的培养液不混，稍加震荡，变会有很多混浊物漂起。显微镜下可见培养液中有大量圆球状颗粒物漂浮，有时在细胞表面及周围有大量细菌存在，细胞停止生长并有中毒表现。

处理：

- 在培养液中加入相应的抗生素，能够预防绝大多数的细菌污染
- 保证器皿、水充分灭菌，空气无菌，同时保证灭菌压力。

2. 霉菌：霉菌的污染多数是白色念珠菌，曲霉菌，酵母菌等。霉菌污染后培养液短期内依旧清亮不变浑浊，倒置显微镜下可看见细胞之间有交错的丝状，树枝状菌丝，漂浮在培养液中。念珠菌呈卵圆状，在细胞周边生长。细胞被霉菌污染后，仍可生长，长时间细胞的活力状态会变差。



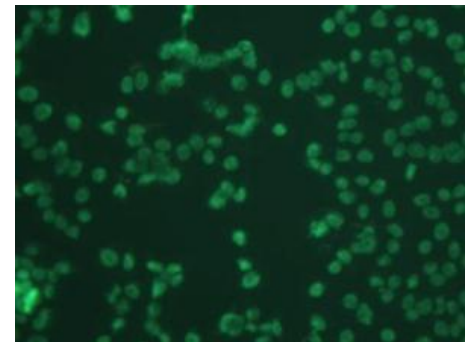
处理：先确定污染物的种类：细菌、真菌还是支原体。如果是霉菌污染。迅速将污染细胞与正常细胞系隔离，并对实验中所用过的所有器皿工具消毒

3、支原体：支原体的大小介于细菌和病毒之间，是一种独立生活的微生物。对热敏感，对一般抗生素不敏感。支原体的形态多变，多吸附在细胞表面和细胞之间。电镜下观察，中心有高密度的密集颗粒，横断面与细胞微绒毛相似。

因国内的血清很多数都没有做支原体阴性检测，而支原体又是牛血清中最常见的微生物之一。支原体污染细胞后，培养液轻微发生混浊，但细胞变化不显著，在细胞逐渐的培养中，细胞会慢慢死亡。

支原体污染检测：

荧光染色法：DNA 和与 DNA 特异性结合的荧光染料结合，使得支原体的 DNA 着色，然后用荧光显微镜观察。镜下支原体为散在于细胞周围或附于细胞膜表面的亮绿色小点。



解决：

1. 抗生素排除法：支原体污染预防比解决好。如果不小心污染后，可加入高浓度抗生素（常规使用的 5 倍浓度）作用 24-48 小时，再换入常规培养液，但该法不保证有效。推荐用量：庆大霉素 200ug/ml，四环素 10ug/ml，卡那霉素 50ug/ml。

2. 加温除菌：支原体不耐热，可以对支原体污染的细胞热处理除菌。将支原体污染的细胞放置 41 度中作用 10 小时可杀死支原体。因高温对细胞本身也会产生一定影响，故热处理前需先进行预实验，确定对细胞影响最小而能最大程度地杀死支原体的时间。

4、黑蚊虫：黑胶虫污染后细胞中出现小黑点，高倍镜下可看见不规则的运动。培养液浑浊不明显，对细胞生长状态无太大影响。

解决：如果细胞出现黑胶虫污染，可增加细胞的接种密度，提高细胞存活率。当细胞生长状态很好时，黑胶虫的数量会降低。细胞培养过程中坚持要每天换液，并用缓冲液冲洗，能够大大降低黑胶虫的数量，可最终消失，偶尔在镜下可见个别小黑点，但整体细胞培养和后续的细胞转染无影响。

细胞培养箱染菌清洗方法

用硫酸铜溶液擦拭 CO₂ 孵箱内，再把水盘里也加上饱和量的硫酸铜。或者在培养箱的托盘加入饱和的消毒磷酸氢二钠高盐液体，可以防止霉菌污染。

CO₂ 孵箱被霉菌污染后，可把所有细胞暂时转移，采用过氧乙酸擦洗孵箱（包括隔板，箱壁）。并把过氧乙酸放置在孵箱内一个小时，使其蒸汽弥漫。待过氧乙酸的气味消散后，再移入细胞。孵箱应定期清洁（2 月左右）。

其它培养箱清洗方法是：用 84 液擦洗 - 清水擦洗 - 75%酒精擦洗 - 紫外灯照。

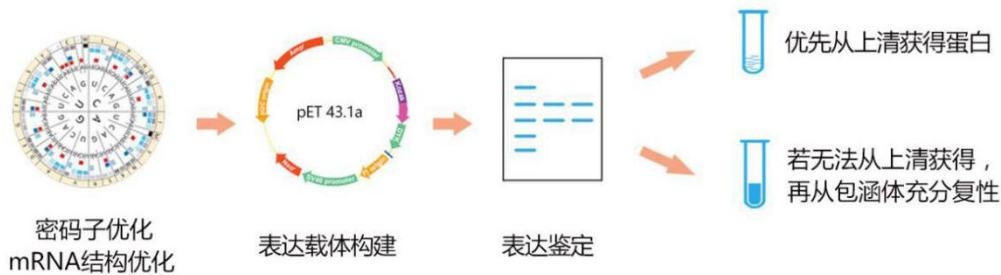
预防霉菌污染，可在培养基里加 3u/ml 的两性霉素或制霉菌素或放线菌素 D 或双抗；但细胞一旦污染，制霉菌素或放线菌素 D 或双抗都无法弥补，舍弃被污染细胞，并将环境彻底消毒。如果所有细胞都污染，可能是整体系统污染，检查所有培养基和器材，并重新灭菌。针对个别污染，首先考虑操作问题，注意操作规范。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

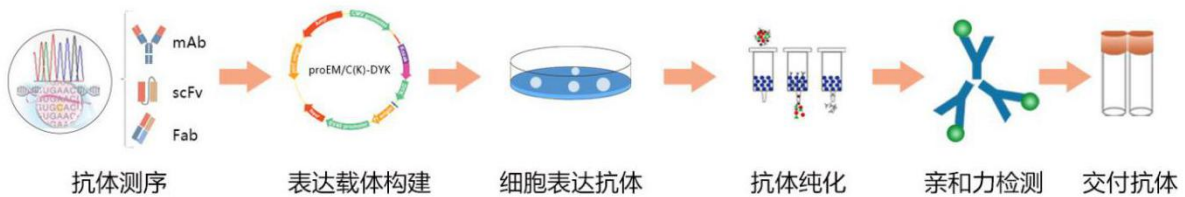
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

