

# 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

- CO<sub>2</sub> 张力不对
- 培养瓶盖拧得太紧
- NaHCO<sub>3</sub> 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 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。松开瓶盖 1/4 圈
- ③ 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 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 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

### 解决方法

- ① 检测培养箱内 CO<sub>2</sub>
- 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）](#)

# 更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

## SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

### 平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

### 可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

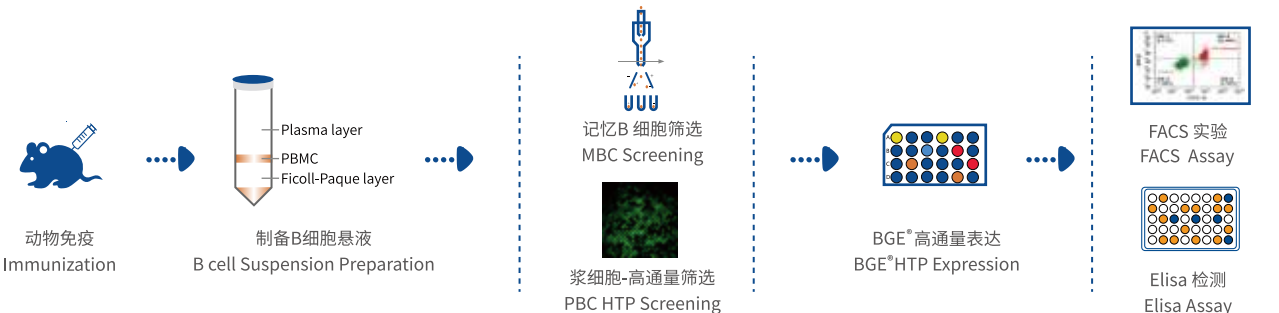


绵羊



人

### 服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

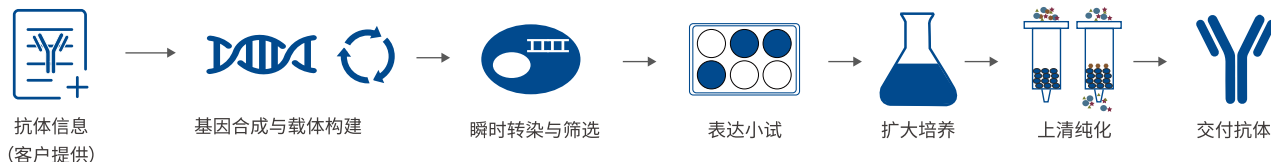
## 重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

### 服务优势



### 服务流程

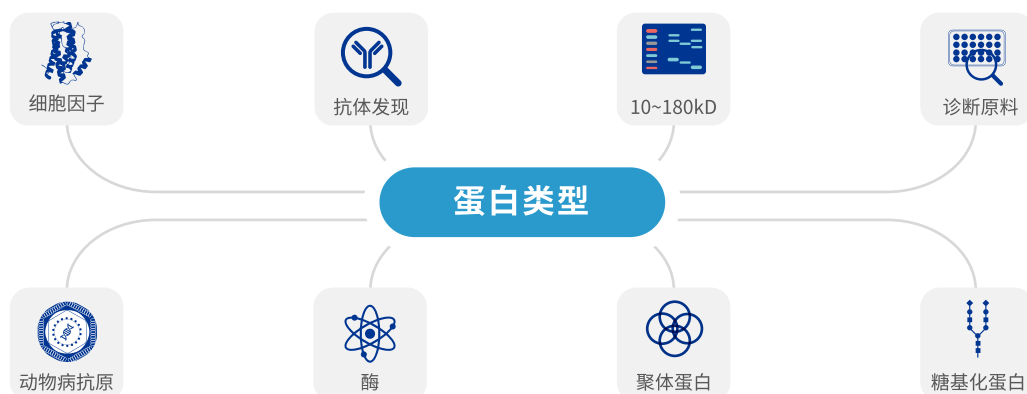


Recombinant Protein Expression Service

## 重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



# 4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

## 杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

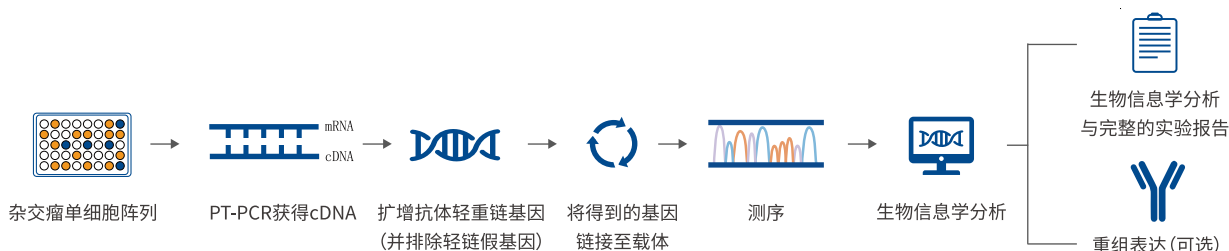
### 应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

### 服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

### 服务流程



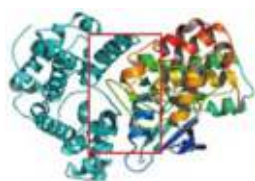
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

## 分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

### 检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

## 抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

### 服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

### 服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

## 生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

### DeepLight®细胞筛选平台的优势

|         | 有限稀释法筛选 | DeepLight® On-chip筛选 |
|---------|---------|----------------------|
| 筛选时间    | 8周      | 1天                   |
| 细胞分离效率  | 低       | 高                    |
| 筛选通量    | 低       | 高                    |
| 单细胞水平筛选 | 否       | 是                    |

### 服务流程



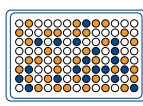
基因合成&质粒抽提



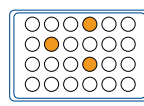
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

### 服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株  
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞  
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台  
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代  
重组单抗可达5 g/L