

Cell culture

细胞培养中发生污染，必须马上告知实验室管理员。
细胞培养箱中任何容器必须注明时间和实验者，不然一发现后立即做为污染被清除。

细胞培养，切忌长过 (over growth)。不同的细胞，要有特有的形态：上皮细胞，有明显的细胞连接（除了MCF10A）；293细胞的状态直接影响转染效率，必须是肥胖的、均一大小的；HeLa及各种成纤维细胞，要极化，要在随机运动。

Contents

- 1 准备工作>>
- 2 结尾工作>>
- 3 配置谷氨酰胺母液>>
- 4 配置细胞培养液>>
- 5 胰酶的配制>>
- 6 细胞冻存>>
- 7 从-80度或者液氮复苏细胞>>
- 8 细胞传代培养>>
- 9 细胞的三维培养>>
- 10 细胞的运输>>
- 11 注意事项>>
- 12 Surface areas and medium volumes>>
- 13 他人的细胞培养攻略>>

准备工作

1. 进细胞房需要全身风淋30秒，出细胞房请务必保证门关闭
2. 每次实验前，打开生物安全柜的风机，抬升玻璃挡板，使空气循环直至"please wait"提示消失（至少5分钟）；如果不放心，之前可以开启紫外灯至少30分钟，然后再开风机
3. 用75%的酒精擦拭操作台，任何物品在放入操作台前都要用75%的酒精擦拭。
4. 细胞培养液从4度冰箱取出，至少回温到室温方可加入细胞；可使用37度暖板帮助升温
5. 开始实验前，请估计所需各类耗材的量，做好储备；尽量避免在实验中频繁出入细胞间，减少污染的可能

建议使用的培养液体积如下（更多信息请看本页底）。开始实验前估算好需要的量，都准备好，避免实验中多次进出细胞房

	培养液的体积
10-cm 培养皿	8 ml
6-cm 培养皿	3 ml
35-mm 培养皿 或 6孔板的每个孔	2 ml
12孔板的每个孔	1 ml
24孔板的每个孔	0.5 ml
96孔板的每个孔	0.1 ml

结尾工作

- 清理桌面，闭紧酒精灯（防止酒精过快挥发）
- 收理培养液等到4度冰箱，关好移液管筒（错开圆形的开口）并放到安全柜侧的小推车上
- 如果耗材不多了，请提醒相关人员及时添加
- 如果是这个阶段实验的最后一人，请按照细胞房门上的注意事项依次关闭相关的设备（荧光显微镜、移液器、真空泵，等）

配置谷氨酰胺母液

- 谷氨酰胺是必需氨基酸；不同于其他aa，L-Glutamine极其不稳定，反复冻融、过久的37度加热或者储存过久都会导致其降解。因此，我们在基于DMEM的细胞培养液中额外添加2 mM L-Glutamine。
- 200 mM 谷氨酰胺母液的配置
 1. 从冰箱干燥器取出谷氨酰胺（生工 GB0224）
 2. 称取合适的量，并计算所需的ddH₂O 【200 mM = 29.23 g/L】
 3. 把谷氨酰胺干粉容器封紧，放回干燥器
 4. 在干净的容器中混合谷氨酰胺粉末与适量的室温的ddH₂O
 5. 经0.22微米的膜过滤除菌后，分装为每管5毫升，-20度冰箱冻存保存

- 使用前，取出合适数量的谷氨酰胺母液，在4度冰箱慢慢化开（一般需要过夜）。
- 目前实验室有100x的GlutaMAX，等同于谷氨酰胺母液，但无需冷冻保存；取用时请严格遵守无菌操作的步骤；若配出的培养基是被污染的，请向实验室管理员指出对应的GlutaMAX。

配置细胞培养液

- FBS（血清）、PS（抗生素，终浓度100 units of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml）取出解冻后，参考如下比例混合均匀

细胞	物种	培养基（未含谷氨酰胺）
MDCK	dog	MEM + 5% FBS + 1X PS
293	human	DMEM + 10% FBS + 1X PS
Rat2	rat	DMEM + 5% FBS + 1X PS
Hela	human	DMEM + 10% FBS + 1X PS + 0.11 g/L sodium pyruvate
NIH3T3	mouse	DMEM + 10% calf serum + 1X PS
Raw264.7	mouse	DMEM + 10% 四季青胎牛血清 + 1X PS
MCF10A	human	DMEM/F12 + 5% horse serum 参照 Brugge Lab >> 另有 20 ng/ml EGF, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 100 ng/ml cholera toxin, 10 µg/ml insulin
K562	human	RPMI-1640 + 10% FBS + 1X PS
Jurkat	human	RPMI-1640 + 10% FBS + 1X PS
Raji	human	RPMI-1640 + 10% FBS + 1X PS
HL-60	human	RPMI-1640 + 10% FBS + 1X PS

默认使用的DMEM和MEM是有指示pH的Phenol Red，含有L-glutamine，而没有额外的HEPES；此外，默认使用的DMEM是有高糖(High Glucose)，而没有Sodium Pyruvate。默认购买每瓶500毫升的液体。

- 注意从500 ml的培养液中取出一定量的serum free medium以保证终浓度的精确；取出的培养液放入50 ml管子，表明日期和培养液类型
- 细胞培养液会吸收空气中的CO₂而变色，因此在使用后要迅速将盖子盖紧
- 细胞房内用水都从Elga进口水机取，标为ddH₂O
- 上述MEM、DMEM，如果从干粉配置，需按照产品说明以及细胞株要求，补充不能高温灭菌的成分（比如碳酸氢钠，需要通过过滤灭菌）
- 如果从干粉制备培养液，而后通过高温灭菌，配一升，只需要定容在900 ml，因为灭菌后还需要加入适量的碳酸氢钠（需要的终浓度见下表，实验室过滤灭菌的stock是75 g/L，碳酸氢钠溶液只能过滤灭菌无法高温灭菌）；过滤灭菌可以直接按需加固体的碳酸氢钠
- 不要尝试用灭菌的水混合号称无菌的干粉直接制备使用的培养液，因为在干粉倾倒入水的过程中，干粉的外包装很容易把培养液给污染了：需要过滤灭菌
- 可从干粉配置3 L的培养液，而后使用一个filter unit，过滤灭菌到多个瓶中，建议每瓶体积450 ml；期间注意打开真空泵的循环水，水温升高会导致真空效率降低
- 参考手册：从干粉配置培养液 (**product manual**>>)
- 细胞培养液新制备后，必须进行1-2天培养，测试没有污染后再大范围使用
- 暂时不使用的细胞培养液要避光，在4度保存

需要添加的NaHCO₃的量

种类	公司	货号	每升最终的量	75 g/L equals
DMEM	Gibco	12100*	3.7g	20.3x
DMEM	HyClone	SH30003.12	3.7g	20.3x
MEM	Gibco	61100*	2.2g	34.1x
MEM	HyClone	SH30008.12 (SH30327.02没找到直接的信息)	2.2g	34.1x

- ready-to-use的培养液（包括了正确浓度的碳酸氢钠、抗生素和血清，经过预培养测试），需要标记清楚：使用人，培养基添加的成分，将培养的细胞
- 血清加热失活：历史上这么做是为了杀死支原体 (mycoplasma)，那时的0.45µm过滤无法除去支原体，但因为现在血清供应商都把血清通过0.1µm过滤灭菌，所以不需要加热杀支原体了。另一方面，血清加热会导致血清中某些生长因子失活；如果这是有利于特定细胞生长的，那还是要处理的。具体操作是：
 - 准备56度水浴，需要有足够多的水可以彻底浸入血清容器
 - 血清在56度放置30分钟，每过3-5分钟摇匀
 - 降至室温，用于实验；可以放置冰上加速降温
 - 整个过程要防止热水污染血清

胰酶的配制

将5ml EDTA stock 100 mM（终浓度1mmol/L），0.125 g胰酶粉末加入到500ml PBS中，混合均匀，可以加入phenol red，而后用滤器除菌，放在-20度冰箱中备用

细胞冻存

- 细胞冻存时，用trypsin把细胞悬浮，重悬于含**10% DMSO**的细胞培养液（对于比较敏感的细胞，可以采用相对高血清的培养液冻存/复苏）。对于一个长满的10 cm的培养皿，重悬在1.5 ml中，而后分到3个冻存管。在冻存管外标明编号、细胞的名称、冻存时间、操作者，录入相关数据到数据库。
- 细胞冷冻时要慢（通过 **Cell Freezing Container**>>，暂时存放-80度冰箱，并需要在一个月内在转入液氮罐用于长期保存，其中的金属块需要是室温才能达到设计的效果）。液氮保存时，最后使用液氮罐内顶部和底部的空间；顶部空间受盖子开关的影响较大，底部空间接触液氮可能性很高。如下面的引文，液氮罐内必须使用质量最好的冻存管，并注意化冻时可能发生的爆裂。

Cryogenic vials are intended for placement only in the vapor phase of liquid nitrogen, and should not be used for storage in the liquid phase of liquid nitrogen. Immersion of the vials in the liquid phase could result in penetration of the liquefied gas into the vial, resulting in rapid vaporization of the liquid upon removal and possible violent explosion or leakage from the vial/closure perimeter.

- 刚开始细胞冻存的，务必通过复苏来检查冻存的效率。
- 关于冻存管取出时的爆裂：进液氮的细胞的冻存需要使用进口冻存管；**冻细胞时千万拧紧**，不然要么炸、要么液氮内杂质污染细胞；管子外壁要干燥。取细胞要快，在冰上快速找到，找到了手捏着加快升温；注意避免冰结在管子盖缝隙，不结冰即使液氮渗入气化氮气也能漏出来。炸是因为液氮渗入管内，升温时四周凝水、马上结冰、彻底堵住了盖子四周；液氮气化，体积增大而破管而出。即使爆管，珍贵细胞还是值得挽救，注意很可能发生的污染。
- **取放液氮内的细胞，要目标明确，两人分工：谁抽掉挡盒子的铁杆 谁需要在第一时间插回去，没有插回铁杆前 千万不要动，谁拿出塑料盒子取细胞 需要尽快合好盒子放回。**10x10管子高度不够，可以放一张四折的纸在上面压着防止管子乱窜。

从-80度或者液氮复苏细胞

细胞解冻时要快（手握或者放37度暖板上）

1. 从-80度或液氮中取出细胞并快速解冻；取时注意保护，防止冻伤或者试管爆裂；同时，注意快速，尽量减少其他样品暴露在空气中的时间
2. 将化开的细胞加入到5 ml培养液中，1000 rpm离心5 min，离心后小心地移去上清（也可以直接把化开的细胞，放在培养皿，加少量的培养液，等细胞贴壁后，换培养液；仅适合贴壁很快的细胞，如MDCK, MCF10A）
3. 取10 ml细胞培养液，将位于管底的细胞重悬，转移到10 cm的培养皿中，做好标记，放入细胞培养箱中培养（培养箱的条件设为37度、5% CO₂）
4. 注意观察细胞贴附到培养皿底部的状态，并根据细胞死亡情况，及时更换细胞培养液

对于关键的细胞株或之前复苏失败了，建议采用小面积培养皿进行复苏，并尽快去掉DMSO：若冻存细胞体积0.5ml，使用6孔板的孔，2ml新鲜培养基，划开的细胞移入后混匀，2-5小时静置等待细胞贴壁（摇动平板而细胞不会动），吸去所有培养基，加入1.8ml左右新鲜培养基，密切关注后续细胞生长；若冻存体积在1ml，15ml离心管加4ml培养液，混匀，离心收集细胞，而后重悬到六孔板的一个孔。

细胞传代培养

1. 取出37度培养的细胞，加入PBS + 2mM EDTA润洗一遍（10 cm培养板使用5 ml）
2. 加入2-3 ml 0.25% Trypsin（基于1 mM EDTA的PBS溶液配置），37度温育，直到轻敲培养皿边缘，可看到细胞浮起（MDCK/MCF10A需时在10分钟左右，建议使用PBS+EDTA两次润洗后添加胰酶；成纤维细胞胰酶悬浮所需时间较短；过度的Trypsin酶解对细胞不利）；the cells should be completely dissociated from the plate to avoid clonal selection of adherent cells.
3. 加入含血清的细胞培养液，中和Trypsin，轻轻吹打将贴壁细胞冲下，收集到离心管，1000 rpm离心3-5 min，弃上清（如果做1:10传代或者细胞比较能耐受残余的Trypsin，可以不离心，直接把需要的细胞和新培养液混合）
4. 使用新的细胞培养液重悬，37度培养（同一个培养皿可以使用3次左右，记得在皿盖上标记清楚）

注意点：

- 悬浮细胞，可以：1，加入PBS+EDTA，通过螯合钙离子破坏细胞间相互作用实现悬浮；2，加入Trypsin，使用胰酶消化细胞外基质和细胞间相互作用（一般使用的Trypsin浓度为0.25%，特殊情况下，使用浓度为0.025%的以部分保持细胞间相互作用）；1和2同时采用。
- 细胞长到密度在95%左右时，必须进行传代；过密生长的细胞很容易发生遗传突变；一般两到三天需要更换一次细胞培养液；曾经长过的细胞会难以被转染、难以被感染
- 养细胞，传代超过1个月，要小心是否老化；除了形态变化外，老化的细胞的，转染、感染效率都会下降。发现细胞老化，要重新复苏；尤其是大量的包装病毒、感染等实验时，**请用新近复苏的293FT细胞和日标细胞**
- If you are dealing with multiple plates of MDCK or MCF10A, it is very important to process only 1 or 2 plates at a time. These cells will reattach if they are not resuspended in a timely manner after the serum is added.

细胞的三维培养

1. 从-80度冰箱取出Matrigel（升温到37度就将固化，千万保持其低温状态；一旦固化，放置4度至少1天，可能重新液化），在冰上使之融成为液态。取细胞培养玻璃皿chamber slide/chambered coverglass，在冰上充分预冷
2. 吸尽玻璃表面的冷凝水，用200 μl枪头尖在chamber slide底部均匀地涂上Matrigel原液4 μl/室，四个角都要涂到，置于37度培养箱待其固化（至少10分钟）
3. 在1.5 ml离心管中加入培养液250 μl/室，并加入终浓度为2% Matrigel
4. 取已终止消化的单细胞悬浮液适量（需要数细胞浓度，最终每室4500细胞用于单细胞起始的clonal cyst的培养，2倍的量用于多细胞起始的mosaic cyst的培养），与上步中所得培养液充分混匀（一般要充分吹打10次），至吹打出气泡，以保证细胞充分分散

为单细胞状态（如需要培养mosaic cyst，吹打可略偷懒）

5. 种子chamber slide中，37度培养（24小时cyst已经极化；3天应该可以看到lumen，充分混匀的MDCK T23 clonal培养应该是大于95%的cyst是single lumen的；6-7天的cyst彻底成熟）

整个过程注意防止“冰”的污染，冰盒置于安全柜靠外边，用移液枪取Matrigel时应擦干干净离心管盖边。

漂亮的clonal cyst生长：>70%的cyst在3天起始single lumen，>90%的cyst在5-6天看上去很均一；实现的关键点

- MDCK健康成长，三天1/5铺的会长满，铺后一天有明显的cell-cell junction
- 铺前一天，Trypsin悬浮，做1/10~1/5的传代，使铺的时候要悬浮的细胞生长旺盛且仅有少量的细胞相连
- 铺的时候，打匀，最后铺上去的时候至少吹打10次，打出了气泡的

细胞的运输

- 使用干冰冷冻运输：足量干冰（建议同时放冰袋，用作干冰彻底挥发后估计干冰消失的长度），-80度或者液氮冻存的细胞，泡沫保温箱（最好有纸箱外包，防止撞击对保温箱的破坏）；塑料封带需要留缝，作为二氧化碳溢出的途径
- 使用常温运输：悬浮细胞于20% FBS的培养液，存放在15-ml的离心管；尽量避免气泡；封口并装于多层密封塑料袋中
- 同时附上：发件人、收件人的信息，内含物的信息

注意事项

- 在配置试剂时，要标注时间、姓名、试剂成分。
- 传代时，胰酶消化细胞之前，要用PBS洗干净残留血清。消化时应注意全血细胞悬浮时再终止消化。传代后细胞如果部分不均匀或过密，第二天应再次传代。
- 用胰酶消化细胞至圆形时，侧面轻轻敲打培养皿加速细胞悬浮，注意一定要轻轻敲打，以免液体被溅出培养皿，造成污染。
- 培养皿中正常的MDCK细胞状态应是数个成团分布，死细胞不多，全皿分布均匀；状态不好的MDCK会有鱼鳞状漂浮物，多半是因为培养基成分不佳导致。
- 操作时，培养皿放在台面上；不需要单手持皿，极易导致皿沿沾有培养基而发生污染。
- 吸液体的铜管不能长时间灼烧，过火一两次即可。
- MDCK贴壁很牢，显微镜下即使细胞形态变圆也较难吹打下来，所以要等到全血细胞都悬浮时再终止消化，但对于其他的一些细胞比如常用的293,CHO等，细胞变圆即可加入完全培养基中和Trypsin，吹打。
- 使用新的细胞培养液重悬培养时，6 cm的皿，需加入3-4 ml，否则细胞长势不好。
- 用枪传代，使用枪移动细胞时要轻打轻放，以免污染。
- 不要把液体吸到移液器了，这最容易发生是在实验过程时分心；移液器吸液慢可能是因为移液管开头太小或棉花堵塞，但若彻底无法吸液体，是因为液体进入移液器，移液器的保护装置锁住了。
- 细胞培养液到了侧沿：若在hood内发生，小心吸去边上所有液体，可能还好；若在空气中发生，很危险，要小心，即使在空气中皿盖半开都有可能发生污染。
- 在使用灭菌的物件时，确认外包装完好，灭菌指示带已经变黑。
- 当发现培养的细胞被污染时，不要尝试挽救该细胞，要将其正确处理掉（培养皿加几滴浓的84消毒液，轻轻摇匀，等其变色后扔掉，对应的培养箱位置用75%酒精擦拭）；通知所有成员；同时，排查细胞培养使用的试剂，如无法确认污染源，需正确处理各个试剂。
- 避免真空泵内的循环水太少。循环水需要经常更换。
- 废液瓶内废液，需加入浓的84消毒液，摇匀，待其变色后方可倒入下水道。
- 生物安全柜手掌处的网格要保持畅通，不然会有“airflow warning”的警报。
- 细胞房内有两个垃圾桶；红色标示的垃圾桶用于放置接触了血清的垃圾，需要灭菌处理，橘红色袋子口，要用金属丝松松扎上，先灭菌，然后作为普通垃圾；松松扎上就是确保灭菌过程中热充分和垃圾袋内的东西交换。
- 更多的实验操作注意事项请看 [good practices](#)>> 页面。
- 节假日前，根据实验室的二氧化碳和液氮的更换记录 [CO2 LN2](#)>>，确保假期不发生相关耗材的短缺。
- 2014-6-3
 - 铜质培养箱养细胞，每人占一格。
 - 不锈钢培养箱的温度已经设到了32度，专门给病毒增殖和感染；实际操作时，质粒转染293后，第二天必需更换为目标细胞的培养基，细胞移到32度培养48-72小时，然后收集含病毒的培养基；或者-80度保存，或者离心后，加到合适密度的目标细胞；目标细胞在32度培养一天，再放回37度（如果需要，放回37度前可补加培养基）.....
 - DNA转染，Fugene / Lipofectamine / PEI 等，建议使用的空白培养基是opti-MEM，有分装的在4度，按需取用，各人一管；opti-MEM 经验上会略微提高转染效率。
 - 目前293和MDCK使用购买的液体培养基，配置成完全培养基前取出的空白液请收在50-ml管中，parafilm封好，会定期整理。Hela使用干粉配置的液体培养基，定容在450ml左右，无需取出空白液。100x L-谷氨酰胺和100x PS都是分装了保存在thermo -30；如果是10-ml分装的，取了5-ml后留下5-ml的，请在放回前封好parafilm。100x PS可以不添加，可能会稍微帮助细胞的生长。
 - 活细胞成像信号弱的，建议使用phenol red free MEM和fluorobrite DMEM配置专用培养基

Surface areas and medium volumes

代号	培养环境	培养面积 (平方厘米)	Corning建议的 培养体积 (毫升)
P96	96孔平底 细胞培养板	0.32	0.1~0.2
P24	24孔 细胞培养板	1.9	0.38~0.57
P12	12孔 细胞培养板	3.8	0.76~1.14
P6	6孔 细胞培养板	9.5	1.9~2.9
D35	35mm 细胞培养皿	9	1.8~2.7
D6	6cm 细胞培养皿	21	4.2~6.3
D10	10cm 细胞培养皿	55	11~16.5
D15	15cm 细胞培养皿	152	30.4~45.6
T25	25cm ² 细胞培养瓶	25	5~7.5
T75	75cm ² 细胞培养瓶	75	15~22.5

整理自 [File:Cc surface areas.pdf](#)>>

他人的细胞培养攻略

- 上海生命科学研究院细胞资源中心 <http://www.cellbank.org.cn/peiyang.asp>>>
- [2012的细胞培养体会](#)>>

Categories>>: [Lab](#)>> | [Library](#)>>