

细胞培养的基本条件



ustcwhm@ustc.edu.cn

《细胞生物学实验方法与原理》教学计划

教室：3115

上课时间：周四下午14:00-16:25

周次	教学时间	授课教师	教学内容
2	2010-09-09	魏海明	细胞培养的基本条件
3	2010-09-16	魏海明	细胞培养的基本技术-I
4	2010-09-23	魏海明	细胞培养的基本技术-II
5	2010-09-30	魏海明	培养细胞的基本特性
6	2010-10-07		国庆放假
7	2010-10-14	吴旭	高级显微镜原理及技术/显微切割技术
8	2010-10-21	吴旭	激光共聚焦显微镜技术
9	2010-10-28	王黎丽	流式细胞术
10	2010-11-04	刘雅静	细胞转染技术
11	2010-11-11	刘雅静	活细胞工作站技术
12	2010-11-18	罗昭锋	生物发光技术
13	2010-11-25	罗昭锋	Biacore技术
14	2010-12-02	魏海明	荧光定量PCR技术
15	2010-12-09	魏海明	生物安全实验室技术

16	2010—12—09至2010—12—30:		
17	每位同学任选以下2项技术进入相应仪器室随指导老师实习，		
18	并完成实习报告，获得上岗证书，总学时不得少于 $3 \times 4 = 12$ 学时:		
19	1. Biacore技术 (欧惠超)		
20	2. 化学发光与生物发光检测技术 (罗昭锋)		
	3. 激光共聚焦显微镜技术 (主辅修人数各<20人) (吴旭)		
	4. 流式细胞术 (主辅修人数各<20) (王黎丽)		
	5. 活细胞工作站技术 (主辅修人数各<20) (刘雅静)		
	6. 液质联用技术 (吴高)		
	7. 气质联用技术 (熊英)		
	8. 毛细管电泳及蛋白质测序技术 (施荣华)		
	9. 荧光定量PCR技术 (张海燕)		
	10. 离心技术 (王昊)		
	11. HPLC及蛋白质纯化技术 (周宏敏)		
20	2010-01-06	魏海明	考试

细胞培养的基本条件

无菌条件：净化工作室，风淋室，传递窗，高效过滤器，
洁净层流罩，生物安全柜，超净工作台，紫外
灯，电热干燥箱，滤器，高压灭菌器，抗生素

细胞生长条件：纯水蒸馏器，纯水仪，培养板，培养瓶，
CO₂培养箱，培养基，血清

细胞检测条件：倒置显微镜，酶标仪，微孔板震荡器，高
速离心机，移液器

细胞保存条件：液氮罐

实验室安全：生物实验室安全，P1, P2, P3实验室安全

净化工作室

----- 我国药品生产洁净室（区）空气洁净度标准 -----

洁净度级别	尘粒最大允许数/立方米		尘粒最大允许数	
	$\geq 0.5\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	浮游菌/立方	沉降菌/皿
100	3,500	0	5	1
10,000	350,000	2,000	100	3
100,000	3,500,000	20,000	500	10
300,000	10,500,000	60,000	NA	15



空气尘埃测试仪



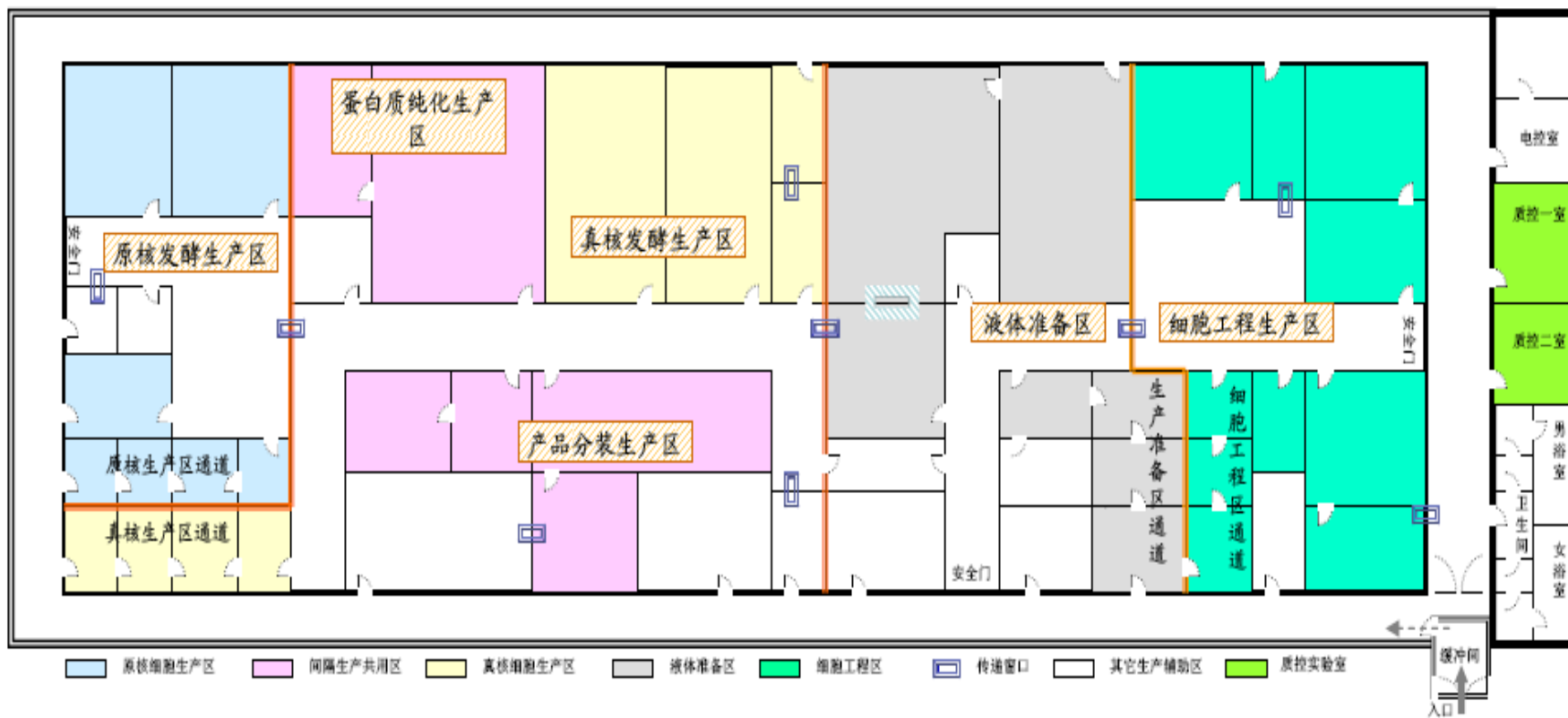
尘埃测试仪，空气尘埃测试仪的详细介绍

JXN-300台式空气粒子计数器是用于测量洁净环境中单位体积内尘埃粒子数和粒径分布的仪器。其基本原理是光学传感器中的探测激光经尘埃粒子散射产生信号脉冲，然后对其输出的脉冲信号进行数字信号处理,仪器的测量参数设定、测量结果显示、按键、定时、打印、时间、日期、数据存储等均由内置微机(MCU)控制和实现,仪器可同时显示环境的温湿度并监测报告激光粒子传感器的工作状态。

该粒子计数器按照国际通用标准设计(空气采样流量为2.83 升/分),能同时对设定的两个粒径档进行检测,采样时间可根据用户需要任意设定,最长不超过59分59秒,采样数据可储存在内置的闪存内。该仪器在引进美国的技术上进一步创新,具有测量精度高,性能稳定,功能强,体积小,操作简单方便,达到和超过了国际同类产品的性能指标。

计数超限报警: 仪器可设置4级(十级)、5级(百级)、6级(千级)、7级(万级)、8级(十万级)、9级(百万级)六个级别的计数超限报警

中国科学技术大学生物工程GMP中试基地生产区域划分平面图



细胞工程中试基地平面图



真核细胞生产区



真核细胞生产区一角



细胞工作室净化工程设计规范

《采暖通风与空气调节设计规范》 GB 50019—2003

《医药工业洁净厂房设计规范》 GBJ191-87

《净化厂房设计规范》 GB50073-2001

《建筑防火设计规范》

《制冷设备安装工程施工及验收规范》

《现场设备、工业管道焊接工程施工及验收规范》 GB50236-98

《电气装置安装工程1KV及以下配线工程施工及验收规范》 GB50258-96

《电气装置安装工程电气照明装置施工及验收规范》 GB50259-96

质量标准

《医药生产质量管理规范》（GMP）

《GMP认证检查评定标准》

《洁净室施工与验收规范》 JGJ71-90

《药品非临床研究质量管理规范》（GLP）

《通风与空调工程施工及验收规范》 GB50243-2002

风淋室：

风淋室是生物洁净室的理想配套设备，它不仅可以清除人体和物品表面附着的尘埃，减少带入洁净室的灰尘量，而且兼有气闸室的功能，可防止非洁净空气的侵入。风淋室的板壁采用轻质隔热夹芯钢板，吹淋板采用进口不锈钢制作，吹淋口方向可调，风淋时间可在30-99秒间的调整。风淋室可以配合加热器，冬天可以加热，温度可调，一般控制温度在30-35℃较为适宜。



传递窗：

该装置是一种洁净室的辅助设备，主要用于洁净区与洁净区，洁净区与非洁净区之间小件物品的传递，以减少洁净室的开门次数，把对洁净区的污染降低到最低程度。

PB系列传递窗按用途分为标准型和生物洁净型两种。（后者带空气自净装置）按门互锁形式分为机械互锁和电子互锁两种外壳按材料分为彩钢板型、薄钢板喷塑型和全不锈钢型三种通用型尺寸如下表所列，特殊规格按用户要求制作。



高效过滤器：

高效过滤器是用超细玻璃纤维纸作滤料，胶板纸作分隔板，可与铝合金框、木框及镀锌钢板框组合而成。

特点：具有低阻高效、轻质、容尘量大等特点，层高的要求，缩小净化设备静压箱体积等优点。

适用于常温常压常湿条件下环境空气的净化，尤其适用于需要高效空气过滤器覆盖率高的净化厂房。



洁净层流罩：

技术性能参数：

- (1) 净化等级：100级(美国联邦标准209E)
- (2) 平均风速：0.25~0.45m/s(可调)
- (3) 噪音：≤62dB(A)
- (4) 电源：220V/50HZ

层流罩是可提供局部高洁净环境的空气净化设备。它主要由箱体、风机。初效空气过滤器、高效空气过滤器、阻尼层、灯具等组成，外壳为不锈钢或彩钢板。该产品既可悬挂，又可地面支撑，结构紧凑，使用方便。可以单个使用，也可多个联接组成带状洁净区域，形成洁净隧道。

洁净层流罩是将空气经风机以一定的风压通过高效空气过滤器后，由阻尼层均压，使洁净空气呈垂直层流型气流送入工作区，从而保证了工作区内达到工艺所需的高洁净度。



无菌条件



无尘服，净化服特性：

- 选用优质聚酯长纤维面料，兼备高级无尘服，净化服各项特殊要求（无尘性、过滤性、舒适性、耐久性、难附着性、易穿着性）
- 进口优质的导电丝确保产品优良的防静电性能
- 专用聚酯长纤维线缝纫机，独特的缝制工艺和技术
- 先进的进口清洗设备，10级、100级的洁净室能够为要求最严格的客户提供服务
- 先进的测试仪器和手段，严格的品质管理体系，确保每一件成品具有高品质
- 条码管理系统跟踪衣服的使用情况
- 无尘服，净化服应用领域：
电子、微电子、半导体、液晶、医药、生物、工程、光学、航天航空等行业

生物安全柜的选择

适用范围		适用性能						
		超净	I级	IIA		IIB		III级
				A1	A2	B1	B2	
保护对象	人	-	+	+	+	+	+	+
	环境	-	+	+	+	+	+	+
	样品	+	-	+	+	+	+	+
实验室	I	+	+	+	+	+	+	-
	II	-	+	+	+	+	+	-
	III	-	+	+	+	+	+	+
	IV	-	-	±	±	±	±	+

超净工作台

- **■**超净工作台的工作原理是利用鼓风机驱动空气通过高效过滤器除去空气中的尘埃颗粒，使空气得到净化。净化空气徐徐通过工作台面，使工作台内构成无菌环境。



II级A型生物安全柜：

一种既能使操作造成无菌、无尘的局部空气环境，保证检验、检测不受污染，又能保证被研究的对象（如病菌、细菌等）不外溢，保护周围环境及操作人员的安全隔离设备。

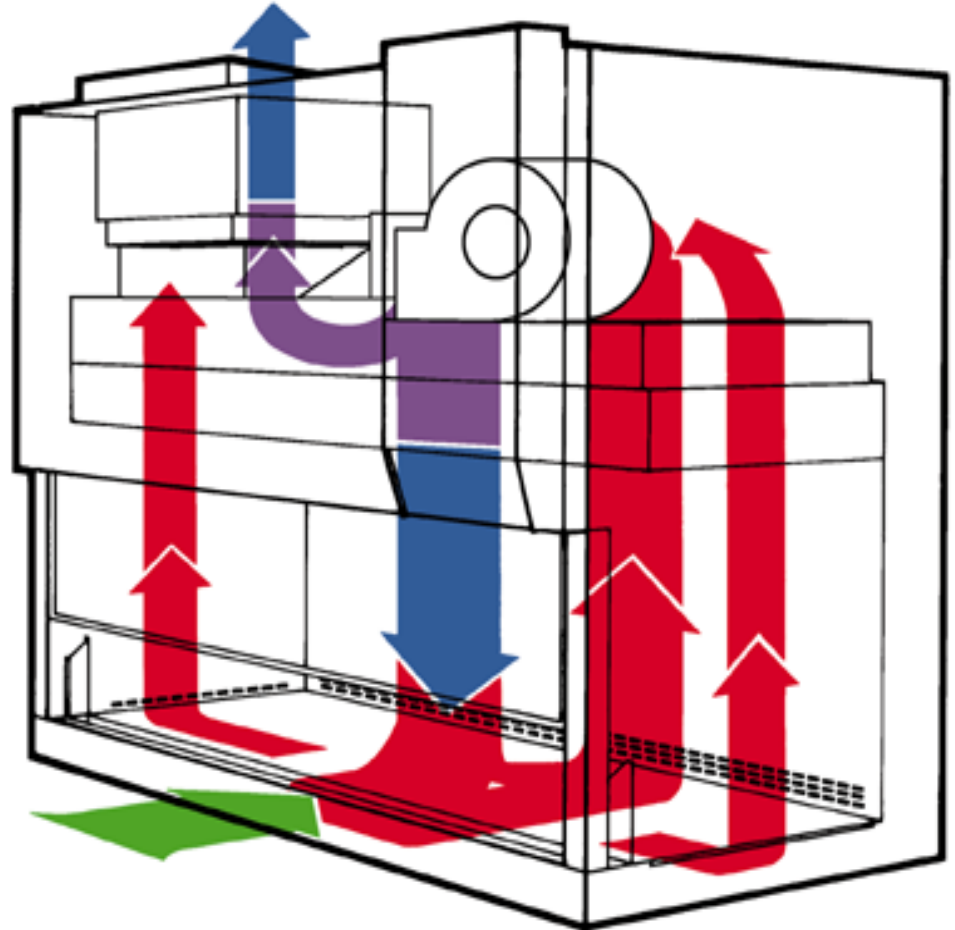
该设备可广泛应用于低、中等危险度（病原体1--3，DNA重组P1--P3）的临床细菌学，病毒学、微生物学、组织培养、生物学及生命科学的研究，加工、检验部门。



A2型生物安全柜

- 100 fpm 吸风量
- 70% 气体循环使用 .
- 30% 气体排出，既可以接管道外排，也可以不接管道直接排放在实验室

- 环境空气
- 污染的空气
- HEPA 过滤的空气
- 负压的污染空气



B2 型生物安全柜

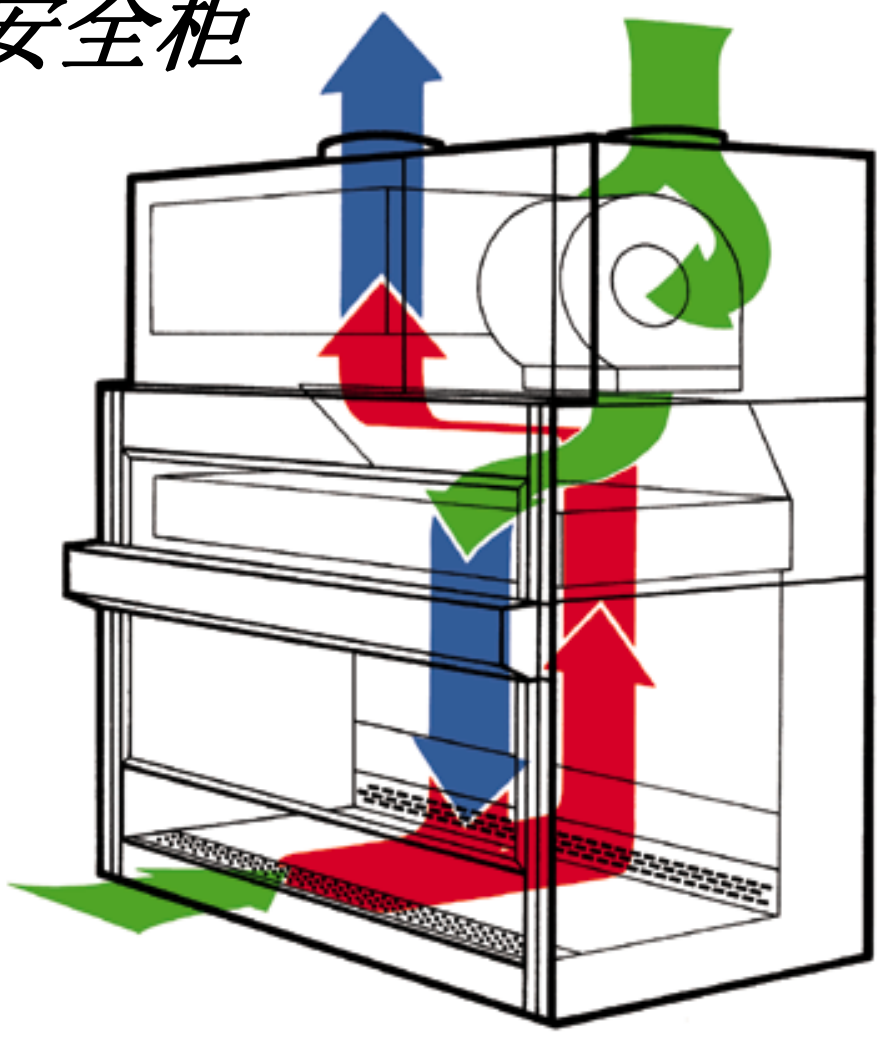
“全排”

100 fpm吸气量

0% 气体循环利用.

100% 气体外排，适用于
P3实验室

- 环境空气
- 污染的空气
- HEPA 过滤的空气
- 负压的污染空气



紫外灯：紫外线消毒。主要用于培养室空气、操作台、塑料培养皿和培养板等表面消毒



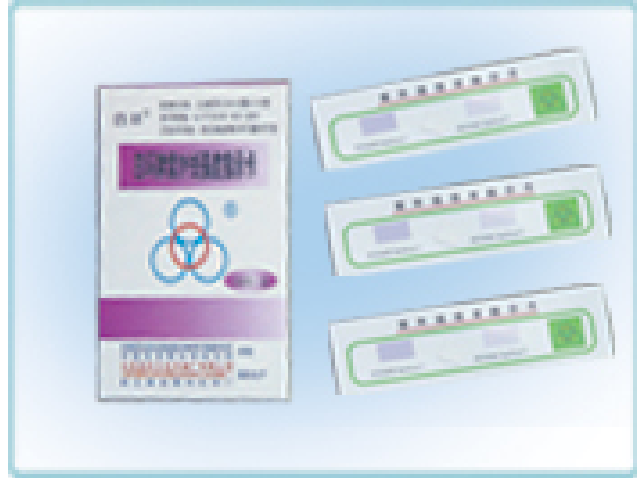
紫外灯大约分为3种，分别是UVA、UVB和UVC。

UVC是目前工业上所应用的紫外线杀菌灯(253.7nm)，是最常见的一种。

高功率紫外线灯经8000小时，一般紫外线灯则在3000小时后功率会降至原来70%，这时就应该更换。

国内的标准是：30W新灯管的辐射强度 $\geq 90\text{uw/cm}^2$ 为合格；使用中辐射强度应 $\geq 70\text{uw/cm}^2$ 。少于此标准就要更换。

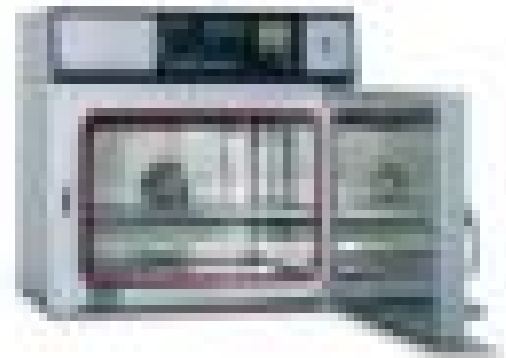
紫外线辐射强度化学指示卡



【性能特点】 紫外线辐射强度化学指示卡是利用对波长 253.7nm 的紫外线敏感的化学物质和辅料配成印制油墨，印制在紫外线光敏纸上。将紫外线光敏纸粘贴在卡片纸中央，在卡片纸的两端分别印上辐射照度为 $90 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 和 $70 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 的标准色块。

【适用范围】 检测紫外线灯辐射照度（ $90 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 和 $70 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ ）是否达到使用要求。用于紫外线辐照强度的日常监测，以便了解紫外线灯使用情况和及时进行更换。

【使用方法】 测定时，打开紫外线灯管 5min 待其稳定后，将指示卡置于距紫外线灯管下方垂直 1m 中央处，将有图案一面朝向灯管，照射 1 分钟。紫外线灯照射后，图案中的紫外线光敏纸色块由乳白色变成不同程度的淡紫色。将其与标准色块相比，即可测知紫外线灯辐照强度值是否达到使用要求。指示卡上左右两个标准色块，表示在规定测试条件下灯管的不同辐照强度值，一个为 $70 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ ，一个为 $90 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 。若测试的 30W 新紫外线灯管辐射强度值 $\geq 90 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 为合格。使用中的旧灯管，辐射强度值 $\leq 70 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ ，为不合格。紫外线灯的辐照强度值 $\leq 70 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ 时应更换成新灯管。



电热干燥箱：
干热消毒（160 °C ， 2小时），
主要用于玻璃器皿消毒。



Zeiss滤器： 过滤除菌：大多数培养用液，如人工合成培养基、血清、酶液等均采用滤过法除菌



针头过滤器

无菌条件



大容量高压灭菌器



全自动手提式灭菌器

实验室安全

层流净化细胞培养室管理规则

一级生物安全防护实验室

二级生物安全防护实验室

三级生物安全防护实验室

四级生物安全防护实验室

层流净化细胞培养室管理规则

我院层流净化细胞培养室设计标准为万级，专供细胞培养、冻存以及细胞治疗用。层流净化细胞培养室的总体要求：经济、有序、高效、安全。初步制定相关制度如下：

1、准入制度：

- 1) 必须取得实验室相关实验技能考试合格方可进入层流净化室；
- 2) 在本室工作的实验人员应严格遵守本室工作守则，外来人员在进入净化室工作之前，必须接受培训；
- 3) 没有经过培训的人员不得单独进入净化室工作；
- 4) 进入净化室后要保持安静，不得大声喧哗。

2、安全制度：

- 1) 层流净化室内必须注意安全用电；
- 2) 谨慎使用酒精灯，不能在有明火的情况下加、换酒精；
- 3) 实验人员自觉维护室内设备的安全使用，对室内的仪器如CO₂孵箱等要经常注意机器运转情况，发现问题及时检修或报告请人检修；
- 4) 离开层流净化室必须断开必要的仪器电源；
- 5) 对不符合层流净化室安全规定的行为主动报告主管老师。

3、卫生消毒制度：

1) 一般情况下细胞间每日消毒一次（包括两个缓冲间），方法为紫外线消毒（每次30分钟至1小时）一次，另外每周用10%乳酸在紧闭门窗下熏蒸30分钟；

2) 实验完毕应及时清理所用物品，注意台面整洁；

3) 及时清洗所用隔离衣，并高压灭菌后存放于指定位置（每日一次）；

4) 除实验必须的用品外，其它物品不得带入净化室；

5) 层流净化室内所用仪器及附属设备均应在指定范围内使用，不得随意转移地点，以便他人顺利使用；

6) 层流净化室实施值日生负责制，值班人员负责检查室内是否保持清洁整齐，督促违反规定者改正错误。

4、出入制度：

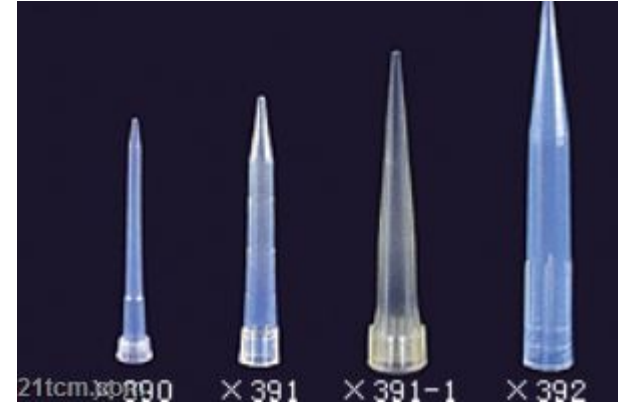
总体原则为进出净化室应按次序开、关门，只有将前面打开的门关闭后才允许打开下一个门，出入线路绝对不能逆行，使缓冲间起到应有的作用。

1) 层流净化细胞培养室共有两个缓冲间，进入每个缓冲间必须更换指定消毒的拖鞋；

2) 穿戴好消毒的鞋、帽、口罩后不得逆行离开层流净化室；

3) 人流：打开细胞培养室外门，进入第一缓冲间，开灯，关闭细胞培养室外门，穿戴专用的洁净隔离衣、工作鞋帽、口罩等；打开第一缓冲间内侧门，进入第二缓冲间，新洁尔灭泡手1分钟，烘干，关闭第二缓冲间外侧门；打开第二缓冲间内侧门，进入层流净化细胞培养室，关闭层流净化细胞培养室外门。

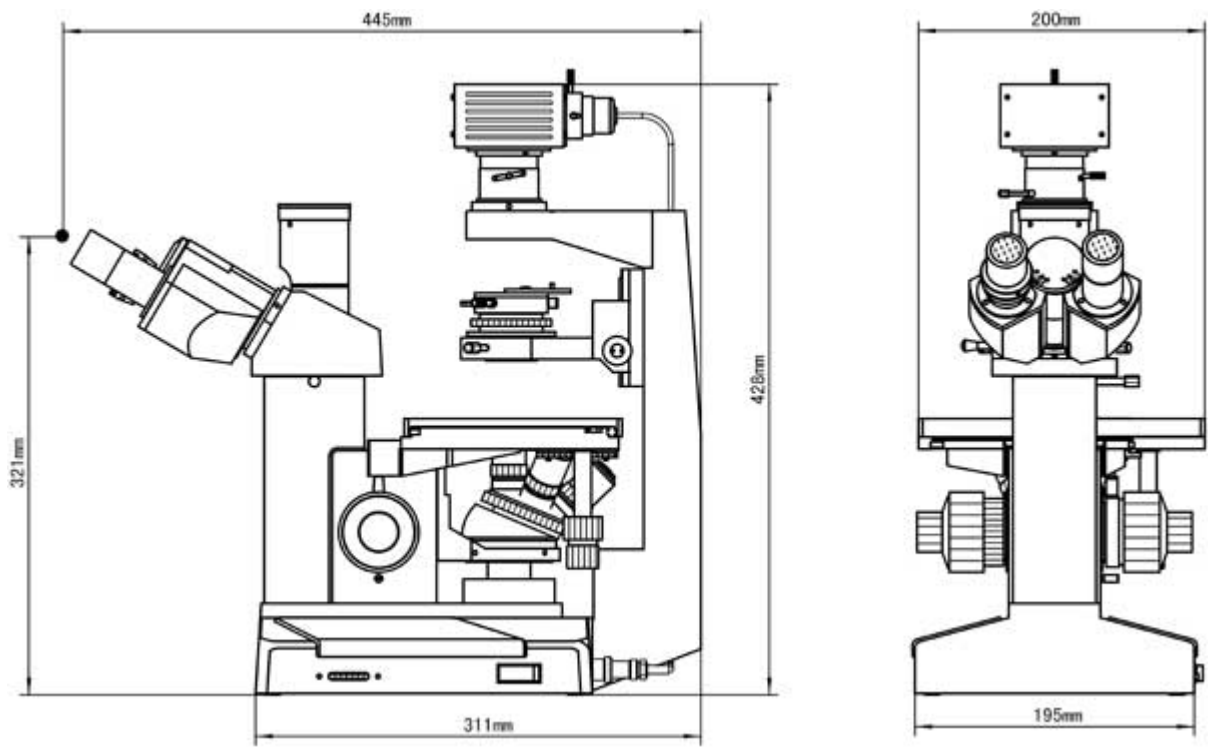
4) 物流：所有进出层流净化细胞培养室的物品均应通过传递窗进行；物品进入层流净化细胞培养室时，应先打开传递窗外侧门，将物品放入传递窗，关闭传递窗外侧门，打开紫外灯照射15分钟；人员进入层流净化细胞培养室后，关闭紫外灯，打开传递窗内侧门，取出物品；物品出室次序与以上进室次序相反，但不需紫外线照射。



移液器

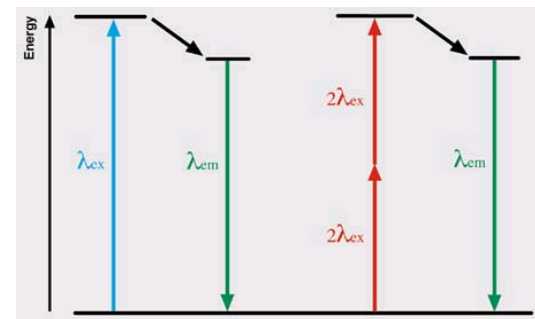
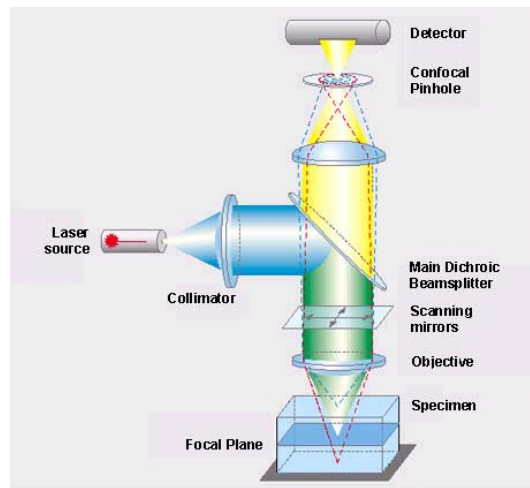
- 1、移液器的选择：P2，P20，P200，P1000
- 2、枪头的选择：白、黄、蓝
- 3、枪头的处理：无菌、无RNA酶
- 4、加样量的确定：
- 5、加样方式：
- 6、校正方法：
- 7、保存方法：

倒置显微镜



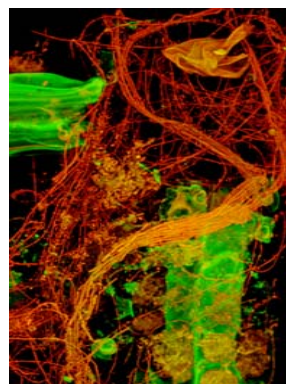
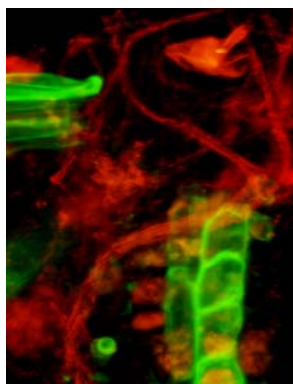
- 1、所有镜头表面必须保持清洁，落在镜头表面的灰尘，可用吸耳球吹去，也可用软毛刷轻轻的掸去掉。
- 2、当镜头表面沾有油污或指纹时，可用脱脂棉蘸少许无水乙醇和乙醚的混合液（3:7）轻轻擦拭。
- 3、不能用有机溶液清擦其它部件表面，特别是塑料零件，可用软布蘸少量中性洗涤剂清擦。
- 4、在任何情况下操作人员不能用棉团、干布块或干镜头纸擦拭镜头表面，否则会刮伤镜头表面，严重损坏镜头，也不要用水擦拭镜头，这样会在镜头表面残留一些水迹，因而可能滋生霉菌，严重损坏显微镜。

细胞检测条件



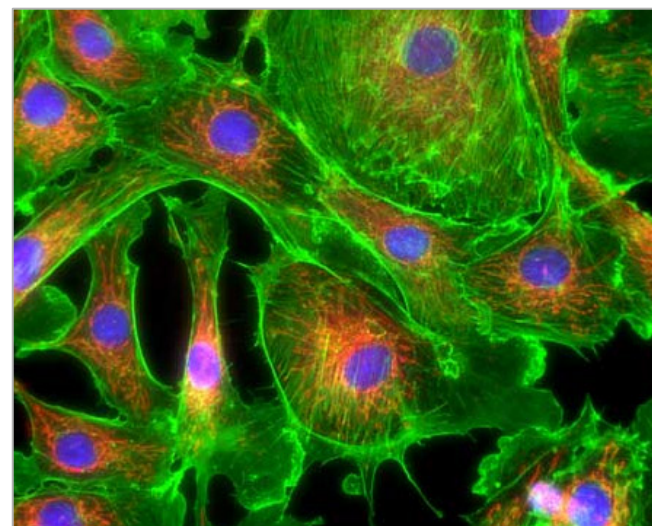
双光子原理图

结构图



普通荧光显微镜

Confocal



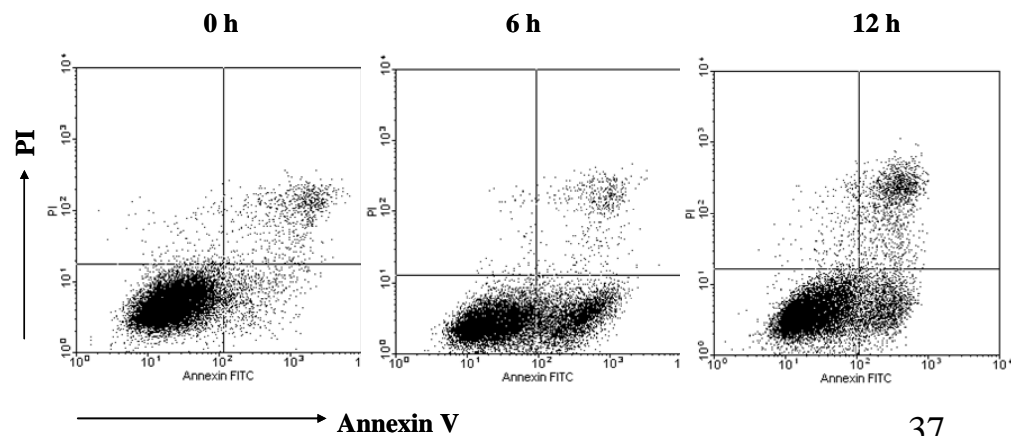
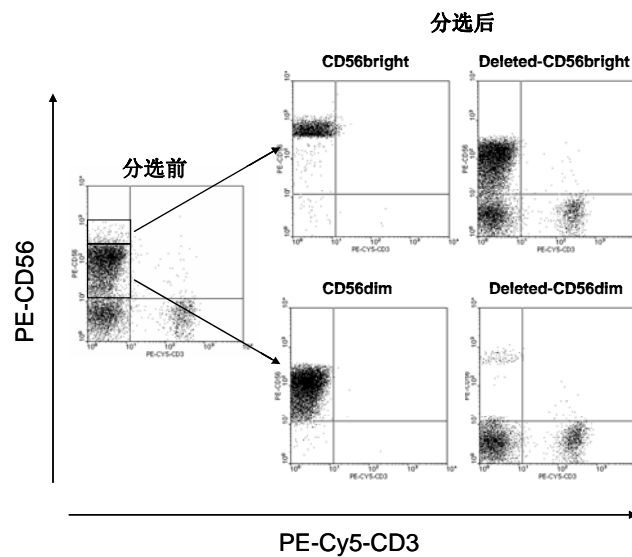
多重荧光标记的共聚焦图像

激光共聚焦显微镜

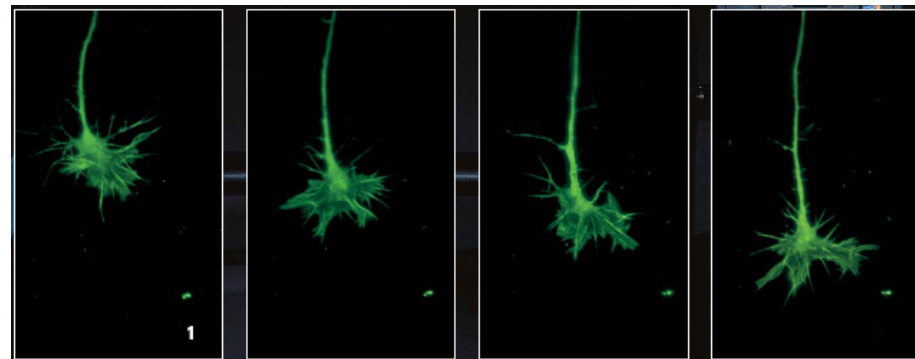
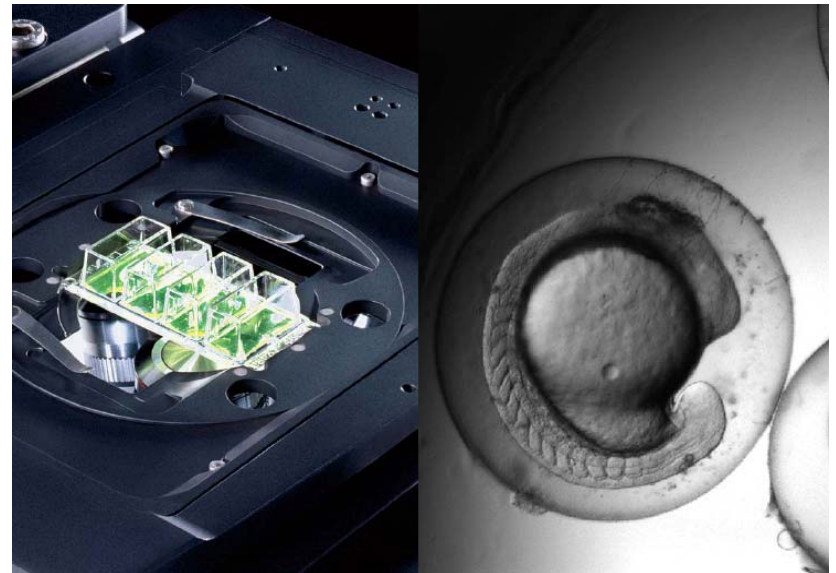
细胞检测条件



流式细胞仪



细胞检测条件



活细胞工作站

酶标仪



微孔板震荡器



高速离心机



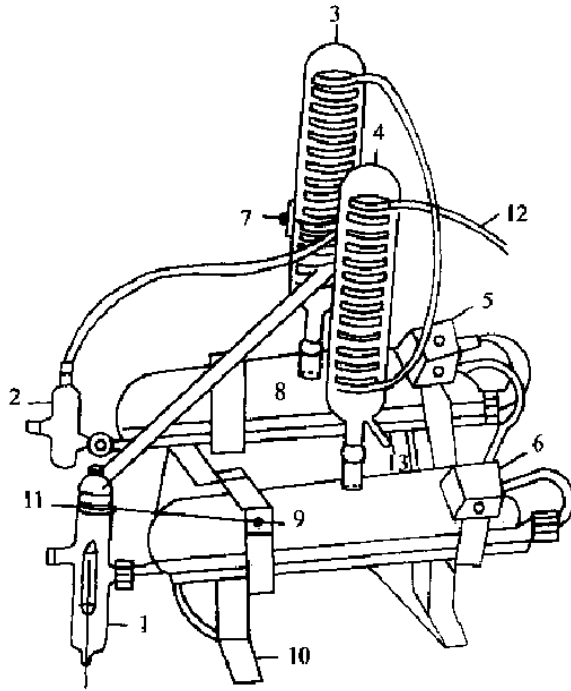
超速离心机



高速和低速机转子则简单地用年限来规定转子寿命，铝合金转子一般为7年。这显然不很科学，部分制造商同时采用运转次数或运转时间记录。如果某个转子几乎天天使用20h，那肯定不能用7年。而离心机买了多年没用，但已到厂家规定的7年，对这样的转子我国学者大部分认为还是可用，只是适当降速即可。

对超速离心机转子，一般规定铝转子运转1000~1500次或1000~1500h，此后要降速10%使用同样的次数和时间；钛转子保证使用5000次或10000h。若有些转子长期不用，其内部金属会发生变化，也应降速。厂家保证期限为5年。因此，要求使用者必须坚持记录每个转子的运转次数和累计运转时间。由于科技的，最近的超速离心机转子有内镶嵌的智能记忆系统，自动完成累计记录，用户不用自己做记录。

自动双重纯水蒸馏器



纯水仪



纯水等级

纯水的纯化水平最低，通常电导率在1-50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之间。它可经由单一弱碱性阴离子交换树脂、反渗透或单次蒸馏制成。典型的纯水应用包括玻璃器皿的清洗和清洗机用水。

去离子水的电导率通常在1.0 - 0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之间（电阻率在1.0 - 10.0 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ）。它通过采用含强阴离子交换树脂的混床离子交换制成，有相对较高的有机物和细菌污染水平，能满足多种需求，如清洗、配置分析标准样、制备试剂和稀释样品。

实验室纯水不仅要求在离子指标上有较高纯度，而且要求低浓度有机物和微生物。典型的指标是电导率 $<1.0 \mu\text{S}/\text{cm}$ （电阻率 $>1.0 \text{M}\Omega\text{-cm}$ ），总有机碳(TOC)含量小于50 ppb 以及细菌含量低于1CFU/ml。其水质可适用于多种需求，从试剂制备和溶液稀释，到为细胞培养配备营养液和微生物研究。**实验室纯水可双蒸**而成，或整合RO和离子交换/ EDI多种技术制成，也可以再结合吸附介质和UV灯。

超纯水在电阻率、有机物含量、颗粒和细菌含量方面接近理论上的纯度极限，通过离子交换、RO膜或蒸馏手段预纯化，再经过核子级离子交换精纯化得到超纯水。通常超纯水的电阻率可达18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ，TOC <10 ppb，滤除0.1 μm 甚至更小的颗粒，细菌含量低于1 CFU/ml。超纯水适合多种精密分析实验的需求，如高效液相色谱(HPLC)、离子色谱(IC)和离子捕获-质谱(ICP-MS)。超纯水适用于象真核细胞培养等生物应用，超滤技术通常用于去除大分子生物活性物，如热源(通常结果为 <0.005 IU/ml)以及（无法检测到的）核酸酶和蛋白酶

实验室用水的三个等级:

指标名称		一级水	二级水	三级水
pH值范围 (25℃)				5.0-7.5
电导率 (25℃) / (mS/m)	≤	0.01	0.10	0.50
可氧化物质 (以O记) / (mg/L)	≤		0.08	0.4
吸光度 (254nm·Lcm)	≤	0.001	0.01	
蒸发残渣 (105℃±2℃) / (mg/L)	≤		1.0	2.0
可溶性硅 (以SiO ₂ 计) / (mg/L)	≤	0.01	0.02	

一级水：基本上不含有溶解或胶态离子杂质及有机物。二级水经过石英设备蒸馏或离子交换混合床处理后，再经 0.2 μm 微孔滤膜过滤来制取。一级水用于有严格要求的分析试验，包括对颗粒有要求的试验，如高压液相色谱用水。

二级水：可含有微量的无机、有机或胶态杂质。可用多次蒸馏或离子交换等方法制取。二级水用于无机痕量分析等试验，如原子吸收光谱分析用水。

三级水：适用一般实验室实验工作。可以用蒸馏、离子交换等方法制取。

培养板



常用不同培养板的孔底面积及推荐加液量

培养器皿	底面积 (cm ²)	加液量 (mL)	可获细胞量
96孔培养板	0.32	0.1	10 ⁵
24孔培养板	2	1.0	5 × 10 ⁵
12孔培养板	4.5	2.0	10 ⁶
6孔培养板	9.6	2.5	2.5 × 10 ⁶
4孔培养板	28	5.0	7 × 10 ⁶
3.5cm培养皿	8	3.0	2.0 × 10 ⁶
6cm培养皿	21	5.0	5.2 × 10 ⁶
9cm培养皿	49	10.0	12.2 × 10 ⁶
10cm培养皿	55	10.0	13.7 × 10 ⁶
25cm塑料培养瓶	25	5.0	5 × 10 ⁶
75cm塑料培养瓶	75	15~30	2 × 10 ⁷
25cm玻璃培养瓶	19	4.0	3 × 10 ⁶
100cm玻璃培养瓶	37.5	10.0	6 × 10 ⁶
250cm玻璃培养瓶	78	15.0	2 × 10 ⁷
2500cm旋转培养瓶	700	100~250	2.5 × 10 ⁸

注：各种单层生长的细胞在培养皿中长满的细胞数，主要取决于器皿底表面积和细胞体积的大小。上表以Hela细胞为例给出的可获细胞量仅作参考。

细胞培养瓶



常用玻璃器皿清洗

浸泡（自来水）

刷洗（洗衣粉）

泡酸（24小时）

流水冲洗

蒸馏水浸泡和冲洗

60-80℃烘干

小常识：

1、新购置的玻璃器皿可先用热肥皂水洗刷，然后再用1%~2%的盐酸浸泡2~6小时，再用自来水冲洗。最后用蒸馏水漱洗至少3次。

2、新的橡胶制品洗涤方法：0.5mol/L NaOH煮沸15min，流水冲洗，0.5mol/L HCl煮沸15min，流水冲洗，自来水煮沸2次，蒸馏水煮沸20min，50℃烤干备用。

清洁液的配制

组成 强度	重铬酸钾(克)	浓硫酸(毫升)	蒸馏水(毫升)
弱液	100	100	1000
次强液	120	200	1000
强液	63	1000	200

CO₂培养箱

- CO₂培养箱设定的条件为37 °C ， 5 %CO₂ 。
- 使用CO₂培养箱培养细胞时应注意的问题：
 - ①用螺旋口瓶培养细胞时，需将瓶盖微松，以保证通气。
 - ②保持培养箱内空气干净。定期消毒（90 °C，14 h）。
 - ③箱内灭菌蒸馏水3000毫升蒸馏水槽中以保持箱内湿度，避免培养液蒸发。



培养细胞的生长条件

- 1、细胞的营养需要
- 2、细胞的生存环境
- 温度: 37°C, O₂
- CO₂: 5%, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$
- pH: 7.2-7.4
- 渗透压
- 3、无污染
- 4、无毒

细胞培养用液的配制

水：新鲜配置的三蒸水或去离子水

平衡盐溶液：无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的缓冲液

PBS: NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	1.56 g
KH_2PO_4	0.20
加水至1000 ml	

培养基

- 培养基（培养液）是维持体外细胞生存和生长的溶液，分天然培养基和合成培养基。

天然培养基

天然培养基有血清、血浆、和组织提取液（如鸡胚和牛胚浸液）。

优点：营养成分丰富，培养效果好

缺点：来源受限。

成分复杂，影响对某些实验产物的提取和实验结果的分析。

易发生支原体污染。

合成培养基

合成培养基是根据细胞生存所需物质的种类和数量，用人工方法模拟合成的。目前已设计出许多种培养基，如TC199、MEM、RPMI-1640、DMEM等。

合成培养基主要成分是氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐和其它一些辅助物质。

优点：标准化生产，组分和含量相对固定。成本低。

缺点：缺少某些成分，不能完全满足体外细胞生长需要。

合成培养基的选择

DMEM: 原为小鼠成纤维细胞设计，现场用于贴壁细胞培养；高氨基酸（2倍MEM），高维生素（4倍），高葡萄糖（4500mg/L）；

aMEM: 附加氨基酸、维生素、核苷、脂肪酸，用途广泛，尤其是营养要求苛刻细胞；

Ham's F12: 低血清浓度克隆CHO细胞，现可用于克隆培养及原代培养；

RPMI 1640: 专为淋巴细胞设计，现广泛用于悬浮细胞培养。

可参考Invitrogen 网站上Cell Line Database 工具

血清的选择



胎牛血清

三次0.1 微米无菌过滤

货号: SV30087.02

批号: 20000404

瓶号: 101

净含量: 500 ml

有效期: 2011-04-30

储存条件: 低于-10 ℃

适用于单一细胞培养, 不适用于组织培养

产品编号: 0123 041002

生产商: 美国生物化学试剂公司 (HyClone)

地址: 美国犹他州 UTAH 州 84043 号

中国总代理: 上海生工生物技术有限公司

HyClone

高品质——源自南美

低价格——回馈客户

© 2009 Thermo Fisher Scientific. All rights reserved.

血清的成分

人工合成培养基只能维持细胞生存，要想使细胞生长和繁殖，还需补充一定量的天然培养基（如血清）。

血清中含有：

- ①多种蛋白质（白蛋白、球蛋白、铁蛋白等）；
- ②多种金属离子；
- ③激素；
- ④促贴附物质如纤粘蛋白、冷析球蛋白、胶原等；
- ⑤各种生长因子；
- ⑥转移蛋白；
- ⑦不明成分。

新西兰小牛血清

描述	货号	包装	储存温度	价格(¥)
新西兰新生牛血清				
新西兰新生牛血清	SH30401.01	500 ml	-10°C	540
	SH30401.02	1000 ml	-10°C	975
	SH30401.03	3000 ml	-10°C	2,700
新西兰新生牛血清，热灭活	SH30401.01HI	500 ml	-10°C	645
	SH30401.02HI	1000 ml	-10°C	1,080
新西兰新生牛血清，照射	SH30401.01IR	500 ml	-10°C	840
	SH30401.02IR	1000 ml	-10°C	1,275
新西兰补铁新生牛血清				
新西兰补铁新生牛血清	SH30626.01	100 ml	-10°C	238
	SH30626.02	500 ml	-10°C	629
	SH30626.03	1000 ml	-10°C	1,122
新西兰补铁新生牛血清，热灭活	SH30626.01HI	100 ml	-10°C	询价
	SH30626.02HI	500 ml	-10°C	748
	SH30626.03HI	1000 ml	-10°C	1,241
新西兰补铁新生牛血清，照射	SH30626.02IR	500 ml	-10°C	969
	SH30626.03IR	1000 ml	-10°C	1,462
新西兰促生长小牛血清				
新西兰促生长小牛血清	SH30591.01	100 ml	-10°C	290
	SH30591.02	500 ml	-10°C	930
	SH30591.03	1000 ml	-10°C	1,630
新西兰促生长小牛血清，热灭活	SH30591.01HI	100 ml	-10°C	360
	SH30591.02HI	500 ml	-10°C	1,000
	SH30591.03HI	1000 ml	-10°C	1,700
新西兰促生长小牛血清，照射	SH30591.02IR	500 ml	-10°C	1,130
	SH30591.03IR	1000 ml	-10°C	1,830
新西兰加强型小牛血清				
新西兰加强型小牛血清	SH30413.01	100 ml	-10°C	询价
	SH30413.02	500 ml	-10°C	715
	SH30413.03	1000 ml	-10°C	1,092
	SH30413.04	3000 ml	-10°C	询价
新西兰加强型小牛血清，热灭活	SH30413.02HI	500 ml	-10°C	806
	SH30413.03HI	1000 ml	-10°C	1,183
	SH30413.04HI	3000 ml	-10°C	询价
新西兰加强型小牛血清，照射	SH30413.02IR	500 ml	-10°C	975
	SH30413.03IR	1000 ml	-10°C	1,352
新西兰小牛血清				
新西兰小牛血清	SH30403.02	500 ml	-10°C	440
新西兰补铁小牛血清				
新西兰补铁小牛血清	SH30414.02	500 ml	-10°C	550
	SH30414.03	1000 ml	-10°C	990

FBS, FCS, CS, HS?

FBS (fetal bovine serum) 和FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，两者都是指胎牛血清，**FCS 乃错误的用词**，请不要再使用。

CS (calf serum) 则是指小牛血清。

HS (horseserum) 则是指马血清。

一般说来，含5%小牛血清的培养基对大多数细胞可以维持细胞不死，但支持细胞生长一般需加10%血清

血清质量的鉴定

1. **理化性质**：如渗透压、pH值、蛋白电泳图谱、蛋白含量、激素水平、内毒素等。蛋白含量包括血清**总蛋白含量**（不低于35-45g/L）、**球蛋白含量**（应小于20g/L）、血红蛋白含量等。其中球蛋白含量是一项非常重要的指标，血清中球蛋白主要是抗体，球蛋白含量越低血清质量越高。血红蛋白也是越低越好。

2. **微生物检测**：包括细菌、真菌、支原体、病毒等。特别是对支原体、病毒的检测，支原体是一种很小的微生物，可通过孔径22u的滤膜。支原体、病毒污染在光学显微镜下难于察觉，细胞也能生长繁殖，但会影响实验结果。检测支原体的方法很多，如培养法、PCR法、荧光染色法、电镜观察法等。

检测	标准
内毒素（鲎试剂法）	≤10 EU/ml
血红蛋白（分光光度法）	≤10 mg/dl
无菌检测（现行美国药典和欧洲药典）细菌和真菌	无生长
病毒检测(9 CFR 113.53)	未检出
荧光抗体	
蓝舌病	未检出
牛腺病毒	未检出
牛细小病毒	未检出
牛呼吸道合胞病毒	未检出
牛病毒性腹泻病毒	未检出
狂犬病	未检出
呼肠孤病毒	未检出
细胞病变制剂，例如	
牛传染性鼻气管炎（IBR）	未检出
Hemadsorbing制剂—	
例如PI3	未检出
分支杆菌	
大体积，直接培养	未检出
Hoechst DNA染色	未检出
适用性证书	有

其他的检测分析(如有变动不另行通知)：胰岛素、γ球蛋白、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶(SGPT)、谷草转氨酶(SGOT)、pH、总蛋白、白蛋白、血尿素氮、肌酐、总胆红素、钠、钾、钙、氯、磷、渗透压、铁、总铁结合力(TIBC)、饱和葡萄糖和IgG。

3. 促生长效果:

(1) **克隆形成率测定:**以悬浮生长的细胞为培养对象,按有限稀释法做克隆化培养,将不同批号的血清配制成不同浓度的培养基,细胞也稀释成不同浓度,接种到96孔板,每孔200ul,培养一定时间,统计有克隆生长的孔,计算出百分比,再与对照的标准血清相比较,就可看出不同批号血清间的区别。

(2) **贴瓶率测定:**是以贴壁细胞为培养对象,将细胞稀释至低密度,接种至平皿,每皿200或100个细胞,以不同浓度的血清培养基培养,培养一定时间后弃培养基,染色后统计集落数,计算出集落数占接种细胞数的百分比,同样再与标准血清比较,判断血清质量高低。

(3) **连续传代培养法:**是将细胞培养于3个一定体积的培养瓶中,待测血清配制为5%浓度,一般于第七天收集细胞,计数,取平均值,中间可以更换一次培养基。连续测试三个周期以上,观察细胞生长状况,并将每次的计数结果与标准血清的测试结果比较。

- 血清的灭活（消除补体活性）：56 °C ， 30 分钟。
若非必要，无需此步骤。胎牛血清不必灭活。
- 血清的消毒：过滤除菌。
- 解冻血清：-20°C至4°C至室温，切忌-20°C至37°C。

抗菌素的使用

- 在培养液配制后，培养液内常加适量抗菌素，以抑制可能存在的细菌的生长。
- 通常是青霉素和链霉素联合使用。培养基内青霉素、链霉素最终使用浓度为每毫升100单位。
- 市售青霉素为80万U/瓶，可溶于4ml体积，每一升培养液中加0.5ml即可。市售链霉素为100万U/瓶，可溶于5ml体积，每一升培养液中也加0.5ml即可。无链霉素的情况下，用庆大霉素代替，终浓度调为50~200U/ml。
- 庆大霉素：每毫升100单位——方便、广谱、稳定。

完全培养基的组成

- 基础培养基 80%—95%
- 血清 5%—20%
- 碳酸氢钠 2.0 g/L
- 青、链霉素 各100单位/毫升

培养基的配制

RPMI-1640培养粉	1袋
碳酸氢钠	2.0 g
青、链霉素	各100单位/毫升
加三蒸水	至1000ml
过滤除菌，调节pH值	至7.2
加血清	终浓度 10%

HEPES

HEPES的化学全称位羟乙基哌嗪乙硫磺酸 (N'-a-hydroxythylpiperazine-N'- ethanesulfanic acid) 。对细胞无毒性作用。它是一种氢离子缓冲剂，能较长时间控制恒定的pH范围。使用终浓度为10~50mmol/L，一般培养液内含20mmol/LHEPES即可达到缓冲能力。

小常识：市售HEPES为约10g包装的小瓶，可称取4.766克HEPES溶于20ml三蒸水中，过滤除菌后可完全（20ml）加入1L培养液中，或者每100ml培养液中加入2ml即可。

谷氨酰胺

合成培养基中都含有较大量的谷氨酰胺，其作用非常重要，**细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质**，谷氨酰胺缺乏会导致细胞生长不良甚至死亡。在配制各种培养液中都应该补加一定量的谷氨酰胺。由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定，**4℃下放置1周可分解50%**，故应单独配制，置于-20℃冰箱中保存，用前加入培养液。加有谷氨酰胺的培养液在4℃冰箱中储存2周以上时，应重新加入原来的谷氨酰胺。

小常识：一般培养液中谷氨酰胺的含量为1~4mmol/L。可以配制200mmol/L谷氨酰胺液贮存，用时加入培养液。配制方法为，谷氨酰胺2.922g溶于三蒸水加至100ml即配成200mmol/L的溶液，充分搅拌溶解后，过滤除菌，分装小瓶，-20℃保存，使用时可向100ml培养液中加入1ml谷氨酰胺溶液。

过滤除菌

宜采用0.45um和0.22um滤膜各一张，上层为0.45um，下层为0.22um，以保证过滤效果。注意滤膜正面（光面）朝上。过滤后分装于小瓶中（100或200ml）。

培养基的鉴定与保存

培养液配好后，应先抽取少许放入培养瓶内，于37℃温箱内置24~48hr，以检测培养液是否有污染。

每次配液量以两周左右为宜，一次配液不要太多，防止营养成分（主要为谷氨酰胺）损失。2-8℃保存。

无血清培养基

- 无血清培养基的主要研制策略：在基础培养基中补充各种必需因子，如激素、生长因子、结合蛋白、贴壁和扩展因子等。
- 无血清培养基由基础培养基和替代血清的补充成分组成。
- 1975年，Sato首次成功地用无血清培养基培养了垂体细胞株，近20多年来已报道了几十种细胞系在无血清培养基中成功地生长和增殖。
- 无血清细胞培养基的使用保证了实验结果的准确性、可重复性和稳定性，减少了细胞污染，简化了提纯和鉴定各种细胞产物的程序。

无血清培养细胞的基本要求

1. 处于对数生长中期；
2. >90% 活细胞率；
3. 适应时以较高的起始细胞接种。

无血清培养基的方法

1.直接适应—细胞从添加血清的培养基转换到无血清培养基（SFM）中。

接种细胞密度应该： $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ 细胞/ml。

当细胞密度达到 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 细胞/ml时，传代培养细胞。

当细胞密度在培养4到7天后达到 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 细胞/ml时，细胞完全适应了无血清培养基。

每隔3~5天，当细胞密度达到 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 细胞/ml，细胞活率在90%时，贮备的适应了无血清培养基的细胞培养物应该再次传代培养。

2.连续适应——分几步把细胞从添加血清的培养基转换到无血清培养基(SFM)中,与直接适应相比较,连续适应趋向对于细胞更加温和一些。

(1) 以2倍正常接种密度接种生长活跃的细胞培养物到**75%有血清培养基: 25%SFM**混合培养基中,传代培养。

(2) 当细胞密度 $>5 \times 10^5$ 细胞/ml时,以 **2×10^5 到 3×10^5 细胞/ml**细胞密度,在有血清培养基:SFM为**50 : 50**的混合培养基中传代培养。

(3) 以 **2×10^6 到 3×10^6 细胞/ml**细胞密度,**25%有血清培养基和75% SFM**中传代培养。

(4) 当细胞密度达到 **1×10^6 到 3×10^6 细胞/ml**(接种后4到6天),在**100%SFM**培养基中传代培养。

(5) 每隔3到5天,当细胞密度达到 **1×10^6 到 3×10^6 细胞/ml**,细胞活率在90%时,贮备的适应了无血清培养基的细胞培养物应该再次传代培养。

消化液

- 胰蛋白酶作用于与赖氨酸或精氨酸相连接的肽键，除去细胞间粘蛋白及糖蛋白，影响细胞骨架，从而使细胞分离。
-
- 胰蛋白酶液浓度越高，作用越强，但超过一定限度会损伤细胞。
- 胰蛋白酶是一种黄白色粉末，用无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS缓冲液配制常用的胰蛋白酶液浓度是0.25%。用滤器过滤除菌。
- 4℃保存一周，室温30分钟后不稳定。
- 胰蛋白酶液消化时间：2-10分钟。
- 用含血清培养液终止其对细胞的消化作用。

EDTA (0.02%乙二胺四乙酸) 消化液配方

EDTA 0.20g, NaCl 8.00g, KCl 0.20g, KH₂PO₄ 0.02g, 葡萄糖2.00g, 0.5%酚红4ml, 加入蒸馏水定容至1000ml。10磅20min高压灭菌, 使用时调节PH值到7.4。注意EDTA不能被血清中和, 使用后培养瓶要彻底清洗, 否则再培养时细胞容易脱壁。



The End