
Q19: 黴漿菌污染會對細胞培養有何影響?

A: 幾乎影響細胞所有之生長參數、代謝及研究之任一數據。故進行實驗前，必須確認細胞為 mycoplasma-free，實驗結果之數據方有意義。

Q20: 偵測出細胞株有黴漿菌污染時，該如何處理?

A: 直接滅菌後丟棄，以避免污染其他細胞株。

Q21: CO2 培養箱之水盤如何保持清潔?

A: 定期以無菌水更換之。

Q22: 為何培養基長期保存於 4° C 冰箱中，顏色會偏暗紅色，且 pH 值會越來越偏鹼性?

A: 主要原因是培養基之 glutamine 分解後產生 ammonia (氨)，造成培養基越來越偏鹼性，另外溶於培養基之碳酸亦會隨著時間而溢散，造成培養基偏鹼性。而培養基中之酸鹼指示劑 (通常為 phenol red) 的顏色也會隨鹼性增加而更偏暗紅。培養基偏鹼之結果，將造成細胞生長停滯或死亡。

Q23: 各種細胞培養用的 dish, flask 是否均相同?

A: 不同廠牌的 dish 或 flask，其所 coating 的 polymer 不同，製造程序亦不同，雖對大部分細胞沒有太大之影響，惟少數細胞則可能因使用廠牌不同之 dish 或 flask 而有顯著之生長差異。

Q24: 購買之細胞冷凍管經解凍後，為何會發生細胞數目太少之情形?

A: 大部分原因是解凍後之離心過程操作上的失誤，造成細胞的物理性損傷以及細胞流失。建議一般細胞解凍後不要立刻離心，待細胞生長隔日後再更換培養基即可。

Q25: 購買之細胞死亡或細胞存活率不佳?

A: 研究人員在細胞培養時出現存活率不佳，常見的原因可歸納為：

1. 培養基使用錯誤或培養基品質不佳。
2. 血清使用錯誤或血清的品質不佳。
3. 解凍過程錯誤。
4. 冷凍細胞解凍後，離心過程失誤。
5. 懸浮細胞誤認為死細胞。
6. 培養溫度使用錯誤。

常見問答集

Q1: 冷凍管應如何解凍?

A: 取出冷凍管後，須立即放入 37° C 水槽中快速解凍，並確定瓶蓋已鎖緊。輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化，注意水面不可超過冷凍管蓋沿以避免污染。

Q2: 細胞冷凍管解凍培養時，是否應馬上去除 DMSO?

A: 建議不需要立刻去除 DMSO。除少數特別註明對 DMSO 敏感之細胞外，絕大部分細胞株（包括懸浮性細胞），在解凍之後，直接放入含有 10~15ml 新鮮培養基之培養瓶中，待隔天再置換新鮮培養基以去除 DMSO 即可。

Q3: 可否使用與原先培養條件不同之培養基?

A: 建議不要。每一細胞株均有其特定使用且已適應之細胞培養基，若驟然使用和原先提供之培養條件不同之培養基，細胞可能因無法立即適應而造成無法存活。

Q4: 可否使用與原先培養條件不同之血清種類?

A: 建議不要。血清是細胞培養上一個極為重要的營養來源，所以血清的種類和品質對於細胞的生長會產生極大的影響。來自不同物種的血清，在一些物質或分子的量或內容物上都有所不同，供應不同細胞生長上的需要，血清使用錯誤常會造成細胞無法存活。

Q5: 何謂 FBS、FCS、calf serum 和 horse serum?

A: FBS (fetal bovine serum) 和 FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，兩者都是指胎牛血清。Calf serum 則是指小牛血清。Horse serum 為馬血清。

Q6: 何時須更換培養基?

A: 視細胞生長密度而定，或遵照細胞株基本資料上之更換時間，按時更換培養基即可。

Q7: 培養基中是否須添加抗生素?

A: 除於特殊篩選系統中外，一般正常培養狀態下，建議培養基中不應添加任何抗生素。

Q8: 附著性細胞繼代時所使用之 trypsin-EDTA 濃度? 購買後應如何處理?

A: 一般使用之 trypsin-EDTA 濃度為 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA.4Na。若為大體積包裝，建議將其以少量分裝於無菌試管中，保存於 -20° C，以避免反覆冷凍解凍造成 trypsin 之活性降低，並可減少污染之機會。

Q9: 懸浮性細胞應如何繼代處理?

A: 離心後更換新鮮培養基或直接加入新鮮培養基將細胞濃度稀釋即可。

Q10: 欲將一般動物細胞離心下來，其離心速率應為多少轉速?

A: 欲回收動物細胞，其離心速率一般為 300 x g (約 1,000 rpm)，5-10 分鐘，過高的轉速，將造成細胞死

上海肯强仪器有限公司

电话: 021-65162788 技术支持: 021-65166050

传真: 021-55387826

Mail: lx17_98180@163.com

亡。

Q11: 細胞之接種密度為何?

A: 依照細胞株基本資料上之接種密度或稀釋分盤之比例接種即可。細胞數太少或稀釋的太多亦是造成細胞無法生長之一重要原因。

Q12: 細胞冷凍培養基之成份為何?

A: 動物細胞冷凍保存時最常使用的冷凍培養基是含 5-10 % DMSO (dimethyl sulfoxide) 和 90-95% 原來細胞生長用之新鮮培養基均勻混合之。 冷凍培養基需在使用前才配製, 且勿直接將 DMSO 加入細胞懸浮液中。

Q13: DMSO 之等級和無菌過濾之方式為何?

A: 建議使用之 DMSO 等級為 tissue culture grade 且為無菌。若為大體積包裝, 建議將其以少量分裝於無菌試管中, 保存於 4° C, 避免反覆冷凍解凍造成 DMSO 之變質, 並可減少污染之機會。若要過濾 DMSO, 則需使用適合 DMSO 之濾膜。

Q14: 冷凍保存細胞之方法?

A: 冷凍保存方法一: 冷凍管置於 4° C 10~30 分鐘 → 移至-20° C, 30 分鐘* → 移至-80° C, 16~18 小時 (或隔夜) → 移至液氮槽 vapor phase 長期儲存。

* 註: -20° C 不可超過 1 小時, 以防止冰晶過大而造成細胞大量死亡, 亦可跳過此步驟, 冷凍管置於厚保麗龍內, 直接放入 -80° C 冰箱中, 但存活率會降低一些。

冷凍保存方法二: 冷凍管置於已設定程式之程式降溫機中, 以每分鐘降 1~3° C 速率降至 -80° C 以下, 然後放入液氮槽之 vapor phase 長期儲存。

Q15: 細胞欲冷凍保存時, 細胞冷凍管內應有多少細胞濃度?

A: 冷凍管內細胞數目一般至少為 1×10^6 cells/ml 以上。

Q16: 應如何避免微生物污染?

A: 微生物污染的種類可分成細菌、酵母菌、黴菌、病毒和黴漿菌。發生之原因主要與無菌操作技術不當、操作室環境不佳、污染之血清和污染之細胞有關。 嚴格之無菌操作技術、清潔的環境、正確之培養基配製、與品質良好之細胞株來源是減低污染之最好方法。

Q17: 如果細胞發生微生物污染時, 應如何處理?

A: 直接滅菌後丟棄之。

Q18: 黴漿菌 (mycoplasma) 污染的細胞, 是否能以肉眼觀察出異狀?

A: 大多數遭受黴漿菌污染的細胞株, 無法以其外觀分辨之, 亦無法在光學顯微鏡下察覺異狀, 大都必須進行黴漿菌之檢測。

上海肯强仪器有限公司

电话: 021-65162788 技术支持: 021-65166050

传真: 021-55387826

Mail: lx17_98180@163.com