



如何养好细胞？细胞培养技巧分享

1, 合适的环境

不同的细胞，喜欢的环境是不一样的。这个不仅仅是说培养基的不同，还有就是细胞生长的空间密度问题。

有一些细胞是数量多一点比较好生长，生长状态也比较好。这种一般是属于生长速度慢的细胞。譬如内皮细胞。而有一些是细胞是数量少一点细胞状态会生长的比较好，譬如巨噬细胞和某些肿瘤细胞。尤其是巨噬细胞，生长速度非常得快，贴壁速度很快，所以传代时就应该留很少量的细胞，这样细胞状态会比较好。并且巨噬细胞比较喜欢扎堆生长，而堆与堆之间是有空间的。如果长成相连在一起的一满片的时候，细胞形态基本上就会差了，老化的会比较多，对后期实验结果是不好的。所以在养细胞的时候应该摸索该细胞喜欢的生长空间密度问题。

2, 传代培养

对于有些人总是会遇到养的细胞形态怎么都不好的问题。这个其实是有一个方法可以改善的。对于贴壁细胞，如果细胞形态不好，（或者细胞形态不清晰，表面似有异物等）可以在传代的时候进行如下操作：

首先，倒掉旧的培养基，加入 3ml 新的培养基（有无血清的都可）洗涤一次，用滴管吸走，然后再加入 3ml 的培养基，进行预吹打，控制吹打力度，轻轻地大概沿着瓶底过一遍，然后吸走。这时候再开始正式的消化、吹打。（巨噬细胞我们只吹打，不消化的）

其次，把吹打下来的细胞悬液加入到新的培养瓶内，培养瓶事先加入培养基，放入培养箱内培养，按时间点观察细胞贴壁情况。10 分钟观察一次，20 分钟，30 分钟观察一次。选择一个时间点，已经有部分细胞贴壁的情况下，重新置于洁净台，底面朝上迅速倒出其中的培养基，加入 3ml 新培养基再轻轻洗一次。然后加入完全培养基培养。后续观察细胞生长情况以及形态。我称之为“二传”。呵呵。

如果一次效果还不理想，可重复多次。直到找到细胞完美形态。其中要注意，结合细胞喜欢的生长情况。喜欢多一点数量长得好的细胞你就等贴壁细胞比较多点的时候再传。反之亦然。这个是我师兄发明的，谢谢他了。这个方法真的很好用！

3, 培养基的量

关于培养瓶内加入培养基的量的问题。这个是要靠自己摸索你所养的细胞的。并不是小的玻璃方瓶 12ml, 大方瓶 14ml 的。有些细胞反而是培养基少一点相反细胞形态会长得比较好。(可能也是竞争很大, 有优胜劣汰吧。呵呵。) 对于生长速度快的细胞, 易生长的细胞加少一点培养基细胞形态会更好。但是要注意换液掌握。

4, 培养瓶选择

关于选择培养瓶的问题。个人发现生长速度快的细胞在玻璃瓶内生长的状态会比一次性塑料瓶相对好一些。而对于同一种细胞, 在其生长旺盛快速的时期在玻璃瓶内的生长状态也比塑料瓶内好。这可能是因为塑料瓶比玻璃瓶更容易贴壁。生长速度快的细胞在塑料瓶这种相对“更安逸”的环境里反而长得状态不如玻璃瓶好。

所以对于生长速度慢的细胞如果想要更漂亮的细胞状态, 塑料瓶比玻璃瓶会好, 对于生长速度慢的细胞, 玻璃瓶则会更好。同样, 对于同一种细胞, 在其生长速度慢的时候, 塑料瓶会好一点, 比如刚刚复苏的时候, 或者原代培养的时候。而在其生长旺盛的时候, 玻璃瓶则相对会好一点。

5, 传代消化

传代时消化的问题。可以这样说, 对于需要消化传代的细胞, 每一次的消化都是对这个细胞存活与否, 状态好与不好最至关重要的考验。

很多同学都遇到过这个问题, 自己养的细胞开始的几代长的还挺好的, 可是穿过几代之后就发现自己的细胞不行了, 状态越来越差劲了。对于这个问题, 可以非常肯定地说, 你的消化环节出问题了。你每一次的消化都让细胞受到较大损伤了。所以, 越长越差。

在消化的过程中, 你加入胰酶后, 所有细胞都在被胰酶消化着, 但是我们忽视了一个问题就是, 细胞的生长状态是不一样的, 每一个细胞的贴壁情况也是不一样的, 有的贴壁牢固, 有的贴壁没

有那么牢固的，所以，让所有的细胞消化同样的时间对细胞是不公平的，他们受到了差别待遇当然会有脾气啊。。。呵呵。我后来对消化的方法进行了改良。争取做到因材施教呵呵。我称之为“四步消化法”。（以难消化细胞为例）

具体操作：

(1) 首先不加胰酶，倒掉旧培养基加入少量新培养基洗 1-2 遍，（这是前奏，即为第一步，目的是将漂浮着的死细胞之类尽量洗掉。

(2) 然后再加入少量新培养基直接吹打一遍，这一遍是把贴壁不牢固的细胞吹打下来。再用培养基洗一遍，两次所得悬液混合传入新瓶。即为第二步（你可以将这些传入新瓶培养，以与后面胰酶消化过的细胞对比观察看谁长的更好一点就知道该细胞对胰酶的敏感度了。）

(3) 吸干净瓶内剩余液体，加入 0.3ml 左右的胰酶润洗一遍，吸掉弃之，再加入 1ml 左右的胰酶消化。消化的同时置于显微镜下观察，待细胞与细胞之间间隙明显的时候立即吸掉胰酶与干净子弹头里备用，加入新培养基开始吹打，吹打 2-3 遍后吸取悬液于试管或新瓶暂存。用 2ml 左右新培养基洗一遍与前面的混合。（你也可以传入新瓶培养，以与后面及前面的做对比。）这是第三步。

(4) 然后把前面刚吸出来的胰酶重新加进去瓶里继续消化剩余的贴壁牢固的细胞。当然你也可以用新的胰酶，如果你们那比较富裕的话，呵呵。继续镜下观察，待剩余细胞间隙明显，细胞独立开来的时候，吸掉胰酶，加入新培养基吹打。悬液传入新瓶培养（根据实际情况你自己把握）。这是第四步。

其实还可以有第五步，对于特别难消化的细胞和对胰酶特别敏感的细胞的话，你可以继续加第五步甚至第六步。为了细胞更好的状态，更漂亮的样子，没办法，你必须分多批多次消化，这样才能最大限度地降低胰酶对细胞的损伤，保证细胞的状态能够最优。

当然了，如果细胞是属于那种很容易消化的细胞，像 RAW264.7，仅仅第二步就搞定了。就没必要第三步第四步了。这个是需要你在实验中能够自己用心去体会的。建议你接受一个新细胞时把各步消化的细胞分别培养起来做比较，去摸索好细胞对胰酶的要求。便于你后续实验的开展。

将细胞消化分成这几步，除了是为了避免胰酶对细胞的损伤之外，还有一个更重要的作用就是，可以最大程度地把细胞吹打成单个单个的状态，不成片不连体。

因为细胞生长的时候肯定是要相互联系，大部分的细胞都是要成片生长的，尤其是对于贴壁细胞，单个细胞贴壁之后长着长着就长到一片去了。但是如果是成片的细胞抱团的话，传代后细胞是不能贴壁的，这样抱团的细胞就会死亡。所以，消化传代的时候一定要将细胞消化成单个单个的独立状态，这个啊是非常考究你的功夫的！

细胞一旦脱落入悬液里你很难再将他吹打成单个，因为他没有受力点了。很难找到受力点让你对他吹打的力分散开细胞。所以必须要在细胞未脱落之前将其吹打开，受力点就是细胞贴壁的地方。这样你就必须要严格控制好消化的程度啊，这和大师做饭掌握好火候是一样的道理啊。既要消化到容易吹打下来，又不能太过，一吹就整片脱落，要单个单个地往下掉。所以我才要分批分次地加胰酶消化就是为了保证不同生长状态贴壁程度的细胞能够都维持在好的受力点分散开。这个是很重要的一点。尤其是对于某些细胞这一点就是他活去死的致命点。像 Caco-2 细胞就是如此。

另外关于传代很重要一点就是一定不能等到细胞长满的时候才去消化传代。要在细胞长到 70%左右的时候就要传代了，一旦发现细胞生长中已经有叠层生长的时候就要立即进行消化传代。不能再拖了。

6, 洗瓶问题

关于换液传代时候洗瓶的问题。这个纯属各人经验，没有经过大规模验证。

对于用 DMEM 培养基培养的细胞，你在洗的时候如果是用无血清 1640 去洗细胞在随即后的几次中会比用 DMEM 洗的长的要好。同样，用 1640 培养的也有这个现象。

如果不嫌麻烦的话，可以用 PBS 来洗，洗的效果和用无血清培养基洗的效果基本上是一样的，对于有些细胞会更胜一筹。洗的目的主要是洗去培养瓶里残留的血清，防止它对胰酶的影响。这样能够保证胰酶的消化能力优先，是很关键的一点。

再补充一点：传代时 PBS 洗是很重要的一步，最近发现，用 PBS 就可以把细胞消化开来。加入 PBS 放置 10-15 分钟，有些需要更长的时间，等到细胞一个个分离开来的时候，就可以直接吹打下来，但是和胰酶消化一样，要控制好时间，不能时间太过了，要不然损伤细胞，细胞不容易成活，状态容易不好。这个方法对于某些细胞是很管用的。有些细胞用胰酶消化不容易消化成单个的时候，或者临时没有胰酶了，可以选用此方法。不过一定要试试，看是否适合你的细胞。

写在最后，如果您遇到细胞培养方面的问题，欢迎和我们沟通交流，将会有技术老师免费为您解答。

另外，灵思生物也可以为您提供哺乳动物细胞培养实验外包服务。

咨询电话：18171096640

邮箱：market@lingsibio.cn

网址：www.lingsibio.cn

公司地址：湖北省武汉市洪山区花城大道 8 号软件新城 D2 栋 4 楼 009 室