

細胞培養 Cell Culture

黃士維 博士
Shi-Wei Huang Ph. D.
The Center of Translational Medicine,
Department of Education and Research, VGHTC

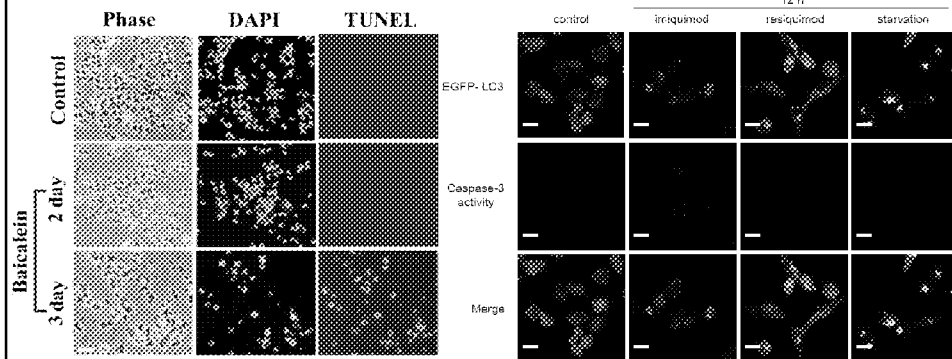
細胞培養之醫學應用

- Immuno-therapy
- Gene therapy
- Transfusion medicine
- Regenerative medicine

Selection of medicine

Ex: Anti-tumor (cytotoxicity)

Ex: AUtophagy (cellular functions)



The characteristics of various cells

一.來源區分

(1).Cell lines

(2).Primary cells

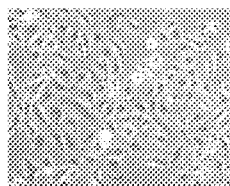
二.生長情形區分

1.貼附性

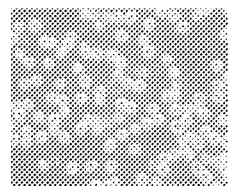
(adhesion)

2.懸浮性

(suspension)



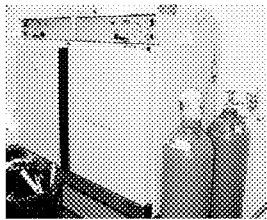
A549



HL-60

細胞培養室之基本配備

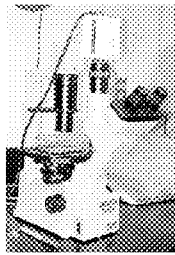
1. 無菌操作台 (Laminar Flow)
2. 5%CO₂ 培養箱
3. 光學顯微鏡
4. 4°C 冰箱
5. 37°C 水浴槽
6. 離心機
7. 液態氮桶



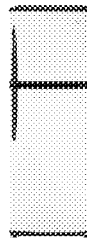
Cell culture incubator



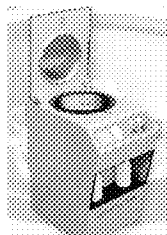
Laminar flow



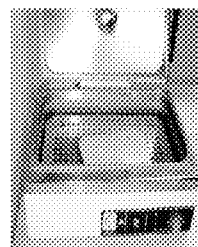
Microscope



Refrigerator



Centrifuger



Water bath

細胞培養之基本概念：

- 1、 培養細胞相關資訊之蒐集及閱讀
- 2、 選用適當之培養基
- 3、 無菌操作步驟
- 4、 解凍細胞及細胞之繼代培養
- 5、 冷凍細胞及細胞之長途運送
- 6、 細胞培養室之維護

培養細胞相關資訊之蒐集及閱讀

選用適當之培養基

Bioresources Collection and Research Center (BCRC)

細胞株資料單

生資中心編號	BCRC 60159		
細胞株名稱	3T3-L1		
細胞株來源	ATCC CL-173		
組織來源	Mouse embryo		
冷凍管容量	1 ml	濃度	1.17×10^6 cells/ml
冷凍日期	2010.03.03	繼代數	P= unknown + 7
存活率	99.2 %	冷凍批號	Lot-01727
生長特性	Adherent		
形態	Fibroblast-like		
培養基	90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose and 1.0 mM sodium pyruvate + 10% bovine calf serum (請使用 calf serum, 而不是 FBS 或其他 serum)		
培養條件	37°C, 5% CO ₂		
冷凍培養基	93% culture medium + 7% DMSO		
培養基更換	Every 2 to 3 days		
繼代培養	移去培養基, 用 PBS 洗滌細胞 1-2 次後移去 PBS, 加入 trypsin-EDTA 溶液, 放在 37°C 作用數分鐘後, 輕拍培養瓶使細胞自瓶壁脫落, 加入含血清之新鮮培養基, 均勻混合後轉移至新的培養瓶中。 注意: 請勿培養細胞至全滿 (completely confluent)。繼代培養時應以高度稀釋比例分盤, 否則容易出現具有 reduced contact inhibition 性質之變異細胞。		
繼代稀釋比例	For 75 sq cm flasks use 4×10^5 cells per flask and subculture every 3 days. A saturation density of approximately 50000 cells per sq cm can be reached.		
污染測試	negative for bacteria, fungi, and mycoplasma		

1. 由於美國標準菌種中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 之規定, 您所使用之本所細胞株並非直接由 ATCC 提供, 故若有任何情形下, 需說明細胞之來源時, 不可敘述來自 ATCC, 亦不可使用 ATCC 之編號, 必須說明來自食品工業發展研究所生質中心 (Bioresource Collection and Research Center, BRCR), 並使用 BRCR 的編號, 其品質資料由 BRCR 負責。
2. 收到細胞株包裹時, 請檢查細胞株冷凍管是否有解凍情形, 若有解凍情形, 請立即通知。收到細胞株後請儘速開始培養, 或立即冷凍保存(置於-70℃隔夜後移到液氮保存)。
3. 依據細胞株資料單指定之培養基種類、血清種類和其他指定之成份和比例, 製備培養基。絕大多數之細胞均無法立即適應不同之基礎培養基或不同之血清種類, 若因實驗需要, 必須有所不同時, 務必以緩慢比例漸次改變培養基組成, 確定細胞適應後, 方進行所需之實驗。
4. 對細胞而言, fetal bovine serum (胎牛血清)、calf serum (小牛血清) 和 horse serum (馬血清) 彼此之差異極大, 務必依據細胞株資料單指定之血清種類培養之。
5. 冷凍細胞解凍程序: 將冷凍管置於 37℃ 水浴中迅速解凍後 (1 分鐘左右), 以 70% 酒精擦拭管壁及管口, 移入無菌操作台內。依據細胞種類和濃度, 於無菌操作台內取適量培養基加至 T25 或 T75 flask 中。取出已解凍之細胞懸浮液, 緩慢加入 flask 內, 混合均勻, 放入培養箱培養。
6. 對絕大多數細胞而言, 1% 以下之冷凍保護劑 (例如 DMSO), 不會對細胞之貼附或活化有不良影響, 不需立刻由解凍細胞中去除, 待第二天確定細胞生長或貼附良好後再去除即可。惟對極少數因對 DMSO 敏感或會造成細胞分化之細胞, 需立即去除 DMSO 者, 則可將解凍後之細胞懸浮液放入 5~10 ml 培養皿中, 離心 1000 rpm, 5 分鐘後, 小心移除上清液, 加入適量新鮮培養基, 將細胞均混勻後, 轉移至培養瓶中, 再放入培養箱培養。
7. 有關細胞株性質資料, 請查詢本中心網頁: <http://www.bcrc.firdi.org.tw> 的生物資源資料庫。

ATCC[®]

Table of Contents:

- Cell Line Description
- Biology Level
- Use Restrictions
- Handling Procedures for Fresh Cells
- Handling Procedures for Filled Columns
- Subculturing Procedures
- Media Replacement
- Complete Growth Medium
- Cryoprotective Medium
- Endpoints
- Replacement Policy
- Specific Bank Information

[illegible][illegible]

Sixty Level 1

[illegible]

These results are also relevant for research purposes only. ATCC recommends that each vehicle containing more than one use of any cell line from animals also signifying noncompliance in a specific use appears. Third party distribution of this cell line is discouraged, since this practice has resulted in the unintentional spreading of cell lines associated with inappropriate use of cell

Museum Slave-Kencing Cacao Cacao refers to the first subject in the following: 1) The odds in their production may not be distributed in their production; 2) The odds in their production are the same as those of Museum Slave-Kencing Cacao Cacao 2) Any proposed commercial use of these odds may not be recognized with The Chinese Office of Indian Affairs, Museum Slave-Kencing Cacao Cacao, 1205 York Avenue, New York, NY 10001, phone: (212) 616-0800 FAX: (212) 616-0800.

To insure the highest level of stability, store the real and nominal shearware in some non-polluting vapors. Upon arrival, occasional storage of the shearware in a vacuum, it should be used in liquid nitrogen vapor phase and not at -90°C . Storage at -70°C will result in loss of stability.

SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective glasses and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling from vials. It is important to note that some vials that have a warning of liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the onset of asphyxiation or blow-off of cap with dangerous

1. There does not by itself appear to be a 2°C warm bias. To reduce the probability of overestimation, keep the 0.5°C and

[illegible]

Human hepatoma HepG2 and Huh7 cell lines were obtained from American Type Culture Collection. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 25 cm² flasks. To study cell growth and viability, cells were grown in duplicate, 1 × 10⁵ cells/ml in a 96-well plate and incubated for 24 h prior to drug treatment. Various concentrations of berberine were added to suspension cultures for indicated time points. Cell viability was assessed by the Thrombocytin acid exclusion method.

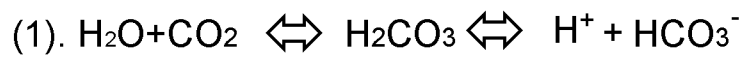
選用適當之培養基

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)		RPMI1640	
Media formulations		RPMI 1640	RPMI 1640 with stable glutamine
		130-091-440	130-091-439
Components		g/L	g/L
Inorganic Salts (g/liter)		Inorganic salts	
CaCl ₂ (anhydrous)	0.20000	CaCl ₂ (anhydrous)	0.1
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.00110	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.4
MgSO ₄ (anhydrous)	0.05770	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
KCl	0.40300	MgO	2.1
NaHCO ₃	1.50000	NaCl	6.5
NaCl	6.40000	NaH ₂ PO ₄	2.5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.12500	Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O)	1.512
Amino Acids (g/liter)		Other amino acids	
L-Arginine-HCl	0.09400	l-Alanine	0.2
L-Cysteine-2HCl	0.05200	L-Asparagine	0.05
L-Glutamine	0.58400	L-Aspartic Acid	0.02
Glycine	0.05000	L-Glutamic	0.02
L-Histidine-HCl·H ₂ O	0.04000	L-Glutamic Acid	0.02
L-Isoleucine	0.12500	L-Isoleucine	0.02
L-Leucine	0.10500	L-Isoleucine-β-Glutamate	0.045
L-Lysine-HCl	0.14600	Met	0.04
L-Methionine	0.03300	L-Phenylalanine	0.040
L-Phenylalanine	0.06800	L-Proline	0.01
L-Serine	0.04000	L-Serine	0.02
L-Threonine	0.06300	L-Serine β-Glu	0.04
L-Tryptophan	0.01800	L-Threonine	0.03
L-Tyrosine 2Na·2H ₂ O	0.10370	L-Tyrosine	0.04
L-Valine	0.09400	L-Tyrosine	0.02
Vitamins (g/liter)		Vitamins	
Choline Chloride	0.00400	Choline Chloride	0.001
Folic Acid	0.00400	Folic Acid	0.001
inositol	0.00700	inositol	0.0025
Nicotinamide	0.00400	Nicotinamide	0.001
D-Pantothenic Acid	0.00400	D-Pantothenic Acid	0.001
(benzoinform)			
Pyridoxine-HCl	0.00400	Pyridoxine-HCl	0.001
Riboflavin	0.00340	Riboflavin	0.001
Thiamine HCl	0.00400	Thiamine HCl	0.001
Other (g/liter)		Other	
D-Glucose	4.50000	D-Glucose	4.50000
Phenol Red	0.01500	Phenol Red	0.01500
Sodium Pyruvate	0.11000	Sodium Pyruvate	0.11000
		Antibiotics	
		Penicillin G	0.001
		Streptomycin	0.001
		Trypsin	0.0025
		Chitosan	0.001
		Starch	0.001
		α-D-Glucose	0.001
		Nicotinamide	0.001
		Pantothenic acid	0.001
		Pyridoxine	0.001
		Thiamine	0.001
		Pyruvate	0.001
		Glucose	0.001
		Glucose	0.001

培養基的成分

- Inorganic salts
- Amino acid
- Vitamins
- Others
- *Glucose
- *Nucleotide
- *Pyruvate
- *Indicators-phenol red
- *pH buffer

The role of sodium bicarbonate in culture medium



List of amino acid

Essential amino acid	Nonessential amino acid
Histidine	Alanine
Isoleucine	Arginine
Leucine	Cysteine
Lysine	Glutamate
Methionine	Glutamine
Phenylalanine	Glycine
Threonine	Proline
Tryptophan	Serine
Valine	Tyrosine
	Asparagine
	Selenocysteine

Preparation of culture medium

Dissolve medium powder (add sodium bicarbonate)



Adjust pH



Add water to a fixed volume



Filter medium



Prepared medium (basal medium)
+ Serum (heat inactivation)
+ penicillin/streptomycin



Complete medium



Cell culture medium



Cell culture serum

血清的成分

- *Protein
- *Polypeptides
- *Hormones
- *Metabolites
- *Nutrients
- *Minerals
- *Inhibitors
- *Unknown materials

血清的功能

- *提供必須營養素
- *含有許多生長因子和激素
- *幫助細胞貼附
- *維持培養環境的穩定

無菌操作步驟

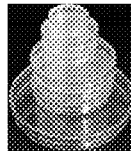
1. 無菌操作基本技術，實驗進行前，無菌室及無菌操作台 (Laminar Flow) 以紫外燈照射30-60分鐘滅菌，以75% ethanol擦拭無菌操作台面，並開啟無菌操作台風扇運轉數分鐘後，才開始實驗操作。
2. 無菌操作工作區域應保持清潔及寬敞，必要物品，例如試管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暫時放置，其他實驗用品用完即應移出，以利於氣流之流通。實驗用品以75% ethanol 擦拭後才帶入無菌操作台內。
3. 小心取用無菌之實驗物品，避免造成污染。例如越過無菌面、勿碰觸吸管尖頭部份或是容器瓶口。

解凍細胞及細胞繼代培養

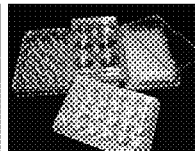
1. Complete medium



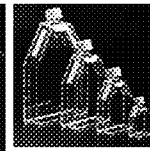
2. Petridish and flask



dish



Plate

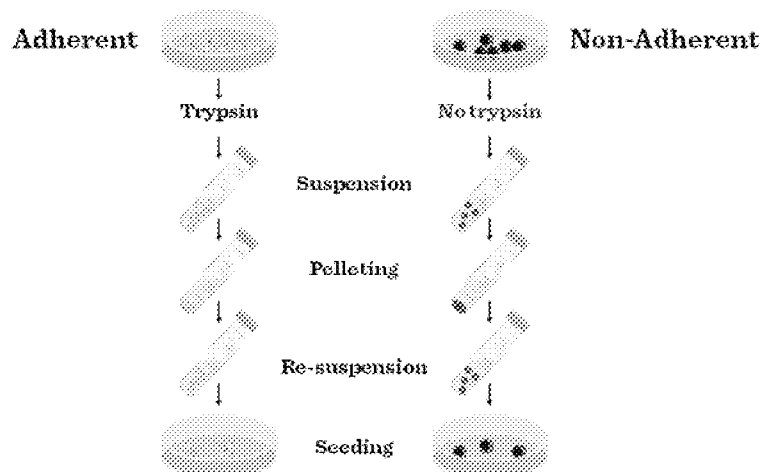


flask

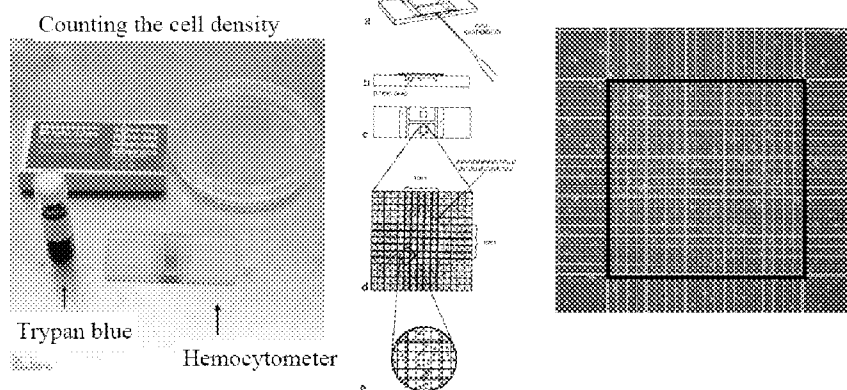
3. Pipette and pipette aid



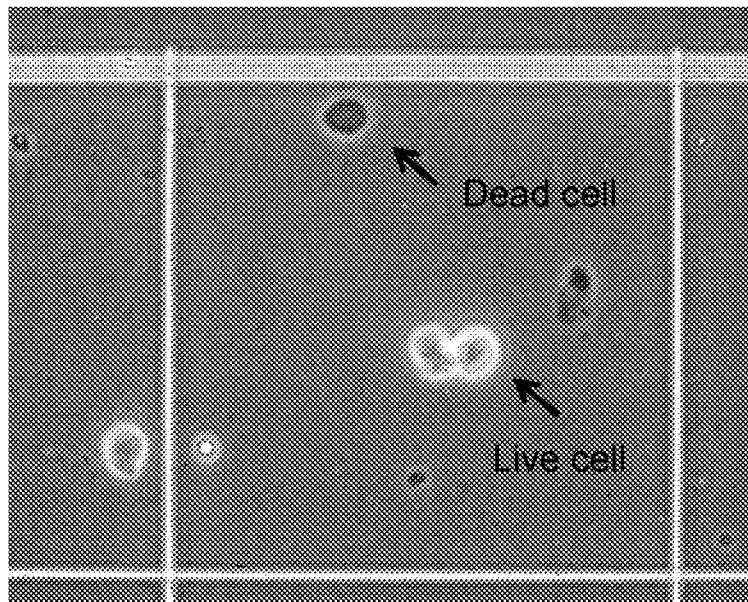
細胞培養(2D)



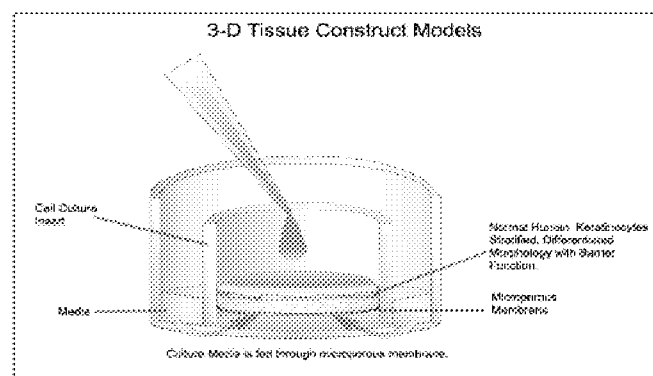
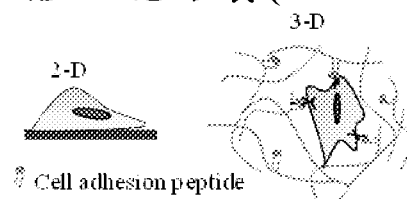
細胞計數



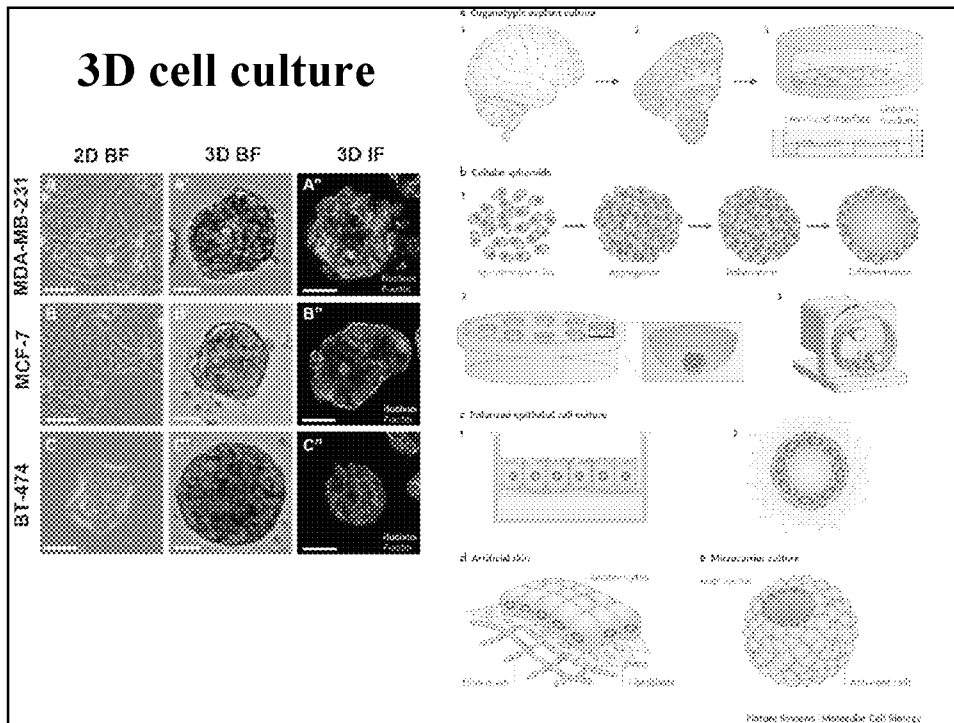
$$\text{Cell numbers (cells/ml)} = \text{counting cell numbers/well} * 10^{-4} * \text{dilution}$$



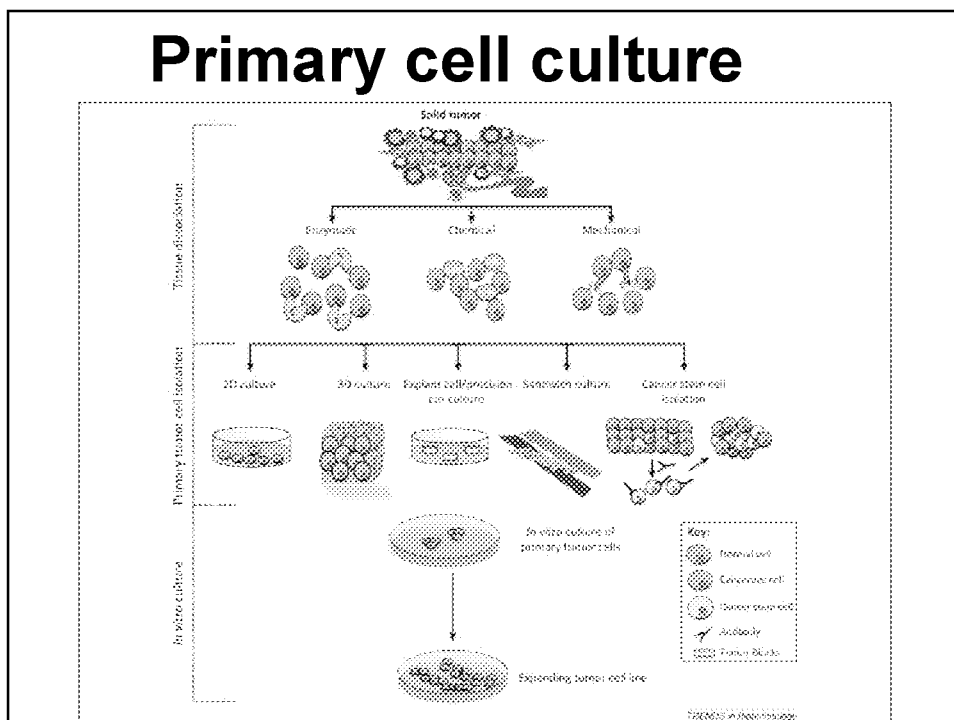
3度立體細胞培養(3D cell culture)



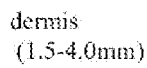
3D cell culture



Primary cell culture

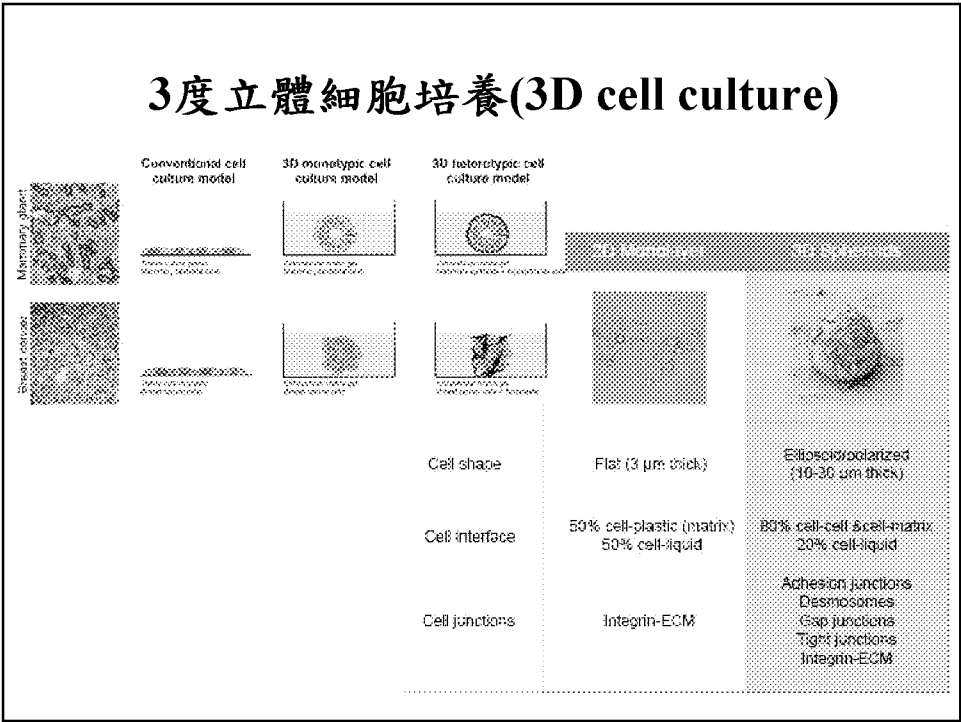
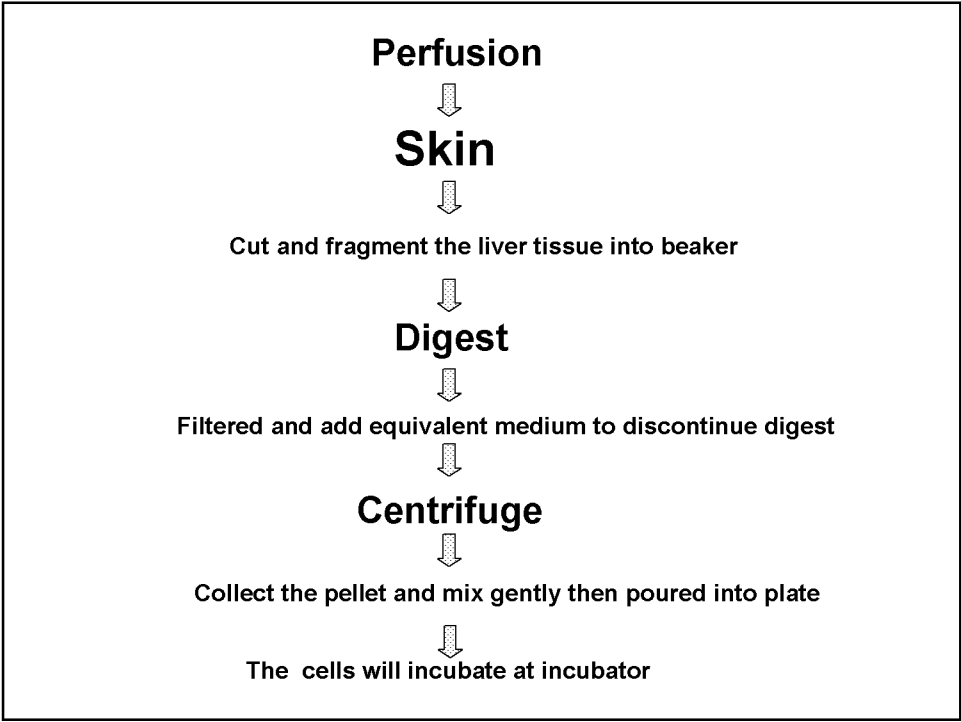


The Skin

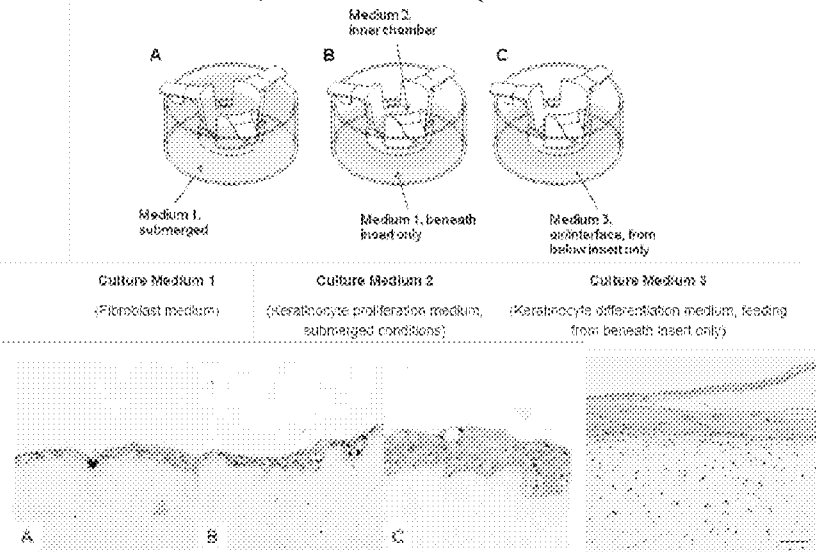


Year	Yearly Inflation	Yearly Inflation Rate
1997	1.6%	1.6%
1998	0.6%	0.6%
1999	0.4%	0.4%
2000	0.8%	0.8%
2001	1.2%	1.2%
2002	2.2%	2.2%
2003	2.6%	2.6%
2004	3.8%	3.8%
2005	3.9%	3.9%
2006	3.2%	3.2%
2007	4.1%	4.1%
2008	5.9%	5.9%
2009	2.4%	2.4%
2010	1.6%	1.6%
2011	3.1%	3.1%
2012	3.5%	3.5%
2013	1.6%	1.6%
2014	1.6%	1.6%
2015	0.1%	0.1%
2016	0.2%	0.2%
2017	2.1%	2.1%
2018	2.8%	2.8%
2019	1.2%	1.2%
2020	4.7%	4.7%
2021	5.4%	5.4%
2022	9.1%	9.1%
2023	4.0%	4.0%
2024	3.3%	3.3%
2025	2.9%	2.9%
2026	2.6%	2.6%
2027	2.4%	2.4%
2028	2.2%	2.2%
2029	2.0%	2.0%
2030	1.8%	1.8%
2031	1.6%	1.6%
2032	1.4%	1.4%
2033	1.2%	1.2%
2034	1.0%	1.0%
2035	0.8%	0.8%
2036	0.6%	0.6%
2037	0.4%	0.4%
2038	0.2%	0.2%
2039	0.1%	0.1%
2040	0.0%	0.0%
2041	0.0%	0.0%
2042	0.0%	0.0%
2043	0.0%	0.0%
2044	0.0%	0.0%
2045	0.0%	0.0%
2046	0.0%	0.0%
2047	0.0%	0.0%
2048	0.0%	0.0%
2049	0.0%	0.0%
2050	0.0%	0.0%
2051	0.0%	0.0%
2052	0.0%	0.0%
2053	0.0%	0.0%
2054	0.0%	0.0%
2055	0.0%	0.0%
2056	0.0%	0.0%
2057	0.0%	0.0%
2058	0.0%	0.0%
2059	0.0%	0.0%
2060	0.0%	0.0%
2061	0.0%	0.0%
2062	0.0%	0.0%
2063	0.0%	0.0%
2064	0.0%	0.0%
2065	0.0%	0.0%
2066	0.0%	0.0%
2067	0.0%	0.0%
2068	0.0%	0.0%
2069	0.0%	0.0%
2070	0.0%	0.0%
2071	0.0%	0.0%
2072	0.0%	0.0%
2073	0.0%	0.0%
2074	0.0%	0.0%
2075	0.0%	0.0%
2076	0.0%	0.0%
2077	0.0%	0.0%
2078	0.0%	0.0%
2079	0.0%	0.0%
2080	0.0%	0.0%
2081	0.0%	0.0%
2082	0.0%	0.0%
2083	0.0%	0.0%
2084	0.0%	0.0%
2085	0.0%	0.0%
2086	0.0%	0.0%
2087	0.0%	0.0%
2088	0.0%	0.0%
2089	0.0%	0.0%
2090	0.0%	0.0%
2091	0.0%	0.0%
2092	0.0%	0.0%
2093	0.0%	0.0%
2094	0.0%	0.0%
2095	0.0%	0.0%
2096	0.0%	0.0%
2097	0.0%	0.0%
2098	0.0%	0.0%
2099	0.0%	0.0%
2100	0.0%	0.0%

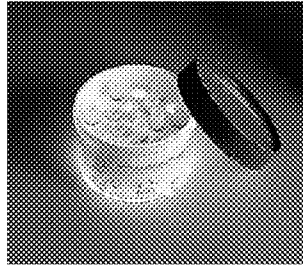




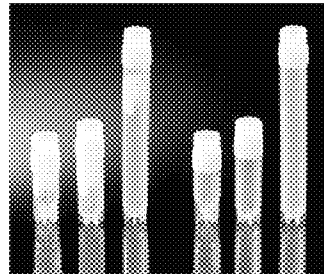
3度立體皮膚細胞培養(3D skin cell culture)



冷凍細胞及細胞之長途運送

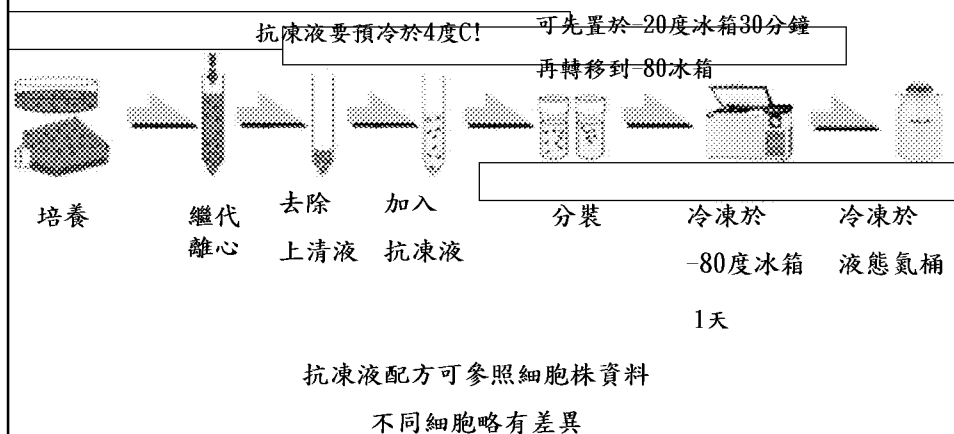


Dewar

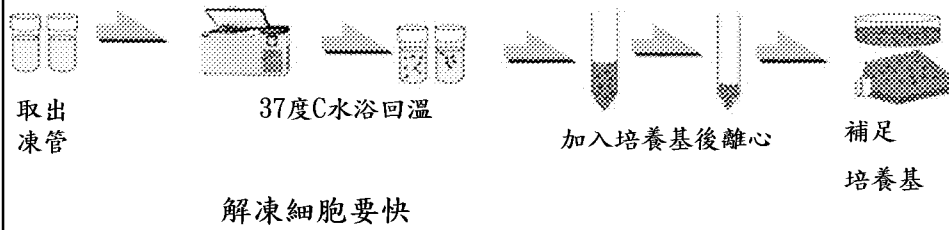


Cryotube

細胞冷凍流程



細胞解凍流程



細胞培養室之維護

定期檢測項目：

- a. CO₂鋼瓶之CO₂壓力
- b. CO₂培養箱之CO₂濃度、溫度是否正常及水盤有無污染和水盤補充水
- c. 無菌操作台之濾網定期更換

細胞培養常見問題

- (1). 冷凍管應如何解凍？
- (2). 細胞冷凍管解凍培養時，是否應馬上去除DMSO？
- (3). 可否使用與原先培養條件不同之培養基或血清？
- (4). 何謂FBS, FCS, CS, HS？
- (5). 細胞培養時應使用多少濃度的CO₂？
- (6). 何時需更換培養基？
- (7). 培養基中是否需添加抗生素？

- (8). 如何繼代附著性的細胞及懸浮性的細胞？
- (9). 冷凍保存細胞的方法。
- (10). 冷凍保存細胞時，冷凍管內需有多少細胞濃度？
- (11). 如何避免細胞污染？
- (12). 培養過程中造成微生物污染的種類與處理方式
- (13). 如何判別細菌污染？
- (14). 如何判別真菌（黴菌）污染？
- (15). 黴漿菌污染的細胞是否能用肉眼看出異狀？

- (16). 黴漿菌污染會對細胞培養有何影響？
- (17). 偵測出有黴漿菌污染時應如何處理？
- (18). 細胞培養箱之水盤該如何清理？
- (19). 為何培養基保存於冰箱中，顏色會偏暗紅，pH值會越來越高？
- (20). 不同品牌的培養盤對細胞培養是否有差異？
- (21). 冷凍管解凍後，細胞數偏少的原因。
- (22). 冷凍管解凍後，細胞死亡率高，存活率不佳的原因。

細胞培養常見之問題與回答(一)

Q1: 冷凍管應如何解凍？

A1: 取出冷凍管後，須立即放入 37° C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化，並注意水面不可超過冷凍管蓋沿，否則易發生污染情形。另冷凍管由液氮桶中取出解凍時，必須注意安全，預防冷凍管之爆裂。

Q2: 細胞冷凍管解凍培養時，是否應馬上去除 DMSO？

A2: 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，應直接放入含有 10-15ml 新鮮培養基之培養角瓶中，待隔天再換新鮮培養基以去除 DMSO 即可，如此可避免大部分解凍後細胞無法生長或貼附之問題。

Q3: 可否使用與原先培養條件不同之培養基？

A3: 不能。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，細胞大都無法立即適應，造成細胞無法存活。

Q4: 可否使用與原先培養條件不同之血清種類？

A4: 不能。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，血清使用錯誤常會造成細胞無法存活。

Q5: 何謂 FBS、FCS、CS、HS？

A5: FBS (fetal bovine serum) 和 FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，兩者都是指胎牛血清，FCS 乃錯誤的使用字眼，請不要再使用。CS (calf serum) 則是指小牛血清。HS (horse serum) 則是指馬血清。

Q6: 培養細胞時應使用 5% 或 10% CO₂？或根本沒有影響？

A6: 一般培養基中大都使用 HCO₃⁻/CO₃²⁻/H⁺ 作為 pH 的緩衝系統，而培養基中 NaHCO₃ 的含量將決定細胞培養時應使用的 CO₂ 濃度。當培養基中 NaHCO₃ 含量為每公升 3.7g 時，細胞培養時應使用 10% CO₂；當培養基中 NaHCO₃ 為每公升 1.5g 時，則應使用 5% CO₂ 培養細胞。

細胞培養常見之問題與回答(二)

Q7: 何時須更換培養基？

A7: 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。

Q8: 培養基中是否須添加抗生素？

A8: 除於特殊篩選系統中外，一般正常培養狀態下，培養基中不應添加任何抗生素。

Q9: 附著性細胞繼代時所使用之 trypsin-EDTA 濃度？應如何處理？

A9: 一般使用之 trypsin-EDTA 濃度為 0.05% trypsin-0.53mM EDTA.4Na。第一次開瓶後應立即少量分裝於無菌試管中，保存於 -20° C，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。

Q10: 懸浮性細胞應如何繼代處理？

A10: 一般僅需持續加入新鮮培養基於原培養角瓶中，稀釋細胞濃度即可，若培養液太多時，可將培養角瓶口端稍微抬高，直到無法容納為止，分瓶時取出一部份含細胞之培養液至另一新的培養角瓶，加入新鮮培養基稀釋至適當濃度，重複前述步驟即可。

Q11: 欲將一般動物細胞離心下來，其離心速率應為多少轉速？

A11: 欲回收動物細胞，其離心速率一般為 300xg (約 1,000 rpm)，5-10 分鐘，過高之轉速，將造成細胞死亡。

Q12: 細胞之接種密度為何？

A12: 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。

Q13: 細胞冷凍培養基之成份為何？

A13: 動物細胞冷凍保存時最常用之冷凍培養基是含 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。注意：由於 DMSO 稀釋時會放出大量熱能，故不可將 DMSO 直接加入細胞液中，必須使用前先行配製完成。

Q14: DMSO 之等級和無菌過濾之方式為何？

A14: 冷凍保存使用之 DMSO 等級，必須為 Tissue culture grade 之 DMSO (如 Sigma D2650)，其本身即為無菌狀況，第一次開瓶後應立即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 之裂解而釋出有害物質，並可減少污染之機會。若要過濾 DMSO，則須使用耐 DMSO 之 Nylon 材質濾膜。

細胞培養常見之問題與回答(三)

Q15: 冷凍保存細胞之方法？

A15: 冷凍保存方法一：冷凍管置於 4° C 30-60 分鐘 → (-20° C 30 分鐘) → -80° C 16-18 小時 (或隔夜) → 液氮槽 vapor phase 長期儲存。

冷凍保存方法二：冷凍管置於已設定程式之可程式降溫機中每分鐘降 1-3° C 至 -80° C 以下，再放入液氮槽 vapor phase 長期儲存。

-20° C 不可超過 1 小時，以防止冰晶過大，造成細胞大量死亡，亦可跳過此步驟直接放入 -80° C 冰箱中，惟存活率稍微降低一些。

Q16: 細胞欲冷凍保存時，細胞冷凍管內應有多少細胞濃度？

A16: 冷凍管內細胞數目一般為 1×10^6 cells/ml vial，融合瘤細胞則以 5×10^6 cells/ml vial 為宜。

Q17: 應如何避免細胞污染？

A17: 細胞污染的種類可分成細菌、酵母菌、黴菌、病毒和黴漿菌。主要的污染原因為無菌操作技術不當、操作室環境不佳、污染之血清和污染之細胞等。嚴格之無菌操作技術、清潔的環境、與品質良好之細胞來源和培養基配製是減低污染之最好方法。

Q18: 如果細胞發生微生物污染時，應如何處理？

A18: 直接滅菌後丟棄之。

Q19: 黴漿菌 (mycoplasma) 污染的細胞，是否能以肉眼觀察出異狀？

A19: 不能。除極有經驗之專家外，大多數遭受黴漿菌污染的細胞株，無法以其外觀分辨之。

Q20: 黴漿菌污染會對細胞培養有何影響？

A20: 黴漿菌污染幾乎可影響所有細胞之生長參數，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。

Q21: 偵測出細胞株有黴漿菌污染時，該如何處理？

細胞培養常見之問題與回答(四)

A21: 直接滅菌後丟棄，以避免污染其他細胞株。

Q22: CO₂ 培養箱之水盤如何保持清潔？

A22: 定期 (至少每兩週一次) 以無菌蒸餾水或無菌去離子水更換之。

Q23: 為何培養基保存於 4° C 冰箱中，顏色會偏暗紅色，且 pH 值會越來越偏鹼性？

A23: 培養基保存於 4° C 冰箱中，培養基內之 CO₂ 會逐漸溢出，造成培養基越來越偏鹼性，而培養基中之酚紅指示劑 (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。若培養基偏鹼時，可以通入無菌過濾之 CO₂，以調整 pH 值。

Q24: 各種細胞培養用的 dish, flask 是否均相同？

A24: 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。

Q25: 購買之細胞冷凍管解凍後，為何會發生細胞數目太少之情形？

A25: 研究人員在冷凍細胞之培養時出現細胞數目太少，大都是因為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。建議細胞解凍後不要立刻離心，應待細胞生長隔夜後再更換培養基即可。

Q26: 購買之細胞死亡或細胞存活率不佳可能原因？

A26: 研究人員在細胞培養時出現存活率不佳，常見原因可歸納為：

- 培養基使用錯誤或培養基品質不佳。
- 血清使用錯誤或血清的品質不佳。
- 解凍過程錯誤。
- 冷凍細胞解凍後，加以洗滌細胞和離心。
- 懸浮細胞誤認為死細胞。
- 培養溫度使用錯誤。
- 細胞置於 -80° C 太久。

Q27: 收到之冷凍管瓶身破裂，瓶蓋有裂紋，或瓶蓋脫落之原因？

A27: 冷凍管瓶蓋裂紋，或瓶身破裂，可能是因為操作者夾取冷凍管時用力不當，造成冷凍管裂損，建議使用止血鉗小心夾取。另冷凍管瓶蓋鬆動或鬆脫，乃因熱脹冷縮之物理現象，冷凍管有可能因此而造成細胞污染，故冷凍管於放入和取出液氮桶時，均應立刻將冷凍管再一次扭緊。

教教學研究部細胞培養共同實驗室使用申請表

申請日期： 年 月 日

申請者姓名		單位	
		職稱	
單位主管簽章			
研究內容			
使用期限	自民國 年 月 日至 年 月 日		

使用期限以一年為上限，續借得重新申請

實驗室借用者同意：

1. 在實驗室使用日誌上簽名
2. 遵守儀器使用規則，以維持儀器正常運作。
3. 除非經過管理者(徐士蘭，分機4037/ 謝淑鐘，分機4037)同意，不任意移動實驗室儀器。
4. 管理者得應實驗需要同意移入相關儀器。移入實驗室之儀器，一律視為公用。
5. 儀器若有損壞，立即告知管理者。
6. 維持儀器與實驗室整潔。
7. 不惡意佔用儀器與空間
8. 若有違反以上條例經查屬實，教研部依情節輕重，可隨時取消實驗室使用權

實驗室使用者簽名_____

年 月 日

實驗室負責主管簽章_____

年 月 日

教學研究部主任簽章_____

年 月 日

Thanks for your attention !