

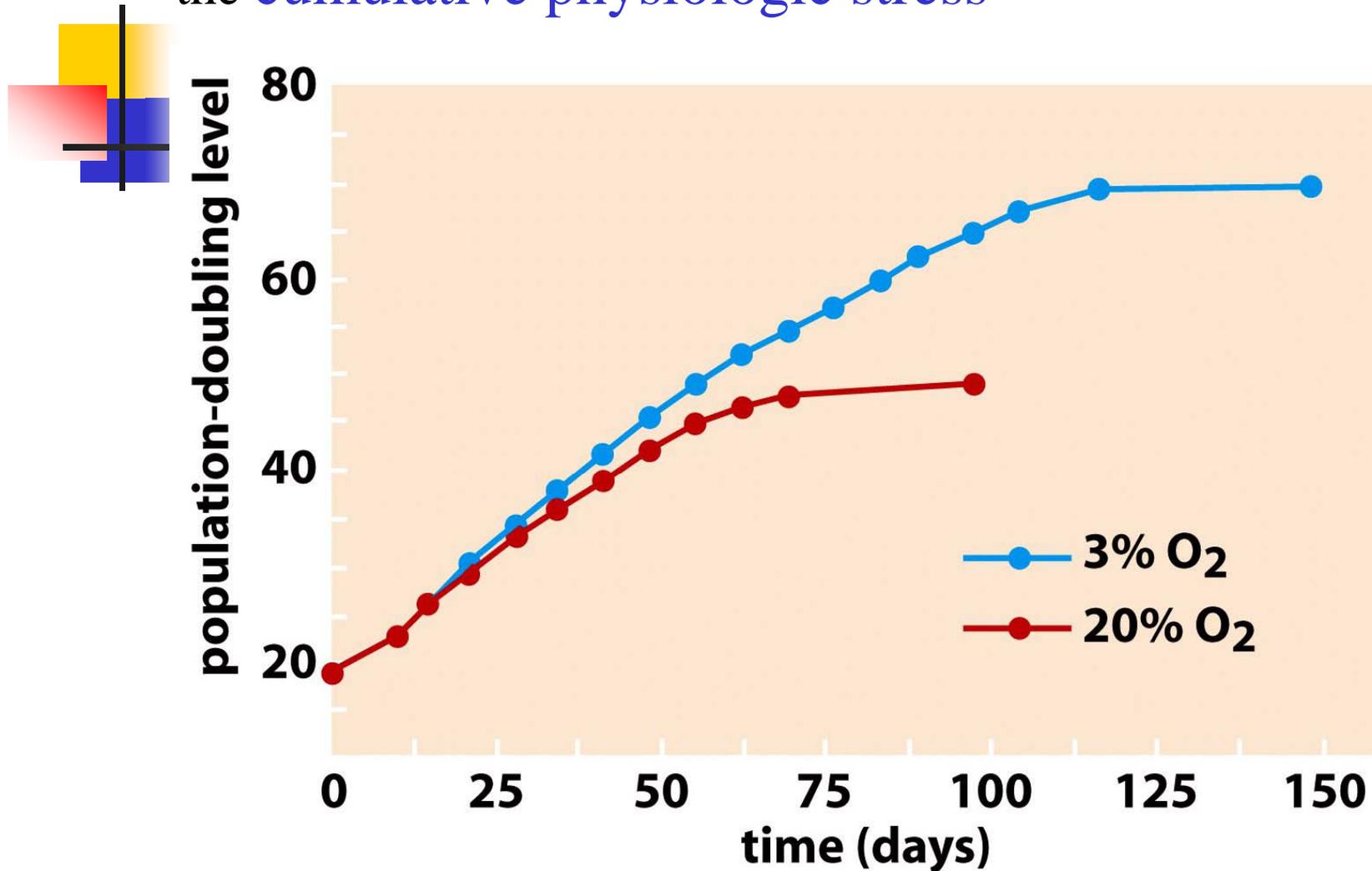
# 常見細胞培養問題與回答

新竹食品工業發展研究所

洪啟仁 副研究員

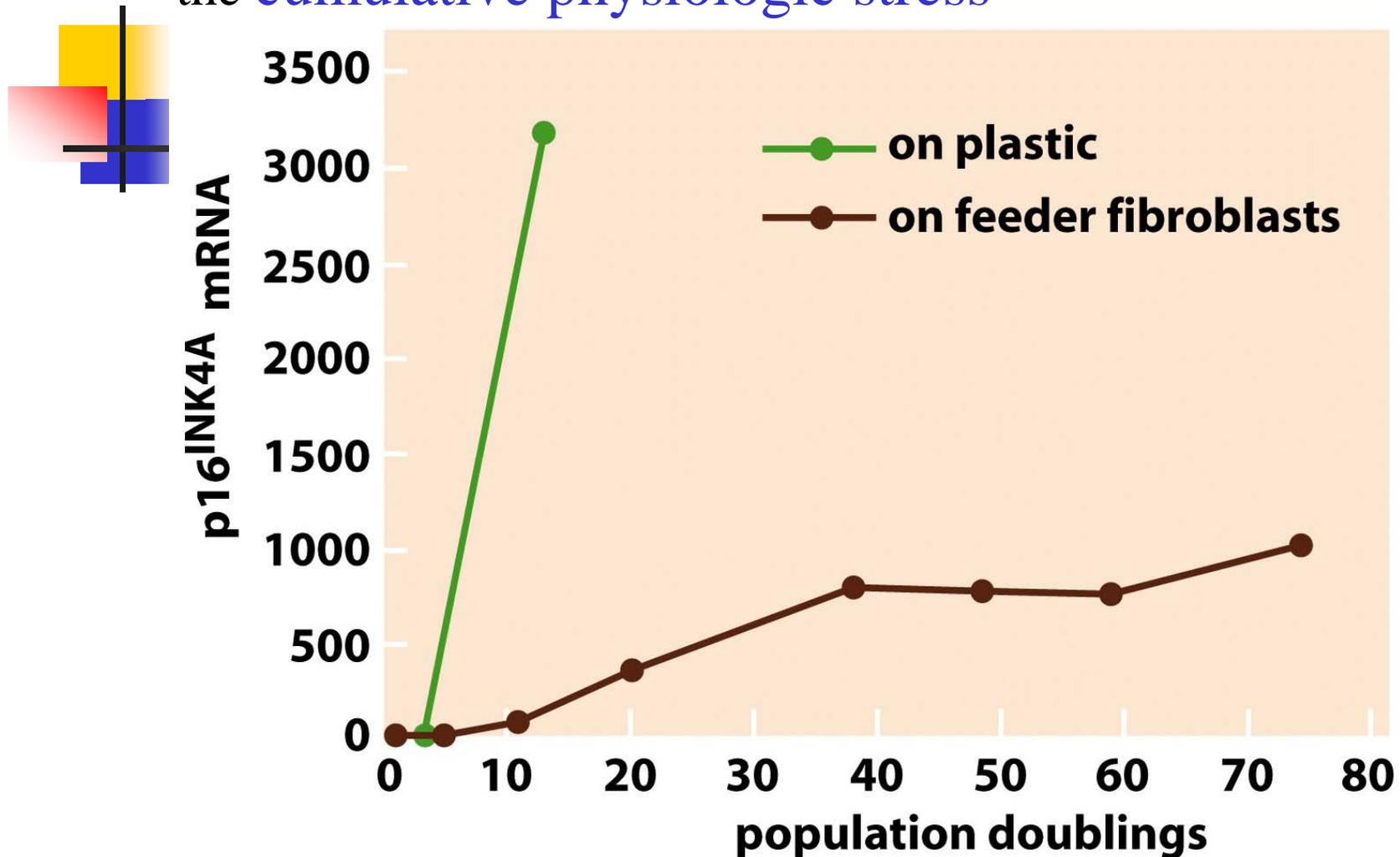


Influence of culture conditions on cell division numbers by the **cumulative physiologic stress**

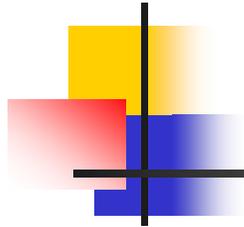


Reactive oxygen species (ROS)

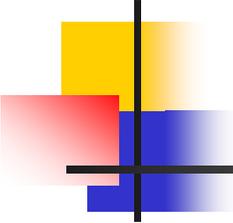
Influence of culture conditions on cell division numbers by the **cumulative physiologic stress**



p16<sup>INK4A</sup> can act to halt further proliferation.



Cultured cells would grow happier when  
decrease cumulative physiologic stress !

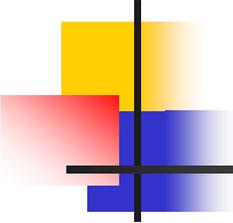


## 細胞保存方式

---

收到後放-80°C 冰箱，但隔日須活化培養：  
放-80°C overnight，隔日活化培養。若不活化培養應  
隨即放液氮保存。

過一段時間才要活化培養：  
直接移至液氮保存



## 細胞保存常見問題

---

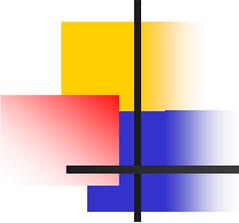
Q: 放-80°C 冰箱保存時間過長對細胞有何影響?

A: -80°C 冰箱由於溫度變動大而易對細胞造成傷害，更因此隨著貯存時間愈久而細胞存活率愈低。

Q: 冷凍細胞會隨著液氮保存時間愈久，而降低存活率嗎?

A: 細胞株置於液氮保存不會影響存活率。

# 活化培養的程序



打開水浴槽，確認溫度

↓

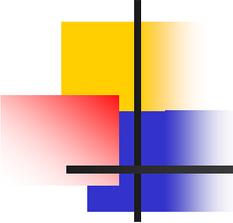
將冷凍管以水浴快速解凍(1~2分鐘)，且  
必須完全解凍(避免細胞內冰晶反覆形成)

↓

立刻將解凍後的細胞液加至flask(dish)  
中，然後緩慢加入新鮮培養基(避免滲透  
壓差傷害)

↓

置於培養箱培養，隔日再離心更換新鮮  
培養基(避免剛解凍後的細胞受到離心之  
物理傷害)

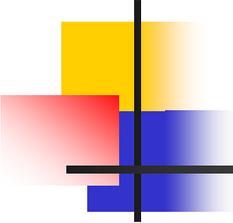


## 活化培養常見問題

---

1. 冷凍管解凍不完全。
2. 未避免滲透壓差傷害。
3. 解凍完馬上離心。(解凍完後的細胞生長勢弱，離心使得細胞傷害更大，造成生長勢無法回復。)

96.7.1~97.7.31期間 該類反應占總反應之**35%**

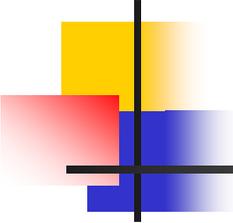


## 活化培養常見問題

---

冷凍管解凍及培養基回溫的溫度須配合細胞適合生長的溫度，否則細胞容易生長不佳。曾發生以下案例：

1. SF9昆蟲細胞適合生長於低溫(28 °C)環境，然而客戶解凍該細胞時卻以37°C水溫解凍，結果日後生長狀況不佳。
2. 客戶將細胞冷凍管置於56°C水浴下解凍。
3. 冷藏於4°C下之培養基未加以回溫即進行培養。



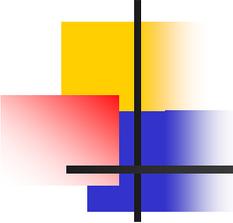
## 培養基相關問題

---

**Q: 細胞培養資料單上建議於培養基中額外添加的Supplement 是否可以乎略？**

例如培養基中已含有L-Glutamine(L-Gln)，是否還要添加？

1. L-Gln 濃度是否到達建議量。
2. 培養基中的L-Gln 容易分解，因此放置過久的培養基必須再補充至足量的L-Gln。
3. 細胞是否容易受到L-Gln不足而受影響。Raw264.7細胞容易因L-Gln 不足而分化。



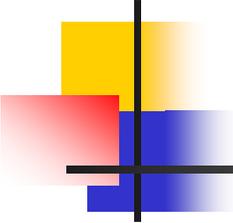
## 培養基相關問題

---

RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES and 1.0 mM sodium pyruvate, 0.05mM 2-mercaptoethanol,90%; Fetal bovine serum,10%

省略成

RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate,90%; Fetal bovine serum,10%

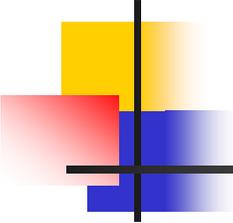


## 培養基相關問題

---

**Q: 可否使用與原先培養條件不同之培養基？**

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，造成細胞無法存活或造成細胞變性，若培養者仍希望進行不同培養基的更換，需等細胞依原先培養基解凍過並經過一次繼代過後，再用欲更換的培養基以 **1/3的比例** 慢慢取代原先的培養基。

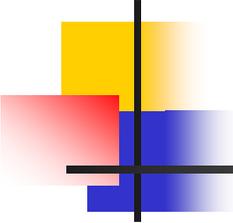


## 培養基相關問題

---

Q: Ham's F12=Ham's F12K medium??

1. 兩者為不同的培養基，且鹽類濃度差異很大。
2. 細胞培養時常因用錯培養基而造成細胞死亡。



## 培養基相關問題

---

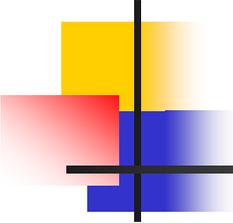
**Q: 可否使用與原先培養條件不同之血清？**

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，各種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。

FBS (fetal bovine serum) 和FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，兩者都是指胎牛血清

CS (calf serum) 則是指小牛血清。

HS (horseserum) 則是指馬血清。

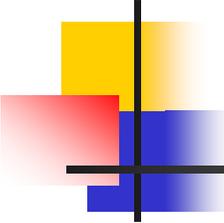


## 培養基相關問題

---

Q: 客戶配製培養基時曾發生下列關於 $\text{NaHCO}_3$ 之問題？

1. 培養基中未加入 $\text{NaHCO}_3$ 。
2. 加入 $\text{NaHCO}_3$ 後未調整pH值。
3. 加入過量的 $\text{NaHCO}_3$  ( $>10\text{g/L}$ )。

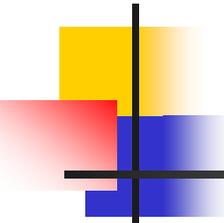


## 污染相關問題

---

有些細胞株的生長特性是容易漂起或產生細胞碎片，造成培養基外觀或鏡檢下看起來像是細菌污染，為避免誤判情形發生因此可以進行以下簡易測試：

1. 配製不含抗生素的培養基並加適量的體積至T25或dish中。
2. 加入100~200ul疑似污染的細胞培養基。
3. 於**隔日觀察**，外觀黃色混濁且鏡檢下漂有大量懸浮物即是細菌污染。

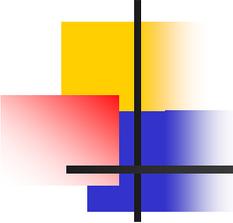


## 污染相關問題

---

Q: 鏡檢下觀查到的小黑點是否為污染？

1. 培養過程中若懷疑有污染，則必須進行污染檢測。
2. 若檢測結果沒有污染情形且細胞生長速度正常，這些所謂的小黑點可能是血清雜質、細胞破片等。小黑點由於布朗運動的原因，使得鏡檢下看起來會旋轉。此外，隨著時間愈久，細胞碎片增多、血清中蛋白質與雜質聚積，使得這些所謂的小黑點看似有增殖的情形。



## 其它培養常見的問題

---

附著性細胞繼代時所使用之trypsin-EDTA 常見的問題:

Q1: Trypsin-EDTA 使用濃度:

0.05% trypsin-0.53mM EDTA。

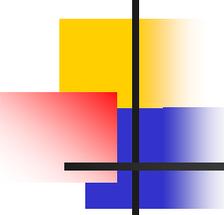
Q2. Trypsin作用的時間愈來愈長:

反復冷凍解凍造成trypsin 之活性降低

建議:

第一次開瓶後應立即少量分裝於無菌試管中（每管10 ml），

保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 。



## 其它培養常見的問題

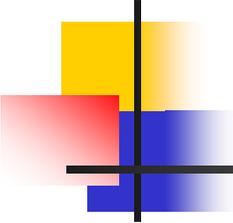
附著性細胞繼代時所使用之trypsin-EDTA 常見的問題:

Q3: 是否需去除trypsin-EDTA:

雖然含血清之培養基可以終止Trypsin作用，但細胞培養之標準操作程序仍建議去除Trypsin-EDTA

Q4: 如何去除trypsin-EDTA:

- 視操作者的習慣，若操作者在繼代時加入trypsin-EDTA後，使trypsin-EDTA浸潤整個flask或dish，在細胞未脫落時吸去大部分的trypsin-EDTA，此時操作者可不需離心即作可分盤處理，
- 加入含血清的培養基後請離心去除trypsin-EDTA後再作分盤處理。



## 其它培養常見的問題

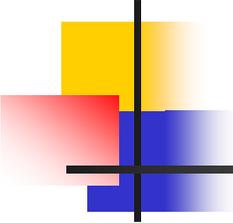
---

**Q: 懸浮性細胞應如何更換培養基?**

一般僅需持續加入新鮮培養基於原培養角瓶中或將培養瓶直立後靜置一段時間，待細胞沉降後取出一半舊培養基並加入一半新鮮培養基。

**Q: 欲將一般動物細胞離心下來，其離心速率應為多少轉速?**

離心速率一般為300xg (約1,000rpm)，5 - 10 分鐘，過高轉速，將造成細胞死亡。



## 其它培養常見的問題

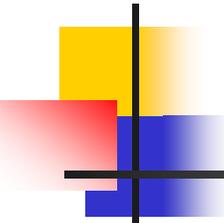
---

### Q: 細胞之接種密度為何？

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生長緩慢，甚至無法生長之一重要原因。

### Q: 培養基中是否須添加抗生素？

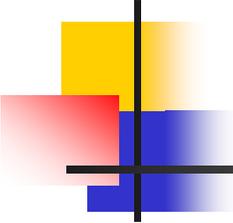
除於特殊篩選系統中外，一般正常培養狀態下，培養基中不應添加任何抗生素。



## Antibiotics have a number of significant disadvantages

---

1. They encourage the development of antibiotic-resistant organisms.
2. They hide the presence of low-level, cryptic contaminants that can become fully operative if the antibiotics are removed, the culture conditions changed, or resistant strains develop.
3. They may hide mycoplasma infections.
4. They have antimetabolic effects that can cross-react with mammalian cells.
5. They encourage poor aseptic technique.

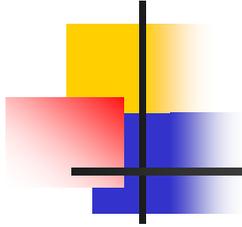


## 其它培養常見的問題

---

### Q:培養正常細胞應注意哪些？

1. 正常細胞都有發生老化的問題，但如果處理得宜便可延遲細胞老化速度。使用正確的培養基、品質高的血清、接種密度必須在建議範圍內、細胞不能過滿了(over confluence)才繼代等等是造成老化常見的原因。
2. 正常細胞也亦可能因自然篩選而造成癌化細胞增加的情形發生，因此使用一段時間後就必須更換代數較少的細胞進行實驗。



- 培養細胞上若有問題歡迎致電  
**(03)5223191分機248或**  
**E-mail:bcrcweb@firdi.org.tw**



財團法人食品工業發展研究所  
生物資源保存及研究中心

新竹市食品路 331 號 <http://www.bcrc.firdi.org.tw>  
Tel: 03-5223191 ext. 248 Fax: 03-5224172 or 03-5214016

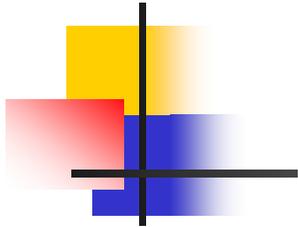
細胞株問題反應單

親愛的顧客：

本所一直以優良品質與快速服務為宗旨。若您對本所之細胞株有活化、污染、存活及培養之問題，請於收到細胞株一個月內，填妥下列表單後傳真或信件傳送至本所，我們會立即處理。非常感謝您的合作。

基本資料	傳真日期：	機構：	部門：	
	反應者：	連絡電話：	傳真：	
	E-mail：			
研究室主管及職稱： <small>(※請務必填寫，以便聯絡或回函)</small>		連絡電話：	E-mail：	
產品資料	BCRC/CCRC No.：	名稱：		
	訂單號碼	到貨日期：		
	到貨形式：	<input type="checkbox"/> 冷凍管 <input type="checkbox"/> 15ml 離心管 <input type="checkbox"/> 25T flask <input type="checkbox"/> 其他 _____		
	1. 貨品外觀是否完整？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 2. 貨品是否與您所訂購之細胞株相符？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否			
處理	請描述當您收到菌株或細胞株的處理方式？ <input type="checkbox"/> 立即活化培養 <input type="checkbox"/> 暫時存放：溫度_____ 存放時間_____			
培養條件	培養箱設定溫度：	CO <sub>2</sub> 濃度：		
	基礎培養基名稱：	廠牌：		
		型號：		
	調整 pH 之方式	<input type="checkbox"/> 酸鹼滴定 <input type="checkbox"/> CO <sub>2</sub> <input type="checkbox"/> 其它	調整後的 pH 值：	
	血清名稱：	廠牌：	型號：	
	其它 supplement 名稱：	廠牌：	型號：	
	完整培養基配製完成後貯放至使用的時間： <input type="checkbox"/> 現用 <input type="checkbox"/> 一個月內使用 <input type="checkbox"/> 超過一個月使用			
	您的細胞培養於 <input type="checkbox"/> Dish <input type="checkbox"/> 25T Flask <input type="checkbox"/> 75T Flask <input type="checkbox"/> 其它 _____			

(請接續下頁)



解凍流程	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 水浴槽預熱設定溫度：<input type="checkbox"/>37°C <input type="checkbox"/>28°C <input type="checkbox"/>其它____</li><li>2. 冷凍管置於水浴槽內解凍的時間：<input type="checkbox"/>一分鐘內 <input type="checkbox"/>三分鐘內 <input type="checkbox"/>超過三分鐘 <input type="checkbox"/>其它____</li><li>3. 冷凍管內細胞冰塊：<input type="checkbox"/>剩一點冰塊後加入新鮮培養基 <input type="checkbox"/>完全融解後才加入新鮮培養基 <input type="checkbox"/>其它____</li><li>4. 解凍後是否測試細胞存活率：<input type="checkbox"/>是____% <input type="checkbox"/>否____</li><li>5. <input type="checkbox"/>細胞解凍後加入培養基離心移除抗凍劑 DMSO <input type="checkbox"/>加入培養基後置於培養箱隔夜或等細胞貼附後再去 除 <input type="checkbox"/>其它____</li></ol>
問題描述	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 細胞呈現狀況：<ol style="list-style-type: none"><li>a. <input type="checkbox"/>附着型細胞不貼：<input type="checkbox"/>解凍後隔天即不貼 <input type="checkbox"/>雖開始有貼附，但隔幾天後細胞一直脫落 <input type="checkbox"/>其它____</li><li>b. <input type="checkbox"/>附着型細胞未伸展：<input type="checkbox"/>解凍後隔天未伸展 <input type="checkbox"/>解凍後超過三天仍未伸展 <input type="checkbox"/>其它____</li><li>c. <input type="checkbox"/>懸浮型細胞：<input type="checkbox"/>解凍後隔天細胞大量死亡，僅有少數細胞存活 <input type="checkbox"/>解凍後隔天細胞全數死亡 <input type="checkbox"/>其它____</li><li>d. <input type="checkbox"/>細胞污染</li><li>e. <input type="checkbox"/>其它狀況____</li></ol></li></ol> <p>2. 請您針對以上狀況補充說明：</p>

### 客戶意見處理單

受理編號：2008-155 提出日期：2008/08/18  
 填表人：溫桂真

客戶編號按鈕	FBC023000	機構	[Redacted]	
客戶名稱	[Redacted]	單位	[Redacted]	
電話	[Redacted]	傳真	[Redacted]	
電子郵件	sm[Redacted]@[Redacted].com			
意見受理日	2008/08/18	處理完成期限	2008/09/18	
產品品名(菌號)	60510	產品交件日	2008/08/12	
批號		原負責人		
判斷有效日期	未超過有效日期	初步分析	由實驗室回覆	
業務類別	銷售細胞株			
負責單元主管	黃效民	業務負責人	黃效民	
產品交件狀態 註：交件狀態指的是給客戶產品的形式，或是凍乾、發酵液或報告等。				
注意事項	冷凍管			
客戶意見內容 請見附件： <input checked="" type="checkbox"/> 問題反應單 <input checked="" type="checkbox"/> 原出貨單 <input checked="" type="checkbox"/> 其他				
<input type="checkbox"/> 附加檔案 <input type="checkbox"/> 儲存檔案 <input type="checkbox"/> 開啓檔案 <input type="checkbox"/> 刪除檔案				
檔案名稱	上傳時間	上傳人員	檔案大小	附註
2008-155--反應單.doc	2008/8/18 下午 6:29	溫桂真	80 KB	
2008-155之圖1.JPG	2008/8/18 下午 6:29	溫桂真	522 KB	

指定負責人	洪啓仁	日期	2008/08/19
註：以上資料由負責單元主持人填寫處理意見,並指定負責處理之指定負責人後簽名。			
處理方式(若字數太長請利用附件方式傳送,並註明之)			
是否補寄	補寄	補寄選項	冷凍管
		異常處理	無異常處理
1. 基於本所問題細胞處理原則,客戶於1個月內反應且為第一次訂購該株細胞,擬於9/2補寄—冷凍管以利客戶實驗的進行。 2. 客戶反應細胞解凍後污染,經討論後認為是操作不甚所致。			
註： (1)本欄資料由指定負責人填寫並簽名後交由負責單元主持人簽名。 (2)負責單元接件後應於處理完成期限前(一個月)完成問題處理,請於此欄中說明處理方式。			
處理審核(若字數太長請利用附件方式傳送,並註明之)			
【註】試驗鑑定業務：朱文琛。一般菌株保存業務：李福臨。細胞株保存業務：黃效民。專利業務：陳玉芬。			
服務窗口回覆客戶內容		<input type="checkbox"/> 案件結案	
是否補寄		補寄選項	異常處理

T-GE-008-C

日期	2008/08/27	姓名	黃效民	職稱	細胞資源保存與研發單元主持人
目前關卡	客戶查目處理單-主持人審核				

T-GE-008-C

日期	2008/08/27	姓名	黃效民	職稱	細胞資源保存與研發單元主持人
目前關卡	客戶意見處理單:主持人審核				
審核	<input checked="" type="radio"/> 同意    簽核意見 <input type="radio"/> 駁回				

填單人員	指派負責人	業務負責人
溫桂真 <input type="text" value="2008/08/18"/>	洪啟仁 <input type="text" value="2008/08/26"/>	<input type="text"/>
生物資源服務單元主管	負責單位主管	主任
李士瑛 <input type="text" value="2008/08/18"/>	黃效民 <input type="text" value="2008/08/27"/>	<input type="text"/>

### 領用申請單

單號: EC200808452 填表日: 2008/08/25

申請人	洪啓仁	所屬單元	細胞資源保存與研發單元	分機	577
領用模式	一般	材料類別	動物細胞株	需用日期	2008/09/02

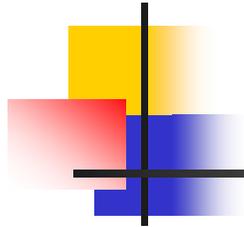
**【出庫明細】** 筆數: 3

BCRC No.	庫房類別	數量	領用原因	相關單號	備註
-	-	0	-	-	-

BCRC No.	名稱	庫房類別	數量	領用原因	相關單號	備註
60026	Neuro-2a	液氮主庫庫房	1	B 補庫	EF200808253	
60037	HT 1080	液氮主庫庫房	1	B 補庫	EF200808253	
60084	NRK-49F	液氮主庫庫房	1	B 補庫	EF200808253	

**【簽核紀錄】**

細胞資源保存與研發單元主持人		意見					
黃效民	請簽核						
代理	請簽核						
序號	部	同意	姓名	代理	簽核	意見	時間
		退回					



國衛院-食品研究所幹細胞庫 仍有提供  
**細胞株活化培養**之服務

### 食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 委託試驗登記單

委託日期: 2008/08/25 樣品簽收日期: 2008/08/25 報告文件日期: 2008/12/22 普通件

受理編號: 97GM098 件數: 1

樣品名稱: 血液 CL-7

委託者: 財團法人長庚紀念醫院 林口總院皮膚科

取樣者: 鍾文宏

試驗項目	EBV轉染人類淋巴瘤細胞
------	--------------

(防黴抗菌試驗)

試驗菌種	
對照組	

報告所需數量(份)	1
8/25樣品送交田桂斌小姐	

備註	報告所需數量(份)	1		
	8/25樣品送交田桂娥小姐			
	此上傳介面僅給窗口人員上傳說明文件或附加表單之用，報告撰寫人請勿於此上傳您的報告附件			
	<input type="button" value="附加檔案"/> <input type="button" value="儲存檔案"/> <input type="button" value="開啓檔案"/> <input type="button" value="刪除檔案"/>			
	檔案名稱	上傳時間	上傳人員	檔案大小
97GM098.JPG	2008/8/25 下午 1:50	唐建華	1 MB	
樣品保存方式	冷藏	剩餘樣品處理	需退回	
試驗金額	6000	報告出具形式	ISO, 不拘	

決行聯

案件執行		案件受理	
單元主持人/ 技術負責人	黃效民	生物資源服務 單元主持人	李士瑛
報告撰寫人	更新人員清單 試驗項目適合人員列於下： 柯惠文 田桂娥 官佳儀	協同負責人	最多可指定四名協同負責人,以便統計之用 指定後會寄送電子郵件通知該人員
負責人	簽章後若按下完成送出,進入初稿填寫表單, 若需再進行中斷申請,請到應用程式啟動 <input type="button" value="中斷申請"/> <input type="checkbox"/> 樣品已領取 樣品領取狀態: <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 異常 領取狀態備註:	服務窗口	建議單元: 細胞資源保存與研發單元 唐建華

生資中心主任/實驗室負責人:

T-CS-010-G

日期	2008/08/27	姓名	黃效民	職務	細胞資源保存與	目前關卡	委託試驗登記單(簽核)單元主持人認可並指派
審核	<input checked="" type="radio"/> 同意 <input type="radio"/> 駁回		簽核意見				

### 活化通知單

單號: SA200808490 填表日: 2008/08/25

申請人	林美杏	所屬單元	生物資源管理與服務單元	分機	513
受理編號	SO200808186	訂購單位	行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 張敬宜		
材料類別	動物細胞株	領用原因	A 銷售	最遲交件日期	2008/09/15
菌株負責單元	細胞資源保存與研發單元	相關單號			

**【菌株明細】**

BCRC No.	訂購數量	交件數量	批號	交件形式	交件日期	無法提供	備註
	0	0				<input type="checkbox"/>	

函名	BCRC No.	訂購數量	交件數量	批號	交件型式	交件日期	無法提供	備註
PC-12	60048	1	0				<input type="checkbox"/>	

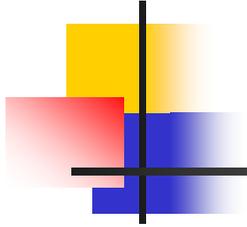
保存單元主持人	黃效民	處理選項	完成指派
保存負責人	請選擇	協同保存負責人	

**【領用紀錄】**

領用申請單	填表日

**【特殊狀況處理紀錄】**

BCRC No.	特殊狀況說明	預定完成日期	相關單號



Thanks For Your Attention!!