



讓細胞 健康的秘訣

讓細胞長好長滿，也讓 Data 存好存滿的撇步！！

編輯：馮芝昕

實驗室常態性動物細胞培養最早始於 1950 年代，第一個被建立的細胞株為 HeLa Cell，是在 1951 年二月美國霍普金斯大學的婦產科醫生 Dr. Jones (H. W. Jones) 取出 H. Lacks 女士子宮頸之組織，經由 Dr. Gey (G. O. Gey) 培養，在 1952 年成功培養出並命名為 HeLa 細胞，此細胞株在生物化學、遺傳學、病毒感染、癌症路徑，蛋白質合成途徑和藥物調控等方面貢獻良多。而在將近七十年的發展下，培養出的細胞株越來越多，培養細胞的技術也不斷精進，如今細胞培養已經成為大多數實驗室必備的技術之一。

細胞培養主要是希望在體外建立一個類似體內的生長環境並使其增殖或分化，進一步經由各種實

驗設計來了解生物細胞的作用機轉或是得到其產物以進行相關研究。相較於動物實驗，細胞培養更容易控制各種會造成實驗差異的環境因素、實驗模式間的個體差異。但，即使如此，往往實驗結果無法達到預期。撇除實驗設計上的瑕疵，細胞狀態是一個常被忽略但卻會影響實驗結果的重要一環。

在培養細胞的過程中，除了一些肉眼可見的問題，如細胞死亡、細胞型態不佳等；還可能出現一些無法觀察到的問題造成實驗結果不如預期，例如細胞看起來明明養得很好，但螢光卻無法 Transfect 到細胞中。到底甚麼原因會造成這樣的結果呢？今天就來一一分析可能的原因！

造成以上問題的原因不外乎下面四個項目：

- 一、細胞：被污染、營養缺乏或接觸到有毒物質。
- 二、環境：細胞培養在不適合的環境下。
- 三、材料：培養在品質不佳或是受到污染的材料上。
- 四、技術：在培養時使用不正確的操作程序。

一、細胞：

(一) 污染

細胞污染是實驗室的頭號大敵，幾乎所有實驗室都會經歷一次微生物污染。造成細胞污染的微生物大致分為：細菌、黴菌及支原體。**細菌**，常見的有大腸桿菌及葡萄球菌，在顯微鏡下成黑色沙粒狀，搖晃時易看到混濁物漂起，被細菌感染的細胞容易中毒並停止生長。**黴菌**，常見的有白色念珠菌、麴黴菌及酵母菌等，黴菌感染不易被發現，通常要到三天後才會看到菌絲生成，被黴菌感染的細胞亦可繼續生長，但久了細胞活力會變差。**支原體**，是一種無細胞壁、介於獨立生活和細胞內寄生之間的最小原核生物，最常見的為黴漿菌。以黴漿菌為例，由於其對抗生素不敏感且多數牛血清都沒有做相關檢測，因此實驗室常有細胞感染黴漿菌之案例；黴漿菌感染不易被發現，只有培養液會輕微變混濁（可使用 DNA 螢光染劑，使支原體 DNA 染色，再使用螢光顯微鏡觀察（#093030000）；或使用黴漿菌 PCR 測試套組（#BSMP101）），且細胞變化也不顯著，只會在培養過程中逐漸死亡。

若細胞被污染，最直接的處理方式就是捨棄細胞，為避免其他細胞受到影響，連細胞培養箱都需要作完整清潔。通常為避免細胞污染都會在細胞培養液中添加抗生素，例如使用 Gentamicin, Streptomycin and Penicillin 等（#SV30010, #SV30079.01）；亦可使用黴漿菌去除試劑（Mycoplasma Removal Agent, #093050044）來清除黴漿菌。除了添加抗生素外，每個月清潔一次細胞培養箱以及 Laminar

Flow 亦可預防微生物污染的情形，例如使用國際認可之二氧化氯（#HQS-1000, #CN-1000）做細胞培養箱及 Laminar Flow 擦拭清潔。

(二) 營養缺乏

現今之細胞種類繁多，不同種類之細胞所需之營養成分不同。但現在實驗室為因應不同實驗設計故培養之細胞大多不只一種，卻使用同一種細胞培養液來培養細胞，如此易造成細胞表現不佳（如生長不良、附着力差或單層崩解），此種現象多在細胞營養缺乏時發生，亦有可能造成巨細胞、空泡及細胞邊緣參差不齊。造成營養缺乏之原因可能為缺乏特定成分，或營養成分太快被消耗等。可藉由添加胺基酸、維生素、葡萄糖或較高濃度的血清到培養液中，並觀察細胞反應來判斷培養液成分是否足夠，常見之添加物如 L-glutamine、NEAA、HEPES Solution、Sodium Pyruvate Solution 等（#SH30034, #SH30238, #SH30237, #SH30239）。若營養缺乏程度太過嚴重，細胞受損可能無法恢復，此時必須重新培養。

除上述添加物外，亦可加入 BSA（#SH30574）來做為哺乳動物和細菌培養基之養分，BSA 也可幫助維持培養基中的滲透壓（一般需在 280-320 間）。除此之外，BSA 能緩衝培養基中的 pH 值，防止培養基中金屬離子被氧化，且 BSA 有攜帶蛋白之特性（Carrier），因此可輸送養分至細胞還可綁定有毒物質。選擇 BSA 時，需注意其純化方式，且內毒素、IgG、Fatty Acid 的濃度都會影響到 BSA 之效能。

(三) 毒性

細胞毒性是指由產品、材料或細胞培養液所造成的細胞死亡、細胞溶解和抑制細胞生長等反應。不正常的細胞型態是細胞毒性的指標，例如出現巨大的細胞、多核細胞、細胞外觀有坑洞、在細胞質或細胞核中有空洞或細胞邊緣參差不齊等，都是細胞毒性之表現。在材料以及細胞培養液中容易含有內毒素，內毒素為革蘭氏陰性細菌細胞壁中的一種成分，稱脂多醣（Lipopolysaccharide），會在細菌成長、

分裂或死亡後被釋出，而脂多醣對細胞是有毒性的。因此細胞培養耗材以及細胞培養之血清、Media 等，皆須檢測內毒素含量，避免對細胞產生毒性，來自瑞士的 TPP 全部細胞培養耗材皆做過內毒素含量檢測，全系列產品內毒素含量皆 < 0.06 EU / ml。最早開始研發內毒素試劑的公司為 Associates of Cape Cod (ACC)，提供凝膠法、濁度法及呈色法來做內毒素的偵測，其中濁度法試劑搭配 Pryo Kinetix® Flex 儀器，靈敏度可達 0.001 EU / ml，是目前坊間具有最高靈敏度之內毒素試劑。

二、環境

(一) 二氧化碳

哺乳動物細胞培養時之所以需要二氧化碳，主要是因為二氧化碳可以解離成碳酸根離子，而細胞膜上有碳酸氫根的交換器，可以維持細胞 pH 值的穩定。對於大多數細胞來說，5% 的二氧化碳濃度就足夠，然而，對於某些細胞則需要調整二氧化碳濃度，以促進細胞生長。為了確保二氧化碳可與培養液接觸，一般細胞培養耗材都留有氣體交換的空間或含有濾膜以便氣體通過。

(二) 濕度

對細胞來說，除氣體供應外，濕度的控管也十分重要。低濕度會造成培養液的蒸發，而使鹽分濃度過高造成細胞溶解。因此通常在細胞培養箱底部會放置一盤去離子水加上細菌抑制劑來供應足夠的溼度，例如全方位抗菌液 (#HQS-1000) 便可當作抑菌劑使用。

三、材料

(一) 塑膠細胞耗材之材料

細胞耗材對細胞的影響往往是大家最容易忽略的部分，其實耗材的塑料的品質以及塑料表面處理之方法，對於細胞貼附和細胞生長有很大的影響。雖然大部分的廠商都可提供高品質的塑料，讓細胞處於最好的培養環境，但除原料品質外，製造過程的品質也是很重要的，例如，若培養皿表面處理不均勻，會造成培養皿之表面不平坦，因此細胞容易聚集在某個區域、細胞易破損或是出現斑點的現象，此種情形常是因為噴出塑成所需的模具有磨損或是模具不常更換。若是懷疑細胞出現不正常之情形是細胞耗材所造成，可使用成立時間較久之製造商，此類製造商經驗較多，更可管控細胞培養材質的塑成，如瑞士的 TPP。

以細胞貼附為例，細胞貼附主要與胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) 有關，ECM 中各種醣蛋白具有不同的細胞結合性，藉由大量整蛋白結合位 (Integrin Binding Site) 使細胞貼附。然而，常見的塑膠耗材為 Polystyrene (PS) 材質，具高度疏水性，本身並不利於細胞貼附。為了讓細胞貼附，常使用電漿處理細胞耗材表面，增加表面的親水性，但使用電漿處理容易造成表面不均勻，且存放時間越久越可能有不穩定的情形產生。而 TPP 在 1991 年開發出 Opto-mechanical treatment 的技術，利用電磁輻射之光子作為媒介去處理塑材表面，以改變 PS 表面之帶電性，增加表面親水性，由於光子較電漿更能平均分散，因此更能確保塑材表面親水性的平均分佈。

現今細胞耗材廠商繁多，且品質參差不齊，建議實驗室應準備高品質細胞培養耗材（如瑞士 TPP），以免重要實驗因耗材品質不佳而失敗，勿因貪小便宜而浪費珍貴的樣品及時間。

（二）配置培養液

一般細胞培養液中會加入基礎培養基、血清、抗生素以及所需之添加物等，如 L-glutamine。除了需注意添加物是否正確以及濃度比例外，還需注意其處理方式及配置上所使用的耗材。以血清為例，如何正確解凍血清以及血清是否需要去補體，對於保存血清中之營養素至關重要。

如何正確解凍血清？解凍血清的方式有兩種；

1. 標準解凍法，將血清放入 4°C 冰箱中的 Shaker 上慢慢解凍（一般一至兩天便可解凍，放置於 4°C 冰箱請勿超過一個月），搖動可使血清內成分均質化，以免血清內蛋白濃度不均，特別是纖維蛋白原（Fibrinogen）局部濃度過高時，易轉化為非水溶性纖維，造成沉澱，雖不影響血清功能，但會影響實驗觀察；
2. 快速解凍法，將血清放置 37°C 之水浴槽中並均勻搖晃，當完全無冰塊時即可取出血清。但不建議使用此法，因常發生解凍時間過久或水浴槽中溫度不均勻，進而影響血清之品質。

血清是否需要去補體？去補體是利用加熱的方法去除血清中補體之活性，過去因血清製作技術欠佳，因此血清品質不一，而其中補體會對細胞造成影響，因此需要去補體來統一品質。不過現今 HyClone 製作技術精進，因此 HyClone 大多數血清已無需去補體。HyClone 是第一家血清過濾會通過三次 0.1 μm 特製過濾膜進行過濾，且全程低溫製作，其血清品質極為純淨。且 HyClone 也通過測試證明細胞株在沒有去補體之血清中生長狀況較佳。甚麼情況需要去補體呢？若您培養之細胞為免疫相關細胞或對免疫反應相當敏感之細胞，才建議使用去補體之血清。

若在配置培養液時有使用粉末狀之添加物，在調整至適當之 pH 值後，需使用 0.2 μm 之濾膜來移除顆粒及細菌。一般建議使用低蛋白結合（Low-

protein binding）之 Polyethersulfone（PES）濾膜。如德國 Sartorius，便是以濾膜起家，其濾膜品質受到許多工業廠家及學術單位的肯定。

（三）添加物

配置培養液時最常見的幾種細胞培養液添加物為血清、L-glutamine、NEAA、Sodium Pyruvate 及抗生素，其中血清及 L-glutamine 的補充是最需要被留意的。當使用不同批次的血清可能會造成細胞表現與上一批次之血清不同，因不同批次所做出之血清必定有所差異，因此細胞生長情形亦有所不同。而 HyClone 品牌的血清能真正做到 True Pooling 技術，使得不同批次的血清之間的差異非常小。主要是因為 HyClone 每一批取牛血的量很大，如果有幾隻牛的狀況不好，variation 會被稀釋掉。另外在選擇血清的時候需要特別注意 COA 上標示的內毒素和血紅素濃度不宜太高，而 HyClone 血清具有極低的血紅素濃度和內毒素濃度。

另外，添加足夠之 L-glutamine 對於細胞培養也十分重要。在冷藏溫度下，液體狀態的 L-glutamine 的 Half-life 大約為六至八周。因此配置完成之細胞培養液建議在兩個月內使用完畢並避光保存，若無法使用完畢，可定期檢視和補充培養液中的 L-glutamine。

（四）器皿清潔

可清潔再使用之細胞培養玻璃器皿，如 Spinner Flask、血清瓶等，需使用不含磷酸鹽的清潔劑，並須徹底洗清器皿，避免清潔劑之殘留物對細胞產生毒性，或使用中性清潔劑（如 7x Cleaning Solution，#097667094）來避免小分子沉積問題。而且，隨著使用時間的增加，玻璃表面上可能會累積一層界面活性劑和細胞碎片，若重複使用可能會變成內毒素的來源之一。而內毒素之去除通常需使用氫氧化鈉或暴露於 250 度乾熱滅菌下 30 分鐘以上，因此細胞培養器皿多用拋棄式較為方便。

四、操作技術

細胞培養之操作技術，最重要的不外乎是無菌操作，只要是進入細胞培養箱或 Laminar Flow 的動作都需要使用抗菌液（#HQS-1000）或酒精來殺死細菌。除此之外，細胞培養最常做的便是繼代，不當使用胰蛋白酶 trypsin 會導致細胞培養出現問題。Trypsin 會分解附著於細胞表面之蛋白質，但暴露於 trypsin 下過久可能造成太多蛋白被分解，導致細胞再貼附不佳。以下幾點是正確使用 trypsin 的關鍵：

- （一）使用正確的 trypsin 濃度以及考量是否需要 EDTA。各種 Trypsin 濃度皆可含有 EDTA。EDTA 可以藉由吸收鈣及鎂離子以增加 trypsin 效果。

- （二）注意時間－因為過長暴露於 trypsin 下可能影響細胞活性，通常會添加血清以停止 trypsin 的作用。

- （三）不要高速離心。

- （四）注意溫度的控制－較敏感的細胞可在室溫或冷藏溫度下進行分離，然而對較難解離的細胞可在 37°C 下反應，以縮短反應時間。

HyClone 的 HyQTase（#SV30030.01）是來自於非哺乳動物來源的酵素，且同時結合分解蛋白（Proteolytic）與分解膠原蛋白（Collagenolytic）的功能，能溫和有效的進行分離作用，因此細胞存活率不受到時間的影響。操作方便，不需使用到離心作用，且可放置在 37°C 下來終止酵素反應。

更多細胞培養常見問題，歡迎直接洽詢岑祥當區業務。✍

相關產品列表：

廠商	貨號	商品	規格
HyClone	SH30022.02	DMEM	1,000 ml, High glucose with L-glutamine
	SH30027.02	RPMI 1640	1,000 ml, with L-glutamine
	SH30084.03	Characterized FBS	500 ml, Fetal Bovine Serum (Australia)
	SH30034.01	L-glutamine	100 ml, 200 mM
	SH30238.01	NEAA	100 ml, 100x
	SH30237.01	HEPES	100 ml, 1 M
	SH30239.01	Sodium Pyruvate	100 ml, 100 mM
	SH30574.02	BSA, cell culture Grade	100 g
	SH30042.01	Trypsin	100 ml, 0.25 (1x) with EDTA
	SV30030.01	HyQTase	100 ml, 非哺乳動物來源之 Trypsin
	SV30010	Penicillin-Streptomycin	100 ml, 100x solution
	SV30079.01	Antibiotic Antimycotic	100 ml, Pen / Strep / Fungiezone solution
TPP	90026	25 T Flask	Culture Flask, Filter, 360 / cs
	90076	75 T Flask	Culture Flask, Filter, 100 / cs
	90151	150 T Flask	Culture Flask, Filter, 36 / cs
	92006	6 well Plate	Culture Plate, 126 / cs
	92012	12 well Plate	Culture Plate, 126 / cs
	92024	24 well Plate	Culture Plate, 126 / cs
	92096	96 well Plate	Culture Plate, 162 / cs
	93040	4 cm Dish	Culture Dish, 900 / cs
	93060	6 cm Dish	Culture Dish, 840 / cs
	93100	10 cm Dish	Culture Dish, 240 / cs
Sartorius	180C5-E	Bottle-Top 濾杯	500 ml, 0.22 μm, PES, 12/ cs
	180C6-E	Bottle-Top 濾杯	1,000 ml, 0.22 μm, PES, 12/ cs
	180C1-E	濾杯加收集瓶	150 ml, 0.22 μm, PES, 12/ cs
	180C2-E	濾杯加收集瓶	500 ml, 0.22 μm, PES, 12/ cs
	180C3-E	濾杯加收集瓶	1,000 ml, 0.22 μm, PES, 12/ cs
晨杏生醫	HQS-300	全方位抗菌液	300 ml
	HQS-1000	全方位抗菌液	1,000 ml
	CN-1000	克利潔	A 劑, 消毒液 1 L; B 劑, 活化劑 110 g
MP Biomedicals	093050044	黴漿菌去除劑	5 ml, 100x
	093030000	黴漿菌螢光染色套組	100 test
	097667094	器具中性洗滌劑	1 加侖
萬能生技	BSMP101	黴漿菌 PCR 偵測套組	20 rxn