细胞培养常见问题分析解决

摘要：细胞转染时，细胞状态的好坏对转染效率有很大影响。细胞污染可能会导致细胞死亡，本文主要总结了细胞培养中常见污染现象和解决方法。

细胞污染

凡是对细胞生长有危害的成分或者造成细胞不纯的异物都视为污染。细胞污染根据污染源可以分为化学污染，物理污染和生物污染。

化学污染

细胞培养所用到的培养基，水要高压蒸汽锅灭菌。其中，血清作为细胞培养中常用的培养基，血清存在潜在的化学污染，此外血清成分具有不确定性，血清对不同细胞的生长影响包括毒副作用等存在差异。

物理污染

物理污染，主要指温度、振动、放射线、辐射等物理因素对细胞的破坏。如将细胞液培养基等暴露于放射线或紫外线下，会引起细胞代谢改变。恒温培养箱的周围存在能够产生机械振动的设备，可能也会对细胞生长存在一定影响。

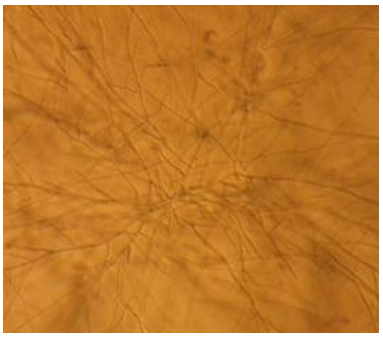
微生物污染

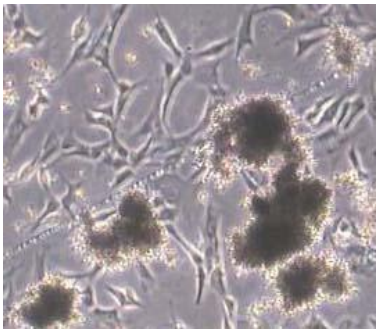
1.细菌：细菌污染常见的有大肠杆菌，葡萄球菌等。细菌污染较易发现，在普通倒置显微镜下为黑色细沙状，培养液一般会在短时间内变黄，有时静置的培养液不混，稍加震荡，变会有很多混浊物漂起。显微镜下可见培养液中有大量圆球状颗粒物漂浮，有时在细胞表面及周围有大量细菌存在，细胞停止生长并有中毒表现。

处理：

- 在培养液中加入相应的抗生素，能够预防绝大多数的细菌污染
- 保证器皿、水充分灭菌，空气无菌，同时保证灭菌压力。

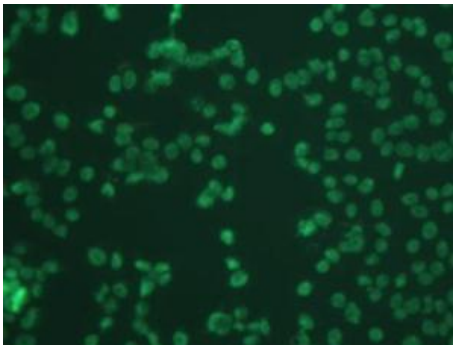
2、霉菌：霉菌的污染多数是白色念珠菌， 曲霉菌，酵母菌等。霉菌污染后培养液短期内依旧清亮不变浑浊，倒置显微镜下可看见细胞之间有交错的丝状，树枝状菌丝，漂浮在培养液中。念珠菌呈卵圆状，在细胞周边生长。细胞被霉菌污染后，仍可生长，长时间细胞的活力状态会变差。





处理：先确定污染物的种类：细菌、真菌还是支原体。如果是霉菌污染。迅速将污染细胞与正常细胞系隔离，并对实验中所用过的所有器皿工具消毒

3、支原体：支原体的大小介于细菌和病毒之间，是一种独立生活的微生物。对热敏感，对一般抗生素不敏感。支原体的形态多变，多吸附在细胞表面和细胞之间。电镜下观察，中心有高密度的密集颗粒，横断面与细胞微绒毛相似。



因国内的血清很多数都没有做支原体阴性检测，而支原体又是牛血清中最常见的微生物之一。支原体污染细胞后，培养液轻微发生混浊 .但细胞变化不显著，在细胞逐渐的培养中，细胞会慢慢死亡。

支原体污染检测：

荧光染色法 :DNA 和与 DNA 特异性结合的荧光染料结合 ,使得支原体的 DNA 着色，然后用荧光显微镜观察。镜下支原体为散在于细胞同围或附于细胞膜表面的亮绿色小点。

解决：

1.抗生素排除法：支原体污染预防比解决好。如果不小心污染后，可加入高浓度抗生素（常规使用的 5 倍浓度）作用 24-48 小时，再换入常规培养液，但该法不保证有效。推荐用量：庆大霉素 200ug/ml ，四环素 10ug/ml ，卡那霉素 50ug/ml 。

2.加温除菌：支原体不耐热，可以对支原体污染的细胞热处理除菌。将支原体污染的细胞放置 41 度中作用 10 小时可杀死支原体。因高温对细胞本身也会产生一定影响，故热处理前需先进行预实验，确定对细胞影响最小而能最大程度的杀死支原体的时间。

4、黑蛟虫：黑胶虫污染后细胞中出现小黑点，高倍镜下可看见不规则的运动。培养液浑浊不明显，对细胞生长状态无太大影响。

解决：如果细胞出现黑胶虫污染，可增加细胞的接种密度，提高细胞存活率。当细胞生长状态很好时，黑胶虫的数量会降低。细胞培养过程中坚持要每天换液，并用缓冲液冲洗，能够大大降低黑胶虫的数量，可最终消失，偶尔在镜下可见个别小黑点，但整体细胞培养和后续的细胞转染无影响。

细胞培养箱染菌清洗方法

用硫酸铜溶液擦拭 CO_2 孵箱内，再把水盘里也加上饱和量的硫酸铜。或者在培养箱的托盘加入饱和的消毒磷酸氢二钠高盐液体，可以防止霉菌污染。

CO_2 孵箱被霉菌污染后，可把所有细胞暂时转移，采用过氧乙酸擦洗孵箱（包括隔板，箱壁）。并把过氧乙酸放置在孵箱内一个小时，使其蒸汽弥漫。待过氧乙酸的气味消散后，再移入细胞。孵箱应定期清洁（2 月左右）。

其它培养箱清洗方法是：用 84 液擦洗 - 清水擦洗 - 75%酒精擦洗 - 紫外灯照。

预防霉菌污染，可在培养基里加 3u/ml 的两性霉素或制霉菌素或放线菌素 D 或双抗；但细胞一旦污染，制霉菌素或放线菌素 D 或双抗都无法弥补，舍弃被污染细胞，并将环境彻底消毒。如果所有细胞都污染，可能是整体系统污染，检查所有培养基和器材，并重新灭菌。针对个别污染，首先考虑操作问题，注意操作规范。

更多优质服务推荐

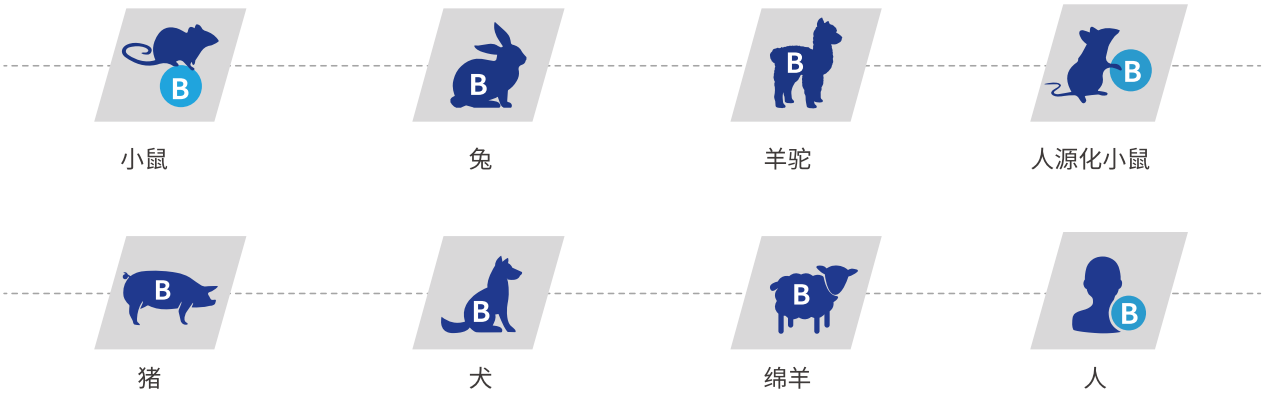
① SingleB® mAb Discovery Service
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

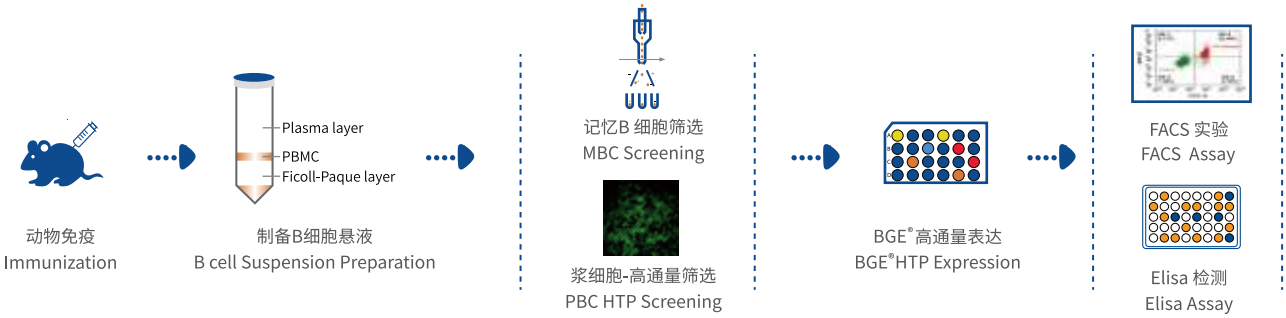
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，亲和力更优
- 高通量，周期短，单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程



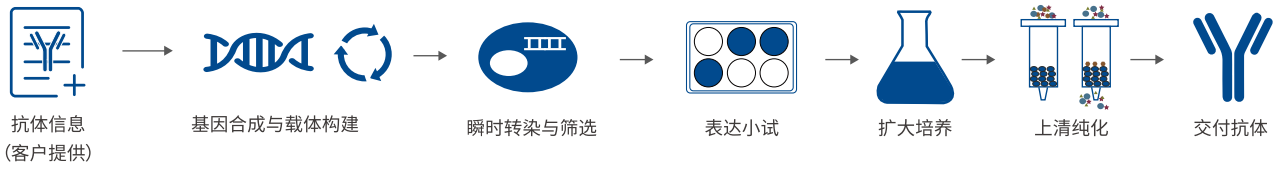
Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')$_2$、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势

服务流程

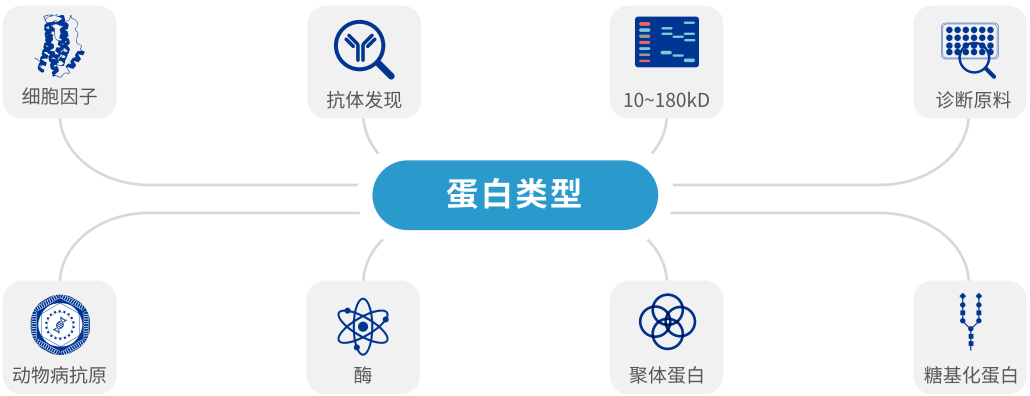


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service
杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

服务流程

5 Biomolecular Interaction Analysis Service
分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振（SPR）平台及生物膜干涉技术（BLI）平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down，免疫共沉淀，酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围

蛋白和蛋白　蛋白和小分子　蛋白和抗体　蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6 Antibody Humanization Service
抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法，通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算，获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势

- 重链和轻链同时参与优化
- 改造后的抗体人源化程度>90%
- 人源化抗体的亲和力与初始抗体相当
- 可进行多物种的抗体人源化

服务流程

1. Antibody sequence confirmation
2. Human germline acceptor selection
3. CDR grafting
4. Back mutation
5. Mutation energy ranking
6. Antibody expression
7. Affinity ranking

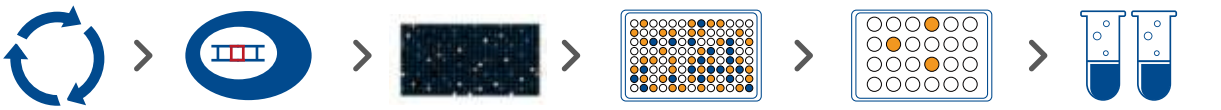
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务，筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台，较传统筛选流程快近100天，大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



基因合成&质粒抽提 › 稳定转染 › On-chip筛选 › 压力筛选 › 扩大培养 › 交付单克隆细胞株

服务优势

更快的筛选速度	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L