

如何选择合适的细胞培养基？



细胞培养是实验室里最常见和最基本的实验了，但却不是最简单的。别小看细胞培养，这里可蕴含着大学问。有时候细胞状态不好，转染、药筛这些实验根本就没办法做。影响细胞培养的因素很多，让我们先从培养基和血清说起。

经典的培养基有很多种，Invitrogen (GIBCO)、Thermo Fisher (HyClone)、Sigma 等公司都可以提供。其中 DMEM、RPMI 1640、MEM、DMEM/F12 都是应用最广泛的培养基。其他如 M199、IMDM、L15 培养基等也用于某些细胞的培养。

◆ MEM 是由 Eagle's 基础培养基(BME) 发展而来的，其中增加了组分的范围及浓度。

◆ Dulbecco 改良的 BEM (DMEM) 培养基是为小鼠成纤维细胞设计的，现在常用于贴壁细胞的培养。DMEM 的氨基酸浓度是 MEM 的两倍，维生素浓度是 MEM 的 4 倍，采用双倍的 HCO₃⁻和 CO₂ 浓度起到更好的缓冲作用。最初的配方中葡萄糖含量为 1000 mg/L，后来为了某些细胞的生长需要，将葡萄糖含量又调整为 4500 mg/L，这就是大家常说的低糖和高糖了。

◆ aMEM 含有附加的氨基酸、维生素以及核苷和脂肪酸，它可广泛应用于各种细胞类型，包括对营养成分要求苛刻的细胞。

◆ Ham's F12 是为在低血清浓度下克隆 CHO 细胞而设计的，现在也广泛应用于克隆形成率的分析及原代培养。F12 还可以与 DMEM 等体积混合使用，得到一种高浓度与成分多样化相结合的产物，这种培养基已应用于许多原代培养及更难养的细胞系的培养。

◆ RPMI 1640 培养基是专为淋巴细胞培养而设计的，现在已广泛应用于悬浮细胞的培养。

以前经常听到有人问，这种细胞该用哪一种培养基呢？其实这个问题的答案可以很简单，也可以好复杂。此话怎讲？如果这种细胞是购自 ATCC 或其他细胞库，那很简单，问供应商就行了。或者找到相关的文献，作为参考。Invitrogen 网站上有一个 Cell Line Database 的工具，也很好用。选择你感兴趣的细胞类型，它就会弹出推荐的培养基、血清和转染试剂等，有时还有优化好的转染步骤，很方便。Sigma 网站上也有一个 Media Expert，包括了培养基所有成分的功能描述、使用推介和参考文献等，它还是一个解决问题能手，对于细胞培养中的常见问题，如细胞贴壁不好、培养基变色等，它都会列出可能的原因，并提供补救办法。这个 Expert 果然不简单！

但如果你是着手建立一种全新细胞的培养体系，根本找不到任何参考，那你就得花点时间自己试验了。万事开头难嘛。因为没有一个是标准答案。在 MEM 中培养的细胞，很可能在 DMEM 或 M199 中同样很容易生长。总之，首选 MEM 做贴壁细胞培养、RPMI 1640 做悬浮细胞培养会是一个好的开始。你也可以购买几种培养基来，然后花大约两周的时间做一

个简单的细胞生长实验，来选择其中最合适的。有时候你会惊讶地发现你的最佳培养条件与文献报道的不同，就算是同一种培养条件，细胞的生长状态也时好时坏，这是很正常的。因为试剂、水、不同批号的血清之间都存在着差异。要提高培养基的稳定性，可以从培养基和血清两方面入手。

以前大部分实验室都是用干粉培养基，但配制过程就较为繁琐，要溶解、调 pH 值，过滤，过程中可能会产生一些浓度误差，而且有些实验室的水质并不理想，所以培养的效果会有差异。如果使用液体培养基，这种人为的误差会减少，因为毕竟是大批量工业化生产的，批间差会很小。大家是不是感觉液体培养基会贵很多，以前是这样，但现在非也。HyClone 和 Invitrogen 都在国内建立了液体培养基的生产基地，生产和运输成本大幅降低，所以现在的价格也只是 50-60 元/500ml，比干粉培养基贵不了多少，而且还帮你省了过滤器和时间。

血清含有生长因子可促进细胞的繁殖，含有附着因子可促进细胞的贴壁，同时还具有抗胰酶活性。血清同时也是矿物质、脂类及激素的来源。最常用的血清有小牛血清、新生牛血清、胎牛血清和马血清等。牛血清是按照采血时间的早晚来分类的。采血时间越早，营养物质越丰富，所含抗体也越少，因而胎牛血清适合要求高的细胞系和克隆化培养。由于疯牛病的原因，到目前为止，我国政府仍然禁止从北美洲、欧洲和日本等地区进口牛血清，因此市面上的牛血清大多来自澳洲、南美洲，或是国产的。

而血清批次间的差别就是不可避免的，这种差异来源于不同的制备方法和除菌方法、动物的年龄差别及血清的储存条件等，而且与取

血动物的来源关系密切。不同的牧场、不同的气候天气及其他环境因素都可能影响血清的质量。因此选好了一种血清就要尽可能长期使用它。在需要更换时，也要尽量保持与原有的一批血清相似。现在很多公司都提供血清预留，你一旦选定了某个批次的血清，最好备足一年的量，这样可以避免很多麻烦。

血清固然是细胞培养中不可或缺的成分，但正如上文所说，血清的批间差异大，更换血清时需要做大量的测试以取保替换的血清与原来的相似。而血清的供应也是必须要考虑的因素。由于气候或疯牛病的影响，说不定哪天血清就突然没得卖了，那对实验的影响可非同小可。另外，血清的价格也很昂贵，虽说现在也有便宜的国产血清，但是高品质的澳洲血清价格仍旧高企。因此，也有一些实验室开始换用无血清培养基。

无血清培养基（Serum-Free Media），通常以 SFM 表示，顾名思义，就是在细胞培养中不需要添加血清，但是在某些应用中可能要添加生长因子或细胞因子。无血清培养基中添加了血清的主要成分：粘附因子、生长因子、必需的营养物质和激素等，能减少上述血清带来的不利因素，使细胞培养的条件更稳定。但它也不是完美的，从有血清培养过渡到无血清培养的条件并不像想象中那么直截了当。处于发育的不同分化阶段的细胞（例如干细胞与定向前体细胞相比）需要不同的配方，对生长因子和细胞因子的选择尤为重要。而且在去除血清的同时，也去除了一些血清蛋白具有的保护、解毒作用，因此对试剂、水的纯度和仪器清洁度的要求更高。另外，它的价格也比普通的培养基贵很多。

现在有很多厂家生产无血清培养基。GIBCO 这个细胞培养的金字招牌当然少不

了，它也是最早研制无血清培养基的。目前已经开发了 ES 细胞、杂交瘤、CHO、293、昆虫细胞、神经细胞、淋巴细胞、角质细胞、内皮细胞等多种细胞的无血清培养基。上个月还推出了首个间充质干细胞的无血清培养基，能使 MSC 维持未分化状态超过 9 代。HyClone 公司也有 CHO、293、杂交瘤细胞、昆虫细胞、病毒疫苗细胞的多种无血清培养基。

Sigma 则刚刚收购了澳大利亚 JRH 公司，有了 JRH 的 EX-CELL 系列，无血清培养基的选择也更多了。

这么多种，要选择起来也是个头疼的事情。除了部分培养基是公开配方的，如用于培养内皮细胞的 MCDB 131 (Sigma)，大部分液体培养基都是专利配方的，也就是说其中的成分是保密的。那么您只能是检索文献、让供应商推荐，然后用自己的细胞做几次传代培养来选出最合适的培养基。毕竟实践出真知嘛。

P.S.附上一些细胞培养中的小 Tip，可能会对您有所启发。（部分摘自 Invitrogen 的中文 Focus）

- 切记，细胞培养基的储存条件是 2-8 摄氏度。如果细胞培养基不小心被冻，您应该融化培养基并观察是否有沉淀产生。如果没有沉淀产生，培养基可以正常使用，如果出现沉淀，只能丢弃这些培养基。

- 贮存在冰箱中的瓶口已开的培养基，可能在放置几天后颜色变紫。这主要是由于在暴露到周围的 CO₂ 水平时，碳酸氢钠导致了 pH 值的上升。您可以在使用前松开瓶口，在 CO₂ 培养箱孵育培养基 10-15 分钟，来校正溶液的 pH 值（确定松开瓶口以保证气体交换）。

- 当在无血清培养基中添加抗生素时，降低至少在有血清培养基中所使用浓度的

50%。血清蛋白会结合和灭活一些抗生素。

在无血清培养条件下，抗生素不被灭活，可能对于细胞达到毒性水平。

- 一旦您在新鲜培养基中添加了血清和抗生素时，您应该在两到三周内使用它。因为一些抗生素和血清中的基本成分在解冻后就开始降解。

- 总之，大部分添加物和试剂最多可以冻融 3 次，如果次数更多都会在包含蛋白的溶液引起一定水平的降解和沉淀，将会影响它的性能。

- 血清的热灭活在免疫分析时可以灭活补体系统。在免疫学研究，培养 ES 细胞，昆虫细胞和平滑肌细胞时，推荐使用热灭活血清。热灭活是以往公认的操作步骤，并没有确凿的证据说明这样做是有益的。相反，对大部分细胞而言，GIBCO 和 HyClone 都不推荐热灭活血清。因为加热可能使血清中的沉淀增加，使您误以为污染。

- 如何避免血清中沉淀物的产生？

1. 解冻血清时，请按照所建议的逐步解冻法(-20℃至 4℃至室温)，若血清解冻时改变的温度太大(如-20℃至 37℃)，实验显示非常容易产生沉淀物。并随时将之摇晃均匀，使温度及成分均一，减少沉淀的发生。

2. 请勿将血清置于 37℃ 太久。若在 37℃ 放置太久，血清会变得混浊，同时血清中许多较不稳定的成分也会因此受到损害，而影响血清的质量。

3. 血清的热灭活非常容易造成沉淀物的增多，若非必要，可以无须做此步骤。

4. 若必须做血清的热灭活，请遵守 56℃，30 分钟的原则，并且随时摇晃均匀。温度过

高, 时间过久或摇晃不均匀, 都会造成沉淀物的增多。

- 在进行传代培养时, 我们强烈推荐进行台盼兰活性记数。研究者常常通过一个简单的稀释 (1:4 或 1:2) 进行传代, 不进行活性检测, 您可能接种比你认为的低的多的浓度的细胞, 这常常可能导致生长缓慢或培养物根本不生长。

- 贮存在 4℃ 冰箱中的液体胰蛋白酶溶液只能使用一周。胰蛋白酶在 4℃ 就可能开始降解, 如果在室温下放置超过 30 分钟, 就会变得不稳定。

- 在订购的细胞到达后, 应立即复苏, 如果培养基还没有准备好, 可将其放入液氮中, 尽快复苏。千万不能放置在 -20 或 -80℃ 的冰箱内。

- 细胞复苏往往是比较容易出问题的步骤。请在订购细胞时就向供应商索取详细的复苏步骤, 并仔细阅读。有些供应商就不推荐在复苏时离心, 对此类细节, 应特别留意。

国内外的主要细胞库:

ATCC (细胞株及胚胎干细胞库)

1) 下载细胞库目录:

<http://www.atcc.org/pdf/tcl.pdf>

2) 查询细胞株:

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfm>

3) 胚胎干细胞库:

<http://stemcells.atcc.org/products/cells.cfm>

ECACC (European Collection of Cell Cultures)

<http://www.ecacc.org.uk/>

中国科学院上海细胞库/干细胞库

<http://www.cellbank.org.cn/>

中国典型培养物保藏中心(也称武汉大学保藏中心)

<http://sub.whu.edu.cn/cctcc/>

中国医学科学院基础医学研究所细胞中心 (协和细胞库)

<http://sbm.pumc.edu.cn/xibaozhongxin/index.htm>

(生物通 余亮)