

细胞培养基基础知识培训

大连美仑生物技术有限公司

2020年4月



1

细胞培养概述

2

细胞培养所需设备与培养用液

3

培养细胞的生物学特征

4

原代培养与传代培养、冻存与复苏

5

细胞培养常见问题及解决方法

A microscopic view of several spherical cells, likely fibroblasts or epithelial cells, in a blue-tinted environment. The cells are out of focus, with one in the foreground being sharper. A diagonal line separates this image from the white background on the right.

1

细胞培养概述

1. 细胞培养的基本概念
2. 细胞培养目的与用途
3. 体外培养细胞的条件模拟

一. 细胞培养的基本概念

细胞培养(cell culture)

是指从动物体内取出细胞或者组织，模拟体内的生理环境，在无菌、适温和丰富的营养条件下，使离体细胞或者组织生存、生长并维持结构和功能的一门技术。

In Vitro



二. 细胞培养目的与用途

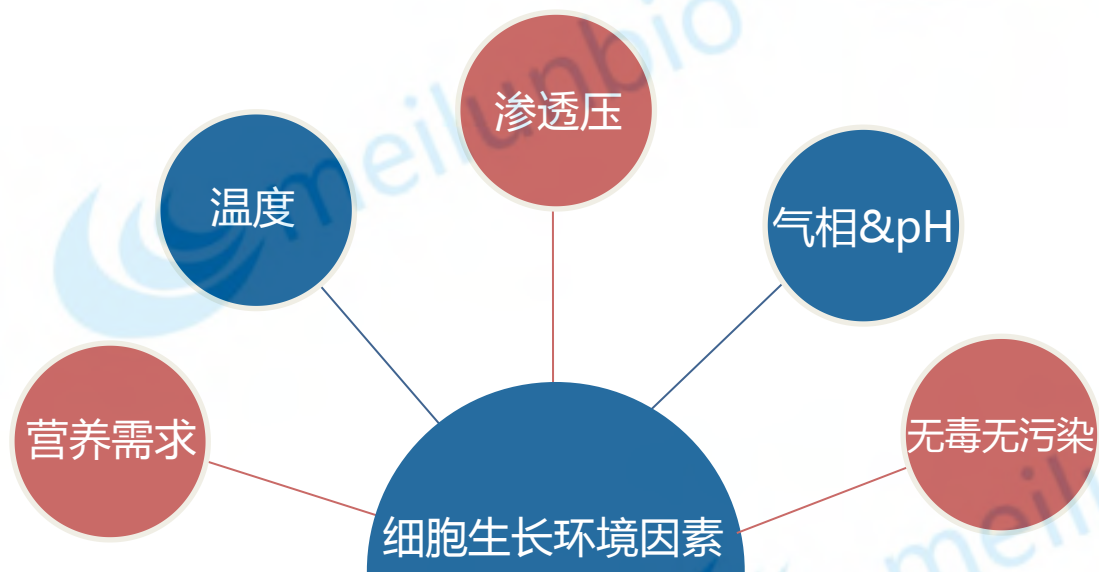
1. 科学研究

- (1) 药物研究开发，如新药筛选，疫苗、基因工程药物、细胞工程药物研究与开发、单克隆抗体制备等。
- (2) 基础研究，如药物作用机理、基因功能、疾病发生机理等研究。

2. 生物制药

- (1) 疫苗生产：如病毒性疫苗(肝炎病毒疫苗、艾滋病疫苗等)，多肽疫苗(肿瘤疫苗)等。
- (2) 基因工程药物生产：如EPO等。
- (3) 抗体药物、基因治疗药物生产。
- (4) 细胞工程药物生产：生物细胞内的一些生物活性多肽，生物活性物质等。
- (5) 利用细胞法体外测定生物活性物质的活性；并预测其在体内的药效和替代体内法检测其成品的生物活性。

三. 体外培养细胞的环境模拟



三. 体外培养细胞的环境模拟

营养成分

氨基酸 12种必需氨基酸；非必需氨基酸(谷氨酰胺)

碳水化合物（糖类） 葡萄糖；半乳糖

无机盐 钠、钾、镁、磷、钙等

维生素 生物素、叶酸、烟酰胺、核黄素、维生素C、维生素B12、吡哆醇等

蛋白质与肽 白蛋白、抑肽酶、胎球蛋白、纤粘连蛋白、转铁蛋白、生长因子。来自血清

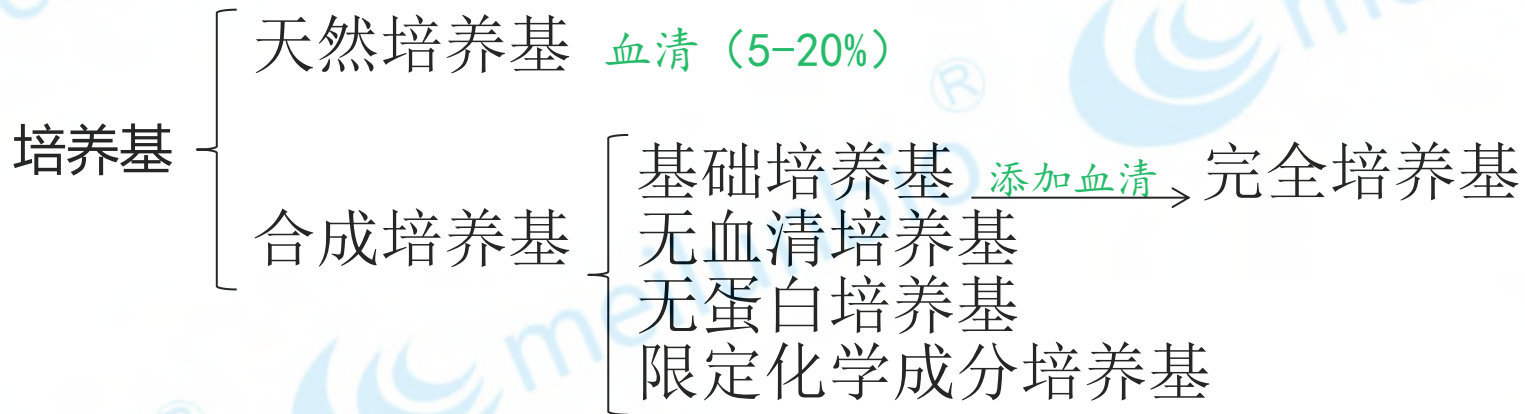
脂肪酸和脂类物质 胆固醇等。来自血清

微量元素 锌、铜、硒。常被添加给无血清培养基

营养需求

细胞生长环境因素

三. 体外培养细胞的环境模拟



营养需求

细胞生长环境因素

三. 体外培养细胞的环境模拟

血清是一个包含大量蛋白以及各种生长因子、激素、氨基酸、糖、胰蛋白酶抑制剂、脂类、无机盐、微量元素等的非常复杂的混合物。

无血清培养基是通过人为添加血清的类似成分来代替血清，使成分明确；

无蛋白培养基使无血清培养基的升级版，通过添加植物水解物来代替蛋白，用于各种疫苗、看题、细胞因子等的生产；

限定化学成分培养基是用小分子化合物取代了植物水解物，主要用于细胞分泌产物的研究。



营养需求

细胞生长环境因素

三. 体外培养细胞的环境模拟

- 不同生物来源的组织细胞培养温度不同；
体外培养动物细胞最常用的温度是37℃。
- 耐低温不耐高温！
在生理温度范围内，温度与细胞生长率之间存在正相关关系。

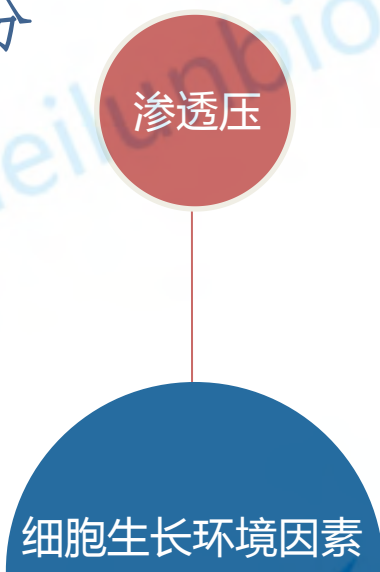
温度

细胞生长环境因素

三. 体外培养细胞的环境模拟

- 渗透压的大小主要由培养基中各种盐成分的浓度决定。

- 维持培养箱一个高湿的环境至关重要。



三. 体外培养细胞的环境模拟

开放式培养

气相：体外细胞培养的气相环境常由5%CO₂与95%空气构成。

- O₂参与细胞的能量代谢过程
- CO₂用于维持培养液的酸碱度

pH：适宜大多数细胞生长的培养基pH：7.0~7.4

- CO₂-碳酸氢盐缓冲体系
- 有机缓冲体系(如HEPES)

气相&pH

细胞生长环境因素

三. 体外培养细胞的环境模拟

防止：有毒化学物质污染、微生物污染、不同细胞间交叉污染

- 细菌→青霉素 (25-100ug/ml) 链霉素 (25-100ug/ml)
- 庆大霉素 (10-100ug/ml)
- 真菌→抗真菌制剂 (如：两性霉素B)
- 支原体→严格无菌、防止交叉污染 (支原体预防清除试剂)

细胞生长环境因素

无毒无污染

前提条件！！



2

细胞培养所需设备与培养用液

-
1. 细胞间设备
 2. 细胞培养用液

一. 细胞间设备

1. 最常用的必备装置和仪器

超净工作台、CO₂培养箱、倒置显微镜、离心机、冰箱、恒温水浴箱、冷冻保存装置（液氮罐）、细胞计数仪、移液器等



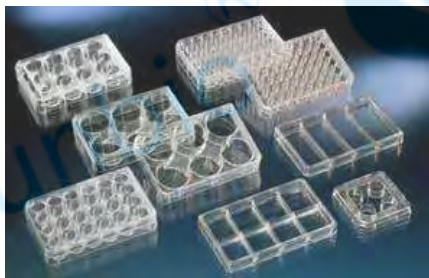
一. 细胞间设备

2. 最常用的培养器具

1. **过滤除菌装置：** 不锈钢正压过滤器、一次性滤器

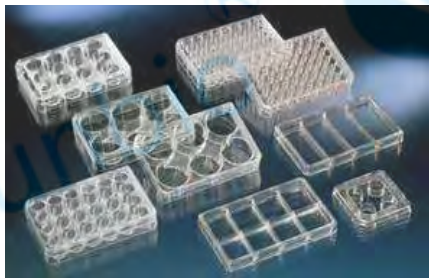
2. **手术器械：** 镊子、解剖剪等

3. **培养器皿：** { 培养瓶： T25、T75、T175等
培养皿： 30mm、60mm、90mm等
多孔培养板： 6、12、24、48、96孔
溶液瓶、移液管和吸管、离心管等



一. 细胞间设备

- 培养皿一般用来做原代培养和多皿培养，方便操作，且细胞会长的更均匀一些；
- 培养瓶相对于皿来说更安全，更不容易染菌，比较适合大规模培养和珍贵细胞的培养。



二. 细胞培养用液

90%基础培养基+10%血清+1%青链霉素

平衡盐溶液：用于洗涤组织、细胞等。 **PBS、Hank's、D-Hank's**

培养基

天然培养基：**血清**

合成培养基：

基础培养基

无血清培养基

无蛋白培养基

限定化学成分培养基

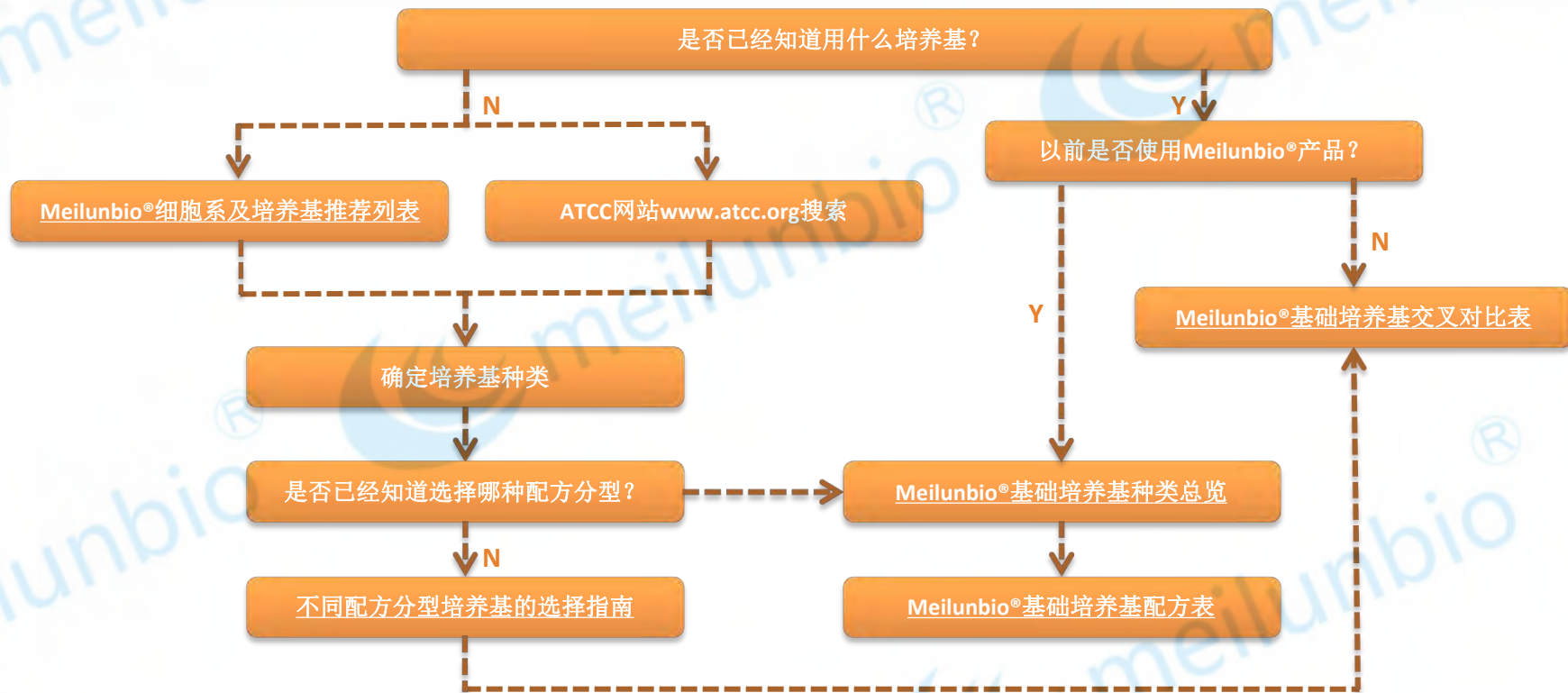
其他培养用液：消化液（**胰酶、胰酶-EDTA**）、谷氨酰胺补充液、
pH调整液（**NaHCO₃、HEPES**）、抗生素液（**青链霉素**）

细胞基础培养基

Cell Basal Medium



Meilunbio®货号	名称
MA0212	DMEM高糖培养基(含L-谷氨酰胺, 丙酮酸钠110mg/L;不含HEPES,双抗)
MA0213	DMEM低糖, 含L-谷氨酰胺,110MG/L丙酮酸钠; 不含HEPES, 双抗
MA0581	DMEM无糖(含L-谷氨酰胺, 丙酮酸钠; 不含HEPES, 双抗)
MA0214	DMEM/F-12培养基(含L-谷氨酰胺,丙酮酸钠,15mM HEPES)
MA0215	RPMI1640溶液含L-谷氨酰胺;不含丙酮酸钠, HEPES,双抗
MA0216	α -MEM培养基;含Nucleosides
MA0217	MEM,培养基,with NEAA
MA0229	Ham's F-12培养基 (with L-glutamine)
MA0230	Ham's F-12K培养基 (with L-glutamine)
MA0231	IMDM培养基 (with L-glutamine)
MA0314	McCOY's 5A培养基(with L-glutamine)
MA0314	Leibovitz's L-15



*请参考Meilunbio®细胞培养产品选择指南

二. 细胞培养用液

细胞培养中血清的主要作用？

- (1) 提供基本营养物质；
- (2) 提供贴壁和扩展因子；
- (3) 提供激素及各种生长因子；
- (4) 提供结合蛋白；
- (5) 对培养中的细胞提供某些保护作用。

血清

胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)
新生牛血清(newborn calf serum,NCS)
小牛血清(calf serum,CS)
马血清、猪血清、人血清

二. 细胞培养用液

■ 血清的使用与储存

(1) 使用前的处理：血清在使用前通常在 56°C 加热30分钟，这一过程称为灭活。

热灭活目的：灭活血清中的补体成分。

对于一些品质高的胎牛血清和新生牛血清可以考虑不经灭活直接用于细胞培养。

二. 细胞培养用液

(2) 储存条件:

- 血清一般储存于 -20°C , 同时应避免反复冻融
- 大包装的血清, 首先将血清灭活处理, 然后分装为小包装, 如10ml、20ml、50ml, 储存于 -20°C , 使用前融化。
- 融化后的血清在 4°C 不宜长时间存放, 应尽快使用。

二. 细胞培养用液

■ 血清中的沉淀物

- 絮状物：血清中的脂蛋白变性及解冻后血清中纤维蛋白析出造成，这些絮状物不会影响血清本身的质量。可用离心**3000rpm, 5**分钟去除，也可不用处理。

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、促生长因子和激素、酶抑制剂、结合蛋白、转运蛋白和微量元素**等, 能减少血清带来的不利因素, 使细胞培养的条件更安全稳定。

目前已经开发了**ES细胞、MSC细胞、杂交瘤细胞、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。

无血清培养基被广泛的应用于培养哺乳动物细胞, 以制备单克隆抗体、病毒抗原和重组蛋白等, 并在干细胞研究中起着重要作用。无血清培养是未来细胞培养的趋势。