

3

培养细胞的生物学特征

1. 培养细胞的形态学特征
2. 培养细胞的生长特征
3. 体外培养细胞的生长过程

一. 培养细胞的形态学特征

根据细胞的生长是否需要贴附在支持物上，可将其分为**贴附型**和**悬浮型**两大类。

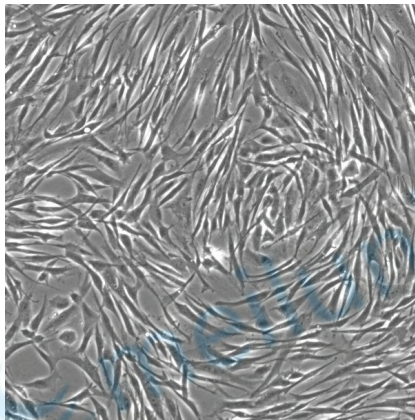
一. 培养细胞的形态学特征

1. 贴附型

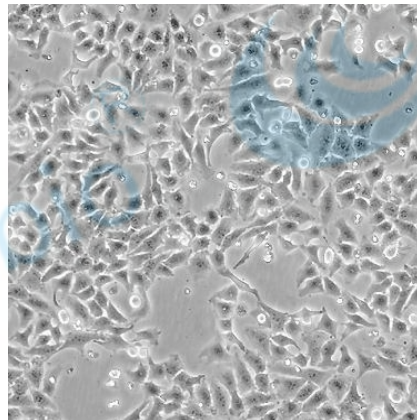
大多数培养细胞贴附生长，属于贴壁依赖性细胞。贴附型细胞只能附着于底物(支持物)表面生长，当细胞贴附在支持物上之后，易失去它们在体内时原有的特征，细胞分化现象常变得不显著。在光学显微镜下可将体外培养的贴附型细胞从形态上分为成纤维型细胞、上皮型细胞、游走型细胞、多形型细胞。

一. 培养细胞的形态学特征

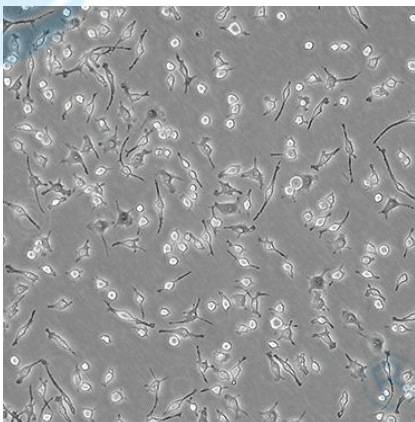
成纤维型细胞



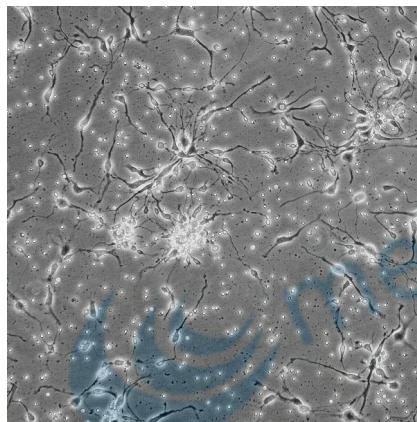
上皮型细胞



游走型细胞



多形型细胞



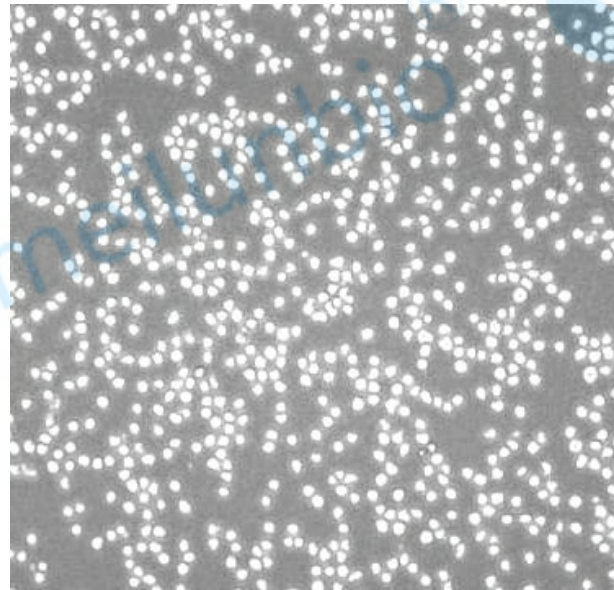
一. 培养细胞的形态学特征

2. 悬浮型

有的细胞在培养时不贴的支持物上，而是悬浮在液体中，呈悬浮状态生长，如某些肿瘤细胞和血液白细胞等，常见的如HL-60、Jurkat、K562。细胞悬浮生长时胞体呈**圆球形**。细胞悬浮培养的优点是细胞悬浮在培养液中生长，生存空间大，生长时间长，能繁殖出大量细胞，传代方便，便于做细胞代谢等方面的研究。

一. 培养细胞的形态学特征

2. 悬浮型



一. 培养细胞的形态学特征

小结

体外培养细胞的生长类型

粘附型细胞

上皮型细胞

成纤维型细胞

游走型细胞

多形型细胞

悬浮型细胞：血细胞以及某些肿瘤细胞

二. 培养细胞的生长特征

贴附伸展

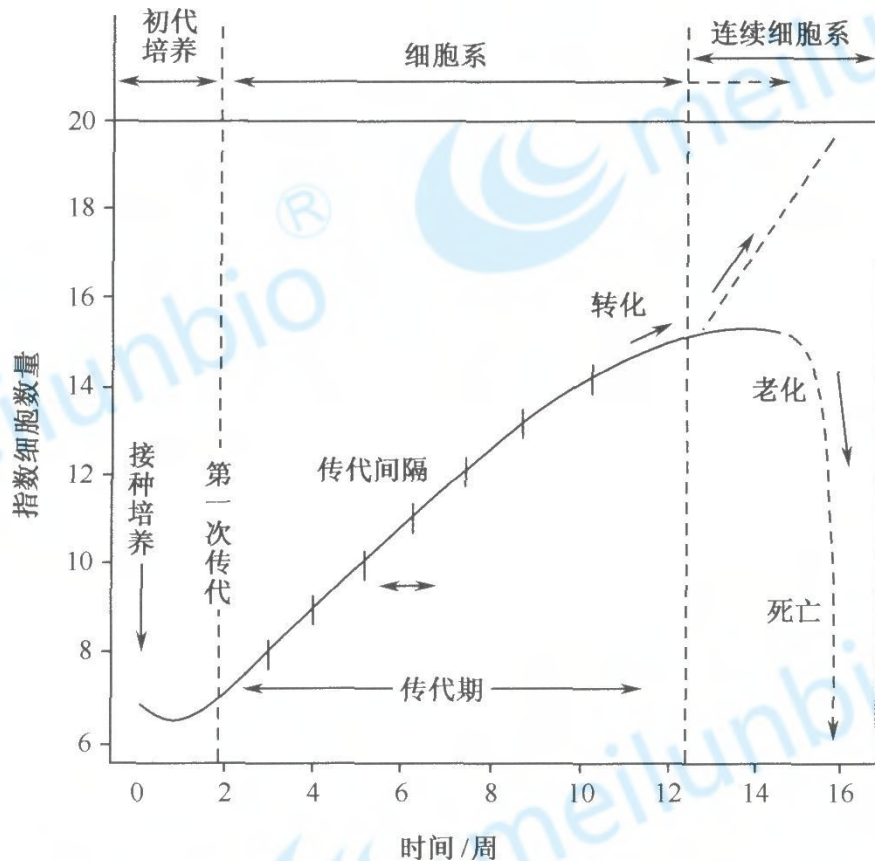
增加贴壁：TC处理；明胶或多聚赖氨酸或鼠尾胶原

接触抑制

密度抑制

三. 体外培养细胞的生长过程

原代培养期
传代期
衰退期



体外培养细胞的整个生命活动过程

三. 体外培养细胞的生长过程

1. 原代培养期

原代培养期也称初代培养期，指从体内取出组织、器官或细胞开始培养到第一次传代前的这一阶段。一般持续1~3周。

2. 传代培养期

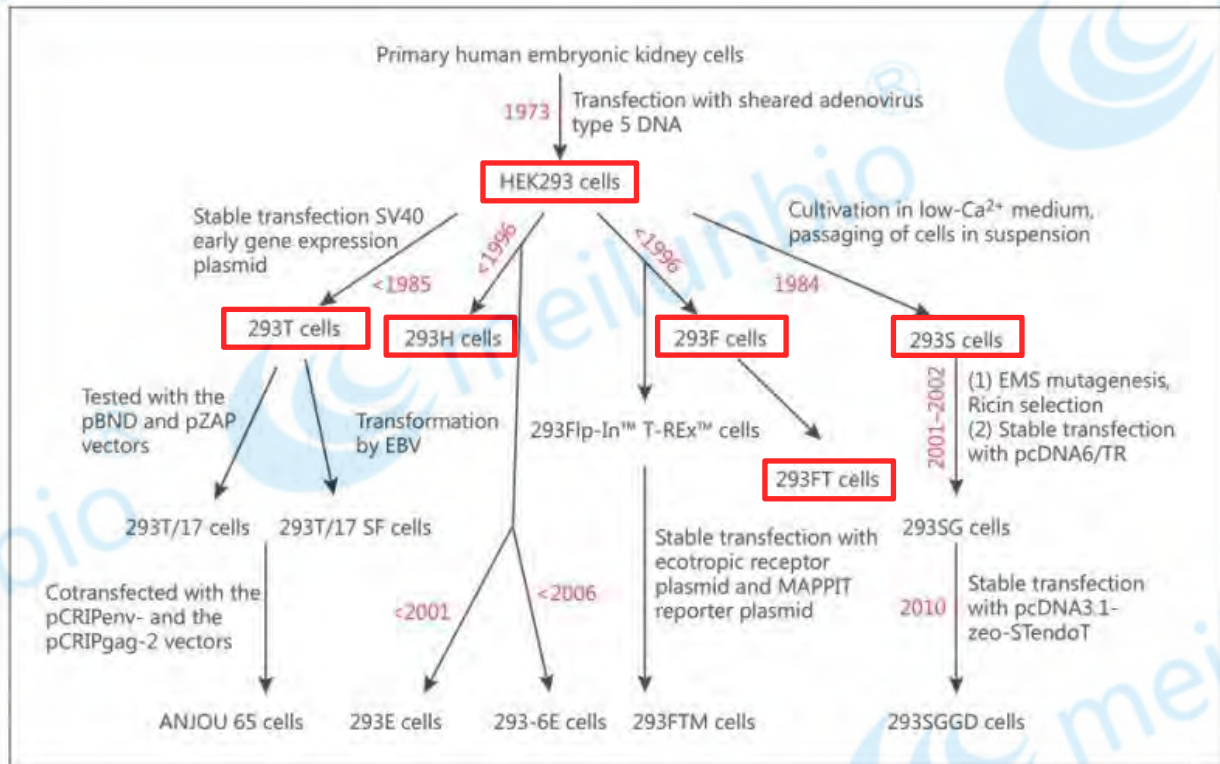
当原代培养的细胞达到一定程度，将原代培养物分别接种到两个或两个以上的器皿内进行培养，培养过程进入了传代培养期。传代培养期是整个细胞培养过程的主要时期，持续时间长。在传代培养期内，需要进行多次的传代。根据每一次传代培养的细胞生长变化的过程，习惯上把每一代细胞的生长过程分为**潜伏期**、**指数生长期**、**平台期**三个阶段。

原代培养物经首次传代成功即称为**细胞系 (Cell Line)**，因此细胞系可泛指一般可能传代的细胞。

其中能够连续传代的细胞叫做连续细胞系或无限细胞系，不能连续培养的称为**有限细胞系 (Finite Cell Line)**。大多数二倍体细胞为有限细胞系。

已获无限繁殖能力的细胞系，称**连续或无限细胞系 (Infinite Cell Line)**。无限细胞系大多具异倍体核型，可能成为恶性细胞，因此本质上已是发生转化的细胞系。无限细胞系有的只有永生性（不死性），但仍保留接触抑制和无异体接种致死；有的有永生性，异体接种有致瘤性，说明已恶性化。

通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得具有特殊性质或标志物的培养物称为**细胞株 (Cell Strain)**。细胞株的特殊性质或标志必须在整个培养期间始终存在。



HEK293细胞系



4

原代培养与传代培养、 冻存与复苏

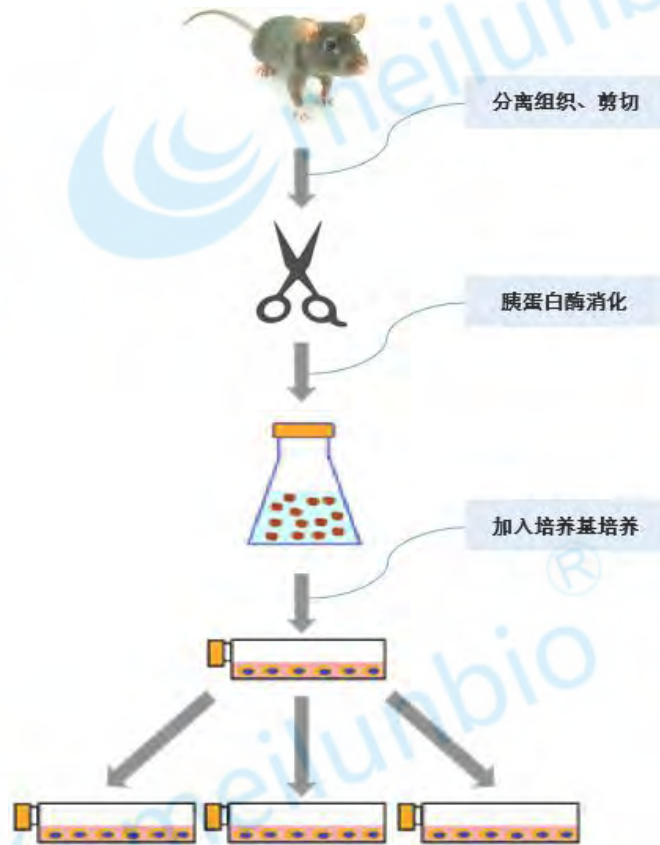
1. 原代培养
2. 传代培养
3. 细胞冻存
4. 细胞复苏

一. 原代培养

概念：取自体内新鲜组织并置于体外条件下生长的细胞在传代之前称为原代培养。

意义：

1. 利用原代培养做各种实验，如药物测试、细胞分化及病毒方面的试验效果很好。
2. 原代培养也是建立各种细胞系（株）必须经过的阶段。



原代培养步骤【以人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 为例】

1 材料

1.1 取材

新鲜脐带(无菌的广口瓶，内装预冷的PBS，并加上200 U/ml 青链霉素)，产后4 h 内最佳，一定不要超过24 h，实验前保存在4°C冰箱中。

1.2 试剂

0.1%的I型胶原酶(用培养基配成，如DMEM)；培养液(DMEM、50 μ g/ml ECGF、20%胎牛血清、100 U/ml青链霉素、2 mM谷氨酰胺、100 U/ml肝素钠)，也可以选择其它的生长因子。平衡盐液(生理盐水或者PBS或者D-hank's)；1%明胶。

1.3 器械

烧杯(脐带数 + 2)、止血钳(脐带数 \times 2 + 2)、镊子2 把、手术直剪(脐带数 \times 1)、12号粗针头(去尖，打磨光滑，脐带数 \times 1)、玻璃培养皿。

原代培养步骤【以人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 为例】

2 方法

2.1 明胶包被培养瓶过夜，取出明胶，用2 ml培养液(含10%血清的普通培养液)冲洗培养瓶一遍，放置超净台中。

2.2 将取出的新鲜脐带放在盛有含双抗PBS 的玻璃培养皿中，洗净脐带表面的残留血液，将脐带两端各剪去一部分；更换一个新的玻璃培养皿，辨别脐带静脉(粗大的那根)，顺着静脉插入大针头，注入含双抗PBS，充分冲洗脐静脉，至流出液体中无可见血液；再更换一个培养皿，加少许PBS，把脐带放在培养皿中，从针头打入胶原酶(37°C预温)，当胶原酶从另一头流出少许的时候，用止血钳夹闭，继续注入胶原酶使脐带充盈后也封闭，37°C消化15 min(室温30°C 20 min)。消化结束后收集所有消化液，吸取PBS 冲洗脐带，合并到消化液中，1000 rpm 离心5 min，弃上清，加入4 ml 培养液悬浮细胞，接种到明胶包被的塑料培养瓶中，12-24 h 后换液一次。一般一根脐带消化下来的细胞可以培养一个培养瓶，如果细胞少就六孔板一个孔，细胞不能太稀疏，否则生长缓慢。

2.3 3-4 天长满后用胰酶(含EDTA)消化以1:2 传代时。实验中使用2-5 代细胞。

二. 传代培养

- 细胞“一代”指从细胞接种到分离再培养的一段期间，与细胞世代或倍增不同。在一代中，细胞倍增3~6次
- 离体培养的细胞群体增殖达到一定密度时，细胞的生长和分裂速度就会减慢甚至停止，如不及时分离传代培养，细胞将逐渐衰老死亡。

传代培养操作步骤：

1. 悬浮生长细胞传代

- ❖ 换液法：提前37°C温浴完全培养基。轻轻混匀细胞培养瓶中细胞悬液，通过上下吹打使小细胞团分散，从中取样、计数。根据细胞密度将细胞悬液平分至几个新的培养瓶中，使每瓶细胞密度达到参考传代密度，并补足新鲜的完全培养基，轻轻混匀，放入细胞培养箱中培养，直到细胞密度再次达到传代要求，再进行下一次传代。
- ❖ 离心法：将培养瓶中的细胞悬液全部转移至离心管中，250×g离心3-5min，离心后弃上清，向管底沉淀中加入适量新鲜的完全培养基吹打、重悬。根据细胞密度将细胞悬液平分至几个新的培养瓶中，使每瓶细胞密度达到参考传代密度，并补足新鲜的完全培养基，轻轻混匀，放入细胞培养箱中培养，直到细胞密度再次达到传代要求，再进行下一次传代。

传代培养操作步骤：

2. 半贴壁细胞传代

- ❖ 若悬浮细胞较多且折光率良好，可离心收集，继续培养；若有少量细胞悬浮，也可不用收集，传代操作按贴壁细胞操作流程处理；若悬浮细胞较多，离心收集，原瓶中贴壁细胞按照贴壁细胞操作流程进行处理，并与之前收集的悬浮细胞混悬，分瓶培养。
- ❖ 收集悬浮部分细胞：将培养瓶中的培养基全部转移至离心管中， $250\times g$ 离心3-5min，离心后弃上清，向管底沉淀中加入适量完全培养基吹打、重悬。待贴壁部分细胞收集好后混悬，分瓶培养。

传代培养操作步骤：

3. 贴壁细胞传代——酶消化传代法

- ❖ 当细胞密度达到80-90%时可进行传代，提前37°C温浴完全培养基和胰酶（0.25% Trypsin-EDTA）。
- ❖ 将旧培养基吸除，用PBS清洗两遍。
- ❖ 在培养瓶中加入少许胰酶，以能覆满瓶底为限。将培养瓶平置于培养箱中消化约1-2分钟，期间在显微镜下观察，一旦发现细胞质回缩，细胞间隙增大后，细胞变圆，比较松动后，立即终止消化（个别难消化细胞需要延长消化时间，但要避免消化过度）；
- ❖ 加入适量温浴好的完全培养基终止消化，轻轻吹打均匀细胞；
- ❖ 按照推荐传代比例将细胞悬液平分转入新的培养瓶中，补足温浴好的新鲜完全培养基，放入培养箱培养；
- ❖ 培养期间可参考推荐换液频率进行换液，直到细胞密度再次达到80-90%，再进行下一次传代。

三. 细胞冻存

★ 冻存和复苏的原则：慢冻快融

- ❖ 当细胞冷到零度以下，可以产生以下变化：细胞器脱水，细胞中可溶性物质浓度升高，并在细胞内形成冰晶。
- ❖ 如果缓慢冷冻，可使细胞逐步脱水，细胞内不致产生大的冰晶；相反，结晶就大，大结晶会造成细胞膜、细胞器的损伤和破裂。复苏过程应快融，目的是防止小冰晶形成大冰晶，即冰晶的重结晶。

三. 细胞冻存

冻存要点

- ◆ 传统冷冻过程要缓慢：

4℃ 10min → -20℃ 30min → -80℃ 16-18h（或过夜） → 液氮长期保存
或使用程序降温盒，每秒下降1℃

- ◆ 冻存细胞必须处在对数生长期，活力大于90%，无微生物污染。
- ◆ 细胞浓度控制在： $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7 / \text{ml}$ 。

传统细胞冷冻保存液

10%DMSO + 基础培养液 + 血清



比例可调整，细胞状态越好血清比例可越低，但不低于20%

表1：传统细胞冻存液和美仑无血清非程序细胞冻存液(无蛋白)的特点比较

	传统细胞冻存液	美仑无血清非程序细胞冻存液(无蛋白)
成分	基础培养基+血清+DMSO，血清成分复杂	化学组成明确，含有营养成分和保护剂，不含血清或其他蛋白成分
冻存液配制	现用现配	即用型，无需配制，4℃保存，即取即用
冻存操作方法	较复杂，需要程序性降温，操作时间长	简单快捷，直接放入-80℃即可，省时省力
复苏存活率	一般（微量冻存时细胞存活率低）	高（微量冻存时细胞存活率也高）
细胞保存设备	液氮	液氮或者-80℃低温冰箱
安全性	有动物来源病毒、霉菌和支原体等污染风险	无动物来源病毒、霉菌和支原体等污染风险
冻存细胞种类	适合含血清细胞冻存	适合各类细胞冻存，尤其是无血清驯化细胞，节省再驯化步骤
批次差异	批次差异大	批次差异极小
整板冻存	不可行	可行，且方便快捷

Meilunbio®无血清冻存液(MA0401)细胞冻存步骤：

【冻存前，请确保细胞处于对数生长期】

1. 贴壁细胞制备细胞悬液：（悬浮细胞请忽略此步骤）

(1) 将旧培养基吸除，用PBS清洗两遍。

(2) 在培养瓶中加入少许胰酶，以能覆满瓶底为限。将培养瓶平置于培养箱中消化约1~2分钟，期间在显微镜下观察，一旦发现细胞间隙增大、细胞变圆、比较松动后，立即终止消化（个别难消化细胞需要延长消化时间，但要避免消化过度）。

(3) 加入适量温浴好的完全培养基终止消化，轻轻吹打均匀细胞。

Meilunbio®无血清冻存液(MA0401)细胞冻存步骤：

2. 贴壁细胞和悬浮细胞的冻存：

(1) 取少量细胞悬液细胞计数，算出细胞总数和所需细胞冻存液的量。细胞的冻存密度以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml为宜。

(2) 将所需量的细胞悬液转移至适当离心管中， $200 \sim 500 \times g$ ，离心3-5分钟，弃上清收集细胞。（离心速度和时间取决于细胞类型）

(3) 向细胞沉淀中加入适量无血清非程序细胞冻存液，用移液器轻轻吹打以重悬细胞，分装于无菌细胞冻存管中，严密封口后，注明细胞名称、代数、日期。

(4) 直接置于 -80°C 冰箱中储存，细胞可至少保存一年；或者 -80°C 过夜后，次日将细胞投入液氮中长期储存。

四. 细胞复苏

步骤:

1. 自液氮罐或-80℃冰箱中取出冷冻管，检查盖子是否旋紧，立即放入37℃水浴中快速解冻（避免冰晶重新结晶而造成细胞死亡），轻摇冷冻管使其在1~2分钟内全部融化，以75%酒精擦拭冻存管外部，移入无菌操作台内。
2. 将解冻的细胞悬液移至15ml无菌离心管中，再加入5~10ml预热好的完全培养基，轻轻混合均匀，200~500×g，离心3-5分钟，弃上清收集细胞。（离心速度和时间取决于细胞类型）
3. 加入预热好的完全培养基，混合均匀，转移到细胞培养皿或培养瓶中，置于细胞培养箱中培养。



5

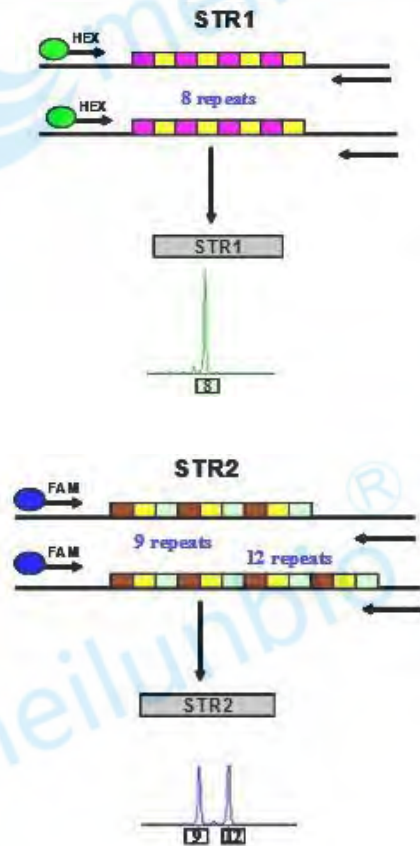
细胞培养常见问题及解决方法

1. STR鉴定的重要性
2. 新购买的细胞株接收后处理方法
3. 细胞培养中出现的黑点问题
4. 细胞污染的鉴别
5. 贴壁细胞悬浮
6. 细胞生长缓慢
7. 贴壁细胞生长不均匀

► 什么是STR？

STR (Short Tandem Repeat , 短串联重复序列) 基因位点由长度为3~7个碱基对的短串连重复序列组成，这些重复序列广泛存在于人类基因组中，可作为高度多态性标记，被称为细胞的DNA指纹。

STR基因座位上的等位基因可通过PCR扩增区域内重复序列的拷贝数的不同来区分，在毛细管电泳分离之后可通过荧光检测来识别，随后通过一定的计算方法，即可根据所得的STR分型结果与专业的细胞STR数据库比对从而推算出样品所属的细胞系或可能的交叉污染的细胞系名称。



➤ STR鉴定结果可说明的问题？

1. 是否为人源细胞
2. 是否为标准细胞系
3. 是否存在物种内交叉污染

Cell Authentication



➤ 为什么要进行STR鉴定？

据统计，约18%~30%细胞系被交叉污染或错误辨识，使用该细胞可能导致研究结论错误、结果不可重复、临床细胞治疗灾难性后果等。

2009年起，NIH和ATCC呼吁研究者对细胞进行STR鉴定并着手建立细胞STR数据库。如今，细胞STR鉴定已是鉴别细胞身份及交叉污染的金标准。多数权威期刊也要求作者投稿时提供细胞STR鉴定证明。《中国药典》中明确规定，新建细胞系/株、细胞库和生产终末细胞应进行鉴别试验，以确认为本细胞，且无其他细胞的交叉污染。

➤ 常温细胞

1. 处理细胞前，请仔细阅读说明书，了解细胞相关信息和细胞处理方法。请准备好需要用到的培养基和相关试剂，尽量避免因环境的不适应而造成细胞状态异常。
2. 收到细胞后，首先观察培养瓶是否完好，若发现培养瓶有破裂，培养基外溢、浑浊等现象，细胞可能被污染，请及时拍照并与我们联系。
3. 显微镜下观察细胞形态是否正常，对于贴壁细胞则要注意看贴壁情况是否良好，观察细胞密度，确认细胞无异常（由于运输原因，贴壁细胞会有少量细胞脱落，为正常现象）。
4. 用75%酒精对培养瓶表面进行消毒处理，将培养瓶置于细胞培养箱中静置培养3-4小时，以恢复细胞状态，如果细胞密度不高，建议过夜培养。
5. 静置完成后，取出培养瓶，对细胞进行镜检，拍照留档，方便后期对比。如发现细胞异常请及时与我们联系，如果三天内未与我们联系，则默认为收货良好，将不再提供补发的售后服务。
6. 若细胞密度超过80%，则可以根据以下提供的传代步骤进行传代；若细胞密度未达到80%，则先吸除原来培养瓶中大部分的培养基，留下5-10ml左右，稍微拧松瓶盖，继续放入细胞培养箱中培养，直到细胞密度超过80%时再进行传代。

➤ 冻存细胞

1. 处理细胞前，请仔细阅读说明书，了解细胞相关信息和细胞处理方法。请准备好需要用到的培养基和相关试剂，尽量避免因环境的不适应而造成细胞状态异常。
2. 收到细胞后，首先观察泡沫箱中干冰是否有剩余，冻存管是否完好，是否有解冻情况，若发现干冰完全汽化或冻存管有解冻现象，请及时拍照并与我们联系。如果三天内未与我们联系，则默认为收货良好，将不再提供补发的售后服务。
3. 若细胞冻存管正常，可以选择立即按照说明书步骤复苏细胞。或者立即冷冻保存（置于-80℃冰箱，隔夜放置后，移至液氮中保存），需要时再复苏即可。
4. 两支冻存管，建议客户使用时先复苏一支，另一支作为种子细胞长期冻存。若第一支复苏培养过程中遇到问题，请及时与我们联系，以便查找原因解决问题。

3. 细胞培养中出现黑点是污染吗？如何处理？

首先，肉眼观察培养基是否**混浊**，然后，在镜下观察培养细胞生长的状态，黑点是否**游动**。如果细胞被污染，微生物则会大量繁殖，培养基就会迅速变黄、变混浊，细胞死亡明显。这时属于细菌污染。

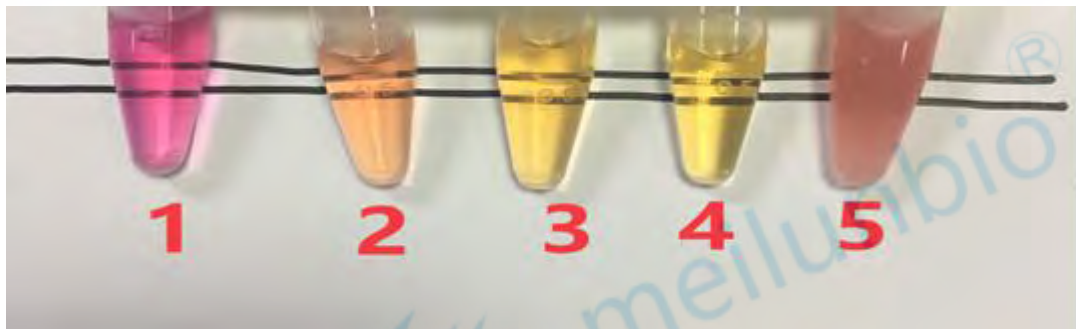
如果没有以上变化，在镜下观察细胞，与黑点出现前相比，没有明显变化，或细胞生长稍减慢，那么，黑点的出现可能与以下几种情况有关：

- (1) 细胞生长过密后开始老化，破碎的细胞残骸，同时释放出氨基酸，使培养基pH先下降后升高。离心传代去除碎片，同时掌握细胞传代的最佳时机，细胞切勿生长过密。
- (2) 血清质量不好，有析出，反复冻融的结果。选用高质量血清，避免反复冻融。
- (3) 培养基的pH偏高，不宜细胞生长，碎片和代谢物。培养基保持最佳PH值7.0- 7.4。
- (4) 配制培养基的水质、容器不合格。可应用离心、过滤的方法去除这些黑点。严格控制配制培养基的水质，容器定期刷洗。
- (5) 培养原代细胞中出现小黑点，可能是原代组织中的杂质。多次传代可以消除。

4. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

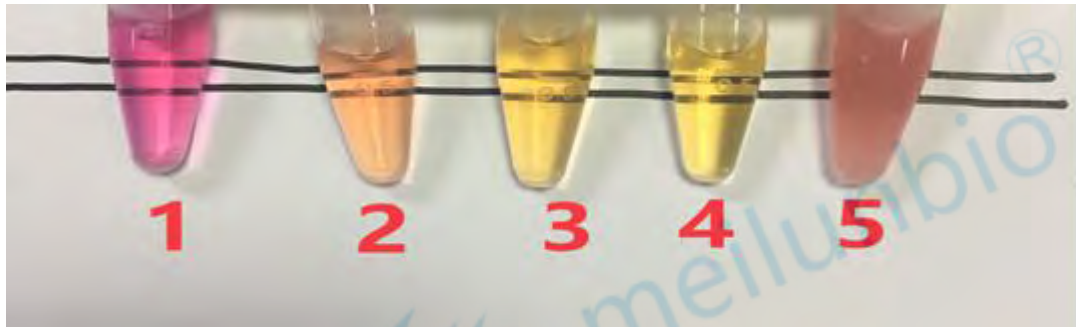
✓ **第一步**：从培养箱拿出细胞后观察细胞培养液的颜色。（以常用的 DMEM 基础培养液为例，一般使用 DMEM 配制的培养液的颜色为鲜红色，而且是澄清透亮的）



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

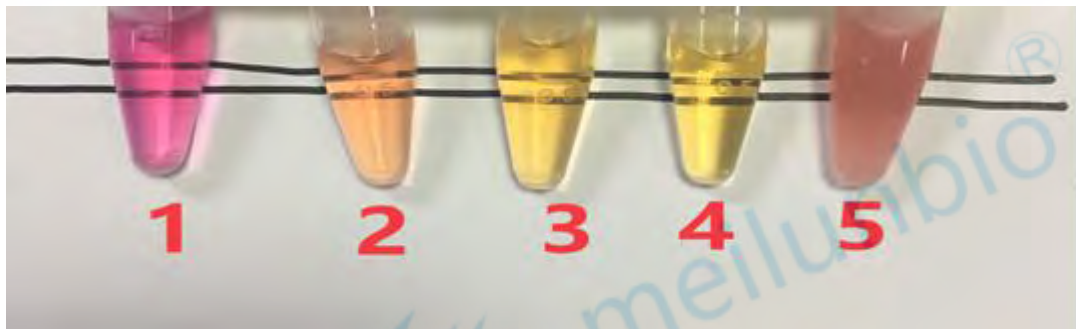
1 号管颜色偏紫一般原因是培养基 pH 升高导致。pH 升高原因主要有两个：一个是培养液在冰箱放置太久，培养液中的二氧化碳逸出；二个是培养箱二氧化碳不足，这时整个培养箱的细胞都会出现这样的颜色。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

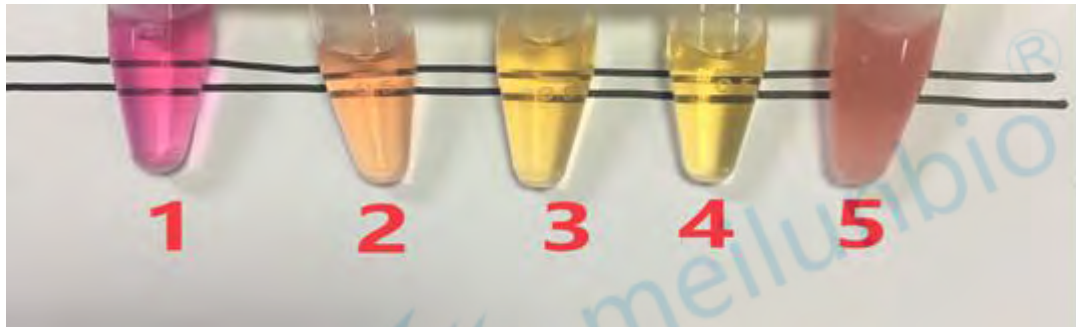
2 号管颜色有点偏橘，一般是细胞生长消耗了营养物质所导致的培养液 pH 稍微降低。这种颜色在培养过程中最常见，属于正常情况。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

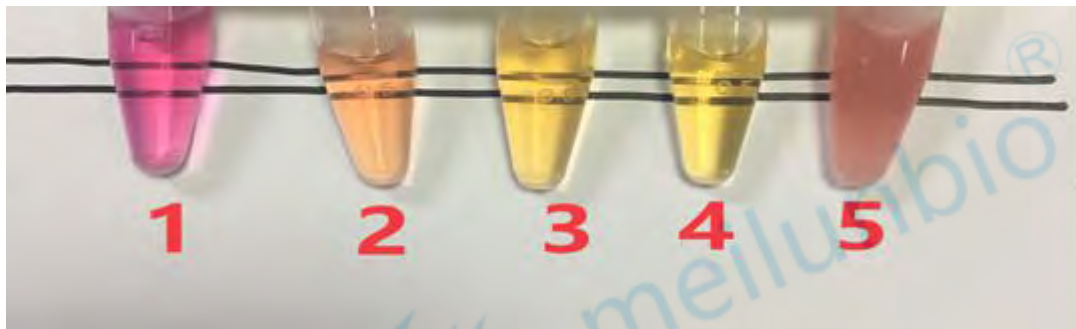
3 号和 4 号管颜色发黄，原因是培养液中的营养被大量消耗，细胞代谢产物增多，导致培养液 pH 降低，这个时候一般是细胞生长太快太满，提醒需要给细胞换液或者传代，但是有时细胞密度低生长速度缓慢也会出现这种情况，这时候就要怀疑是否是污染了，除了细胞以外有其他微生物在消耗着培养液的营养。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

5 号管培养液呈肉眼可见的浑浊，这种情况一般就是细菌污染，具体判断还需要结合镜下的特征。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

✓ **第二步**：显微镜下观察，看是否出现污染特征

2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

细菌污染

特征：培养液会变黄，而且是**浑浊的黄色**，镜下观察不到正常细胞形态，镜下遍布**细沙样的游动的黑点**。

细菌污染一定要及时查找原因，如果换液的细胞全部污染，就要怀疑是不是培养液污染，或者使用的器械污染；如果传代的细胞全部污染，也要怀疑培养液的问题，但是不要忽略了胰酶的问题。如果个别皿或瓶污染，有可能是一不小心蹭到或者枪头碰到非无菌区域。

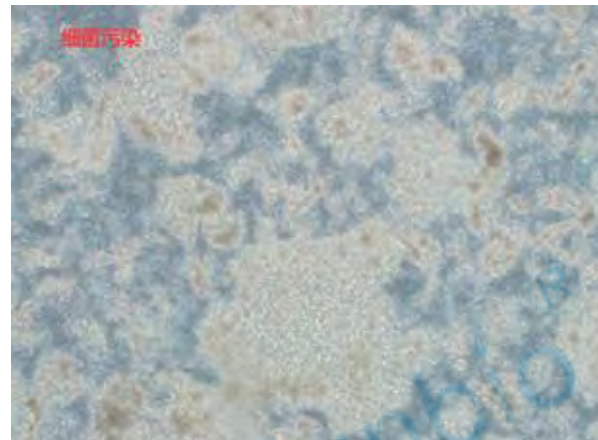
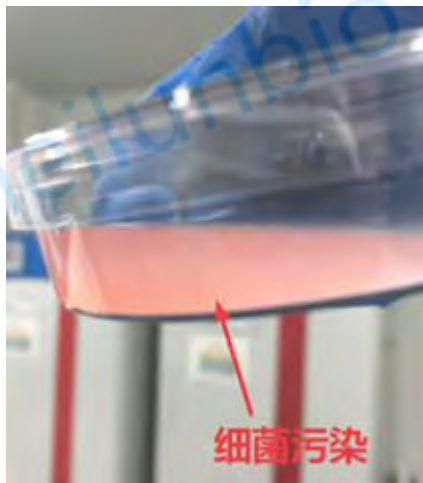
怀疑是胰酶或者是培养液的问题，可以空培养，取空皿只加入怀疑的胰酶或者培养液培养，第二天观察。

2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染



® 细菌污染



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

杆菌污染

特征：高倍镜下看到许多快速游动的杆状的细菌，培养液变浑浊，但颜色没有明显改变。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染



霉菌污染

特征：培养液不变浑浊但是会变黄，一般肉眼可见培养液中有团块的霉菌菌落，镜下呈细丝竹节管状，有菌丝结构。霉菌在雨季多见，一般霉菌污染应及时扔掉，彻底清洁培养箱。

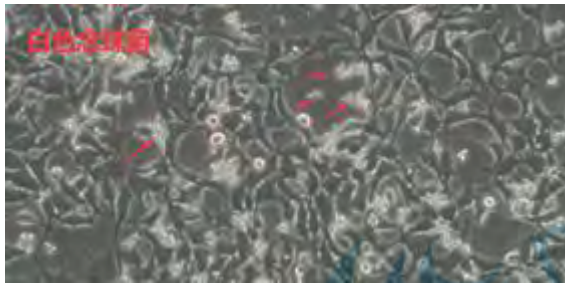


2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

白色念珠菌污染

特征：培养液颜色没有明显改变，污染严重会变黄，但是澄清的黄不变浑浊，镜下观察到好多像球形的亮点，多的话会聚集成葡萄串样。白色念珠菌污染不要抢救立马扔了，救也救不好，而且白色念珠菌会互相通过孢子传染。



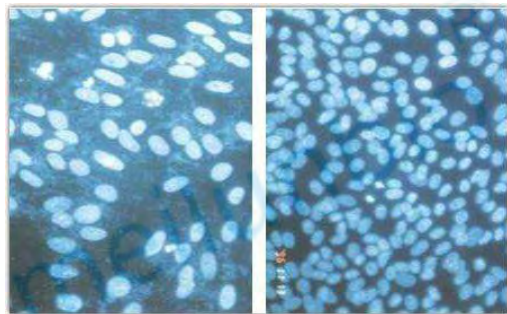
2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

支原体污染

特征：支原体污染的细胞通常无异常，严重污染时表现为细胞生长速度变慢，细胞形态改变，而且不断死亡，镜下看有时可见许多黑色的细胞碎片。检测支原体污染可以使用支原体检测试剂盒进行检测，确定后可用支原体清除试剂，同时培养的其他细胞可以加入支原体预防试剂，防止交叉感染。

不确定是不是支原体污染可以使用支原体清除试剂试一下，如果细胞状态明显改善，有可能就是支原体污染。



2. 细胞污染的鉴别

- 细菌污染
- 真菌污染
- 支原体污染
- 黑胶虫污染

黑胶虫污染

特征：一般认为是镜下许多黑点在不断布朗运动，刚开始对细胞没有明显影响，增多时会影响细胞的生长。

一般无法清除，只能弃掉。

现在主流认为黑胶虫是血清的问题，可以从新换一批次血清试一下。

细胞污染源的排查

- 无菌操作
- 细胞直接接触的培养用液和耗材（注意枪头倒吸问题）
- 细胞源
- 超净台无菌大环境

5. 贴壁细胞悬浮

某些贴壁细胞贴壁不牢，在运输或过程中或不小心中碰撞时会发生细胞脱落，请将培养瓶中所有培养液收集至离心管，离心（ $250 \times g/5\text{min}$ ），弃上清，加胰酶1-2ml，轻轻吹打，重悬细胞，培养箱中作用1-2min后，加3-6ml新鲜的完全培养基终止消化。再离心，弃上清，加1-3ml新鲜的完全培养基重悬。将重悬后细胞悬液转移至2个T25培养瓶（1:2传代），补充新鲜的完全培养基至8-10ml，然后常规静置培养。

6. 细胞生长缓慢

可以将培养基中血清浓度提高至12~15%，或者采用隔日换液的方法来保证细胞的状态和生长速度，需要耐心静置培养，请不要着急传代。

7. 贴壁细胞生长不均匀

在培养过程中若出现细胞分布明显不均时（即某一区域细胞已重叠生长，而旁边则为一块空白），重叠部分细胞会加速老化死亡，此时可将细胞进行充分消化，重新打散，贴壁，加入新鲜的完全培养基进行培养。