

## 悬浮细胞培养

### 1. 复苏

- 1.1 融化冻存的细胞悬液，与预热的完培混匀后4°C，300 g离心5 min，弃上清
- 1.2 重悬细胞，转移至合适的培养瓶中，放入培养箱

### 2. 换液

- 2.1 将细胞悬液连同培养基转移至离心管中，4°C，300 g离心5 min，弃上清
- 2.2 用预热的新鲜完全培养基重悬至原体积，并转移回原培养瓶继续培养

### 3. 传代

- 3.1 细胞悬液连同培养基转移至离心管中，4°C，300 g离心5 min，弃上清
- 3.2 用适量预热的新鲜完全培养基重悬细胞沉淀
- 3.3 根据需求，将细胞悬液分装至新的培养瓶中，并补充新鲜培养基至所需终体积

### 4. 计数

- 4.1 取少量细胞悬液，加入等体积0.4%台盼蓝染液，混匀，室温孵育1-3 min
- 4.2 取适量混合液滴加至血球计数板盖玻片边缘，让其自然充满计数室
- 4.3 在显微镜下（10×物镜）计数四个大方格内的细胞总数

### 5. 冻存

- 5.1 离心收集细胞（300 g，5 min），弃上清
- 5.2 用预冷的细胞冻存液重悬细胞至所需密度
- 5.3 分装至标记好的无菌冻存管中，按以下步骤冻存：4°C 30-60 min→-20°C 2 h→-80°C过夜→次日转移至液氮中长期保存

## 常见问题解析

### 1. 细胞聚集成团如何解决？

①优化摇速：逐步提高转速（每次+10 rpm）至聚团减少；②调整培养基：添加抗聚剂如Pluronic F-68（0.1% w/v）；③机械分散：每日轻柔吹打或使用筛网过滤；④检查渗透压（280-320mOsm/kg）。

### 2. 细胞生长缓慢可能原因？

①血清批间差：更换前需做生长曲线验证；②代谢废物积累：缩短传代间隔或增大培养体积；③支原体污染：定期进行PCR检测；④溶解氧不足：增大摇瓶通气量或降低接种密度。

### 3. 培养液突然变黄如何处理？

①立即检测细胞密度：若达平台期（ $>3 \times 10^6$  cells/mL）需即刻传代；②补充新鲜培养基：按1:1比例置换；③排查污染：涂片镜检或微生物培养。

### 4. 冻存后复苏存活率低怎么办？

①优化冻存程序：采用程序降温仪（ $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ ）；②使用高活力细胞：仅冻存对数生长期细胞；③快速操作：解冻后1 min内加入含血清培养基稀释DMSO。

## 参考文献

- [1]NI J. Oncolytic Vaccinia Virus Harboring Aphrocallistes vastus Lectin Inhibits the Growth of Cervical Cancer Cells Hela S3. *Mar Drugs*. 2021. 19(10).
- [2]JAHAN F. Using the Jurkat reporter T cell line for evaluating the functionality of novel chimeric antigen receptors. *Front Mol Med*. 2023, 3: 1070384.
- [3]NASCIMENTO C R. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem Biophys Rep*. 2022, 32: 101383.