贴壁细胞培养

1. 细胞复苏

1.1 超净台紫外灭菌30分钟，水浴锅预热至37℃。
1.2 冻存管在37℃水浴中快速融化，避免反复冻融。
1.3 将细胞悬液转移至含3 mL培养基的离心管，1000 rpm离心5分钟，弃上清。
1.4 用新鲜培养基重悬细胞，接种至培养皿，置于37℃、5%CO_2培养箱。

2.细胞传代

2.1 显微镜下观察细胞密度达70%～90%时进行传代。
2.2 吸弃旧培养基，加入预温PBS轻柔润洗2次，吸弃PBS后加入预温消化液，室温或37℃孵育，显微镜下观察细胞间隙增大，细胞逐渐变圆，边缘开始回缩，但仍有部分细胞相互连接，大部分细胞尚未漂浮时，即可加入含血清培养基终止消化。
2.3 吹打细胞悬液至单细胞状态，避免气泡损伤。按1：2或1：3比例分装至新培养皿，补充足量培养基。

3.培养基更换

3.1 倾斜培养瓶，移液器吸除培养液，需避免吸到贴壁细胞。
3.2 沿瓶壁缓慢加入预温的新鲜完全培养基，需避免直接冲击细胞层。

4.细胞冻存

4.1 同传代步骤，消化后离心重悬，调整细胞密度至5×10^5~1×10^6/mL。
4.2 将细胞悬液与预冷冻存液混合，分装至冻存管并标记信息。
4.3 冻存管放入程序降温盒先置于80℃冰箱缓慢降温，24小时后转移至液氮中长期保存。

常见问题解析

1. 细胞不贴壁怎么办？

①精准控制消化：缩短胰酶消化时间或降低其浓度，减少细胞膜蛋白受损。②严格排查污染：分离培养物，检测支原体，阳性则丢弃培养物并彻底消毒培养环境。③调整培养基状态：使用无菌碳酸氢钠溶液或充入无菌CO_2调整培养基pH值（7.2～7.4）。④优化血清质量：更换新批次血清，血清浓度可短期调整至15%。

2. 传代后细胞漂浮怎么办？

①优化操作手法：使用移液器沿瓶壁缓慢吹打细胞，避免用力过猛，减少气泡产生；②调整细胞密度：根据细胞类型调整传代密度（通常单位面积密度1×10^4~5×10^4 cells/cm²）。③排除培养环境因素：确保培养基新鲜且预热、清洁培养器皿。短期提高血清比例至15%，待细胞稳定贴壁后（24～48 小时）再换回常规血清浓度。④应急处理已漂浮细胞：若漂浮细胞较少，吸除上清，补充新鲜预热培养基，继续培养观察；若漂浮细胞较多，收集漂浮细胞悬液，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清后用新鲜培养基重悬，重新接种至新培养皿，同时排查操作或环境问题，必要时复苏低代次细胞。

3. 细胞形态异常怎么办？

①优化细胞消化步骤：胰酶 37℃预热，消化时镜下观察细胞形态变化，细胞变圆、间隙增大立即终止消化，并立即用含血清培养基中和；②改善培养环境：根据细胞代谢速率更换预热培养基，避免代谢废物积累；确保培养瓶无残留洗涤剂；③优化操作手法：使用 10 mL 吸管沿瓶壁缓慢吹打，避免用力过猛，减少气泡产生。