

NQBB 特級胎牛血清使用方法

在細胞培養過程中，經常加入 5%-20%的胎牛血清，最常使用的 NQBB 胎牛血清濃度是 10%。高濃度的血清可能改變細胞的基因表達譜，影響後續實驗的結果，我們在實驗中使用 10%的 NQBB 美國胎牛血清培養 293T 細胞，效果非常好。但是有些細胞也會使用 5%的 NQBB FBS 或者 20%的 NQBB 胎牛血清，要根據具體細胞選擇合適的 NQBB 胎牛血清濃度。

NQBB 胎牛血清保存方法

1、需要長期保存的血清必須儲存於-20℃ - 70℃ 低溫冰箱中。4℃冰箱中保存時間切勿超過 1 個月。切勿將血清在 37℃放置太久，否則血清會變得渾濁，同時血清中的有效成分會被破壞，而影響血清質量。如果一次無法用完一瓶，可將 40 ~45ml 分裝於無菌 50ml 離心管中。由於血清結冰時體積會增加約 10%，因此，血清在凍入低溫冰箱前，必須預留一定體積空間，否則易發生污染或玻璃瓶凍裂。

2、一般廠商提供的血清為無菌，無需再過濾除菌。如發現血清有懸浮物，則可將血清加入培養液內一起過濾，切勿直接過濾血清。

3、瓶裝血清解凍需採用逐步解凍法：-20℃ 至 -70℃ 低溫冰箱中的血清放入 4℃冰箱中溶解 1 天。然後移入室溫，待全部溶解後再分裝，一般以 50ml 無菌離心管可分裝 40~45ml。在溶解過程中須規則搖晃均勻(小心勿造成氣泡)，使溫度與成分均一，減少沈澱的發生。切勿直接將血清從-20℃進入 37℃解凍，這樣因溫度改變太大，容易造成蛋白質凝集而出現沉澱。

4、熱滅菌是指 56℃，30 分鐘加熱已完全解凍的血清。加熱過程中須規則搖晃均勻。此熱處理的目的是使血清中的補體成分滅菌。除非必須，一般不建議作此熱處理，因為熱處理會造成血清沉澱物顯著增多，而且還會影響血清的質量。補體參與反應有：細胞毒作用，平滑肌細胞收縮，肥大細胞和血小板釋放組胺，增強吞噬作用，促進淋巴細胞和巨噬細胞發生化學趨化和活化。

5、血清中的沉澱物絮狀物：主要是血清中的脂蛋白變性及解凍後血清中纖維蛋白造成，這些絮狀物不會影響血清本身的質量。可用離心 3000rpm,5 分鐘去除，也

可不用處理。顯微鏡下"小黑點":經過熱處理過的血清,沉澱物的形成會顯著增多。有些沉澱物在顯微鏡下觀察像"小黑點",常誤認為血清受污染。一般情況下,此小黑點不會影響細胞生長,但如果懷疑血清質量,則應立即停止使用,更換另一批號的血清。

NQBB 胎牛血清使用中遇到的常見問題總結

一、血清滅菌問題。

1、問：加到培養基中的血清必須滅菌嗎？

答：不是必須的，看做什麼實驗了。

2、問：NQBB 胎牛血清滅菌是 56°C 30 分鐘嗎？

答：如果用於培養大多數的腫瘤細胞，血清一般是不需要滅菌的，這樣可以有效保存血清中的生長因子。但是如果用於培養一些表面具有補體受體的細胞，如內皮細胞，血清是需要滅菌，一般是 56°C，30min。

3、問：我要做滋養細胞培養，胎牛血清要滅菌嗎？

答：進口的一般都已滅菌，國產的不一定，最好還是滅菌一下再用較安全。

4、問：我用病毒上清轉染細胞，培養用的血清需要滅菌嗎？因為血清中可能有些補體和抗體，是不是會影響轉染？我想未滅菌的血清中含些抗體補體可能會和病毒相結合，影響轉染，正確嗎？細胞是單核細胞白血病細胞，病毒是病毒包裝細胞 PT67 收集的病毒上清。為什麼要用無血清培養基加病毒孵育幾小時，目的是什麼？

答：血清一定要滅菌，可以先用無血清培養基加病毒孵育幾小時以後再加血清。避免雜蛋白對病毒和宿主結合過程的干擾，一般是 2-6 小時，根據細胞的狀態決定。血清不一定需要滅菌，滅菌的目的是將血清中的補體滅菌！這要根據實際情況而定，如果沒有把握那就滅菌吧，也不麻煩 56 度半個小時。

5、問：(1)我買的是 NQBB 北美胎牛血清，要滅菌嗎？有些說法是需要，有些說直接解凍後就可以加入到培養基中；我配製胰蛋白酶液，用的是 D-PBS，有關係嗎？

答：關於血清的熱滅菌，是很多人感興趣也存在一定爭議的話題。大多數實驗室將血清的熱滅菌還是作為常規來執行，因為有兩個作用，第一是滅菌補體，第二是滅菌血清中可能存在的支原體。但是實驗者並沒有考慮熱處理對血清中的生長因子、胺基酸等成分帶來的負面影響。

我在實驗室處理血清的時候，有一次水浴箱在滅菌過程中出現故障，溫度升高到 80°C，血清變成了凝膠狀，我重新處理了另外一份血清，將兩份血清對比，發現高溫直接影響到血清所含的抗體蛋白。在 56°C 下滅菌半小時以上，肯定也會對裡面的蛋白起到破壞作用。下次有機會我做個延長滅菌時間的實驗試試，看看到底有多大的影響。熱滅活之後，血清放在四度冰箱久了，就會有沉澱產生，這常常會被認為是微生物污染或者是黑膠蟲污染。為了驗證到底有沒有污染，常常又會把血清放置 37°C 溫育，但是血清中的蛋白會進一步析出，最後還是要做鏡檢，無菌培養試驗，和革蘭氏染色試驗，非常麻煩。

我看過一份資料，裡面提到 70% 的實驗者認為滅菌是理所當然的。常規滅菌建議的溫度在 45°C 到 62°C 之間，而時間則從 15 分鐘到 60 分鐘不等。其中最常用的手法是 56°C 熱處理 30 分鐘。隨著血清採集、處理、加工工藝的提高，許多早先認為是熱滅菌的原因已經不再成立，只有少數對血清進行熱滅菌的研究者在實驗中證實了這一步驟的有效性和必要性。有人比較過 11 個不同細胞株，發現其中熱滅菌對 6 個細胞株(HBAE, MDBK, Vero, 成纖維細胞, MRC-5) 的生長帶來負面影響，三個細胞株(FOX-NY, MDCK 和 CHO-K1) 不受熱滅菌的影響，而只有兩個細胞株(Balb/3T3, Sp2/0Ag14 hybrid)，在熱滅菌之後，細胞生長有輕微的改善。所以，在正常的操作下，熱滅菌通常對細胞的生長沒有明顯的促進作用。

你可以摸索一下，血清從 -20°C 冰箱拿出來之後在常溫解凍，然後混勻分裝成兩份，一份滅菌，一份不滅菌，比較這兩種血清對細胞是否有影響。然後再確定是滅菌還是不滅菌。這個過程最多也就一個星期。同時你還要考慮血清滅菌與否對你後續的實驗有沒有影響。

問：(2)分裝後的血清從-20°C取出放 4°C讓其液化，卻見血清比較混濁，有沉澱產生，這屬正常嗎？

答：正常。

二、血清的保存問題。

1、問：2016年6月到期的NQBB胎牛血清到2017年5月還能用嗎？

答：只有試試了，如果一直在-20°C凍著來者，應該還可以，先少用點看看。養細胞系應該沒問題，原代不行。

2、問：請問我自然溶化好的胎牛血清和1640培養基今天用不上，明天用，我不想放到冰箱裡，放在室溫下一晚行嗎？100毫升培養瓶加多少培養基呢？

答：可以放4°C。4-5ml。

3、問：4°C冰箱內保存3個月的胎牛血清，能否繼續使用？相關細胞和其它試劑的代價比較高，不敢輕易嘗試。

答：需要長期保存的NQBB胎牛血清必須要保存在-20至-70°C的低溫冰箱中，4°C冰箱中保存時間不要超過1個月。

三、血清滅菌時溫度問題。

1、問：因為實驗室水浴鍋失控，血清滅菌時，溫度到了61.7°C，這血清還能用嗎？

答：多長時間啊？短時間應該可以吧，我有一次加熱了一個多小時，還照樣用。

2、問：我滅菌胎牛血清時，用的電磁爐，定在了70°C，本來說調溫度到56°C

再放血清的，後來忘了，就把血清放進去了，所以滅菌的溫度肯定超過 56°C 了，不知道這樣對血清有沒有影響？

答：常規滅菌建議的溫度在 45°C 到 62°C 之間，而時間則從 15 分鐘到 60 分鐘不等，其中最常用的手法是 56°C 熱處理 30 分鐘。看看你養的細胞是什麼，一般的話估計問題不大，要是很珍貴的細胞還是慎重一點啊。熱滅菌目的是為了去除血清中補體等對熱敏感的物質，在對補體滅菌以外，熱處理同時也對血清中可能存在的支原體具有滅菌作用。現在好像不主張熱滅菌，熱滅菌經常給血清產品帶來負面影響，對血清的加熱經常導致血清中沉澱的產生，此外，有研究結果證實熱滅菌步驟減弱了胎牛血清和小牛血清對細胞的促粘附作用。

四、FBS 可否代替人 AB 型血清？

問：我現在在做人的外周血 b 淋巴細胞的培養，文獻上要求用人的 AB 型血清，但是我覺得很多代理商都沒有。我想 FBS 代替，但不知道可否，我先是擔心免疫排斥之類，但是我查了些資料後，應該不會(我覺得)。但是我又不能夠 TRY。因為細胞因子確實太貴了，所以諮詢一下。謝謝！

答：你最好照文獻的做。除非你系列實驗證明你用代用品的結果與文獻的相同(你還是要用到文獻的試劑)。細胞培養的影響因素很多，特別是培養基的成分。

五、血清的製備方法問題。

1、問：我的實驗需要自己製備一些血清用於培養細胞，有沒有人知道用於培養細胞的血清需要怎樣的製備過程？

答：自己製備血清當心污染啊。如果無菌條件好的話，用靜置析出方法就行。

2、問：一般我們用得胎牛血清用前還要滅菌，我想用大鼠的血，不知道要不要滅菌？

答：你直接把采來的血液在離心管裡 4°C 過夜，離心，取上清，在無菌過濾，

也可滅菌，然後分裝凍存，用時再配。

3、問：如果滅菌會不會對血清中的一些因子有損傷？

答：加熱可以滅菌補體系統。激活的補體參與溶解細胞事件，刺激平滑肌收縮，細胞和血小板釋放組胺，激活淋巴細胞和巨噬細胞。在進行免疫學研究、培養 ES 細胞、昆蟲細胞和平滑肌細胞時，推薦使用熱滅菌血清。滅菌一般不會對血清中的一些因子損傷的。

六、心肌細胞原代培養時血清的使用問題。

1、問：在進行心肌細胞原代培養時，需要用含血清的培養基中止胰酶的消化作用，我現在使用的是含血清 10%的培養液，但近日看北醫一個細胞培養的課件發現，有用 1%血清培養液進行中止消化的，想問一下，1%的是否可以，效果是否有保證？這樣確實能節省不少血清的。

答：關於心肌細胞元代培養的 FBS 問題：

(1)1%的血清完全培養基可不可以，得看你胰酶的用量。但是在心肌細胞元代培養就不行。10%的 FBS 完全培養基效果都不太好，開始心肌細胞元代培養需要高濃度的 FBS，20%左右，但這就有出現另一個問題，在 FBS 完全培養基中，成纖維細胞呈優勢細胞，須得在培養基加入適量的 BrdU 以抑制其生長，純化心肌細胞。

(2)FBS 的作用不僅僅是拿來中和胰酶，只是 FBS 中的一些蛋白質如 α -巨球蛋白等有抑制胰酶活性作用。

(3)元代心肌細胞培養的 FBS 使用，有講究：剛開始使用 20%左右的高濃度的 FBS，後逐漸遞減為無血清的 DMEM/F-12 培養基培養。

2、問：我胰酶的用量是 0.08%，並混和了 0.08%的膠原酶。FBS 要高濃度遞減是否是說的在細胞培養中啊，難道在消化時終止也需要如此高的濃度嗎，還有，我的 BRDU 只用到 48 小時就不用了，因為擔心其損傷太大，可以持續用

多久呢？

答：我用 10%FBS 終止的，然後差速 1h，然後還是用 10%FBS 的 HG-dmem 養的，沒有用 brdu，心肌細胞還是比較多和穩定的，我第 3 天就可以用，第 2 天晚上看就會有搏動。

七、血清和培養基的種類及品牌問題。

1、問：細胞培養的胎牛血清用哪個公司的產品比較好呢？周圍有人用 PAA 或 Hyclone 的，這兩種跟 NQBB 或 sigma 出品的差別大嗎？

答：如果是長得非常快得細胞如 pa317, 293, c6 等惡性腫瘤細胞，一般得國產血清就可以，如果是原代培養的細胞，最好應用胎牛血清或類標準胎牛血清，Hyclone 公司血清的質量不如 NQBB(同類血清)。國產的杭州四季青和甘肅民海（中美和資）不錯。有些細胞(如：sf9, 293 還有其他一些元代細胞)，用 NQBB 的比其他兩種好很多，會大大加速試驗進度。對於其他一些細胞(如：vero, MDCK, pk)四季青，Hyclone 的小牛血清足矣！另外，NQBB 的還要看產地。

2、問：最近要訂一瓶胎牛血清，實驗室之前都在用小牛血清，沒有買過胎牛血清。請問哪個公司的好一些？問過試劑公司，有兩種：一種是 PAA 的(分普通級和優級)，一種是 Hyclone 的(只有普通級，而且是新西蘭產的)。試劑公司推薦使用 PAA 優級的，但看好多文獻都用 Hyclone 的，公司說是因為現在 Hyclone 的都不是美國進口的了。請問用的哪種胎牛血清比較好？

答：民海的效果還不錯，要是不放心國產的，那就買進口的。進口的好多公司都有，新西蘭產的效果一般。Hyclone 和 NQBB 的都還可以。民海的似乎比四季青的要好些。復蒙的感覺也不錯。

3、問：四季青“無噬菌體、低內毒素胎牛血清”與“無支原體胎牛血清”的區別？培養腫瘤傳代細胞用哪一個比較好些？

答：用無支原體胎牛血清就可以啦。

4、問：SKBR-3 細胞培養用哪種型號的 1640 培養基及胎牛血清？

答：我一直用 NQBB 的 1640，你可以買含 HEPES 的 1*10L 的包裝，胎牛血清也是用的 NQBB，10%就行。請查閱：www.atcc.org

八、牛血清污染噬菌體的問題。

1、問：有誰知道小牛血清製造過程中怎樣能夠避免噬菌體的污染，以及對已污染噬菌體的牛血清怎樣能夠除去噬菌體？

2、問：我也想知道，我用的血清中大部分都有噬菌體，它對細胞培養到底有什麼影響？

暫無回答。

九、培養基血清濃度問題。

問：在 1640 里加血清時加多了，90ml 里加了 20ml 血清，約為 18%，以前都是加 10ml 的，查了網上多建議用 10%-15%，有關係嗎？

答：我認為一般來說血清濃度的較大波動對細胞的狀態影響較大，建議再加 90ml 1640 調成 10%。血清濃度大當然細胞狀態感覺要好，但是高濃度的血清可能改變細胞的基因表達譜，影響後續實驗的結果。10%的濃度培養鼻煙癌細胞很好。

十、問：MTT 加藥的時候加不加血清？加藥時要用無血清的培養基嗎？

答：我的藥就是用含血清的培養基稀釋的，不含血清的培養基對細胞有毒性或抑製作用，無形中對細胞造了一個 serum-free 的模型，細胞在體內本來就是有血清供應，如果該藥物都不能對抗，那該藥物就沒有什麼臨床價值了，這是我的理解。

十一、PC12 細胞培養所用血清問題。

問：我正準備購買上海細胞所的未分化的 PC12 細胞，需要滅菌的馬血清，可現在買血清很困難，好像是海關有封鎖，代理商這麼說的，我原定購買的 NQBB 的 horse surum，現在無法買到了，好容易找到一個目前可以進血清的公司 Hyclone，有一種 Donor Equine serum 是馬血清嗎？

答：Hyclone 的 Donor Equine serum 可以用，我以前用的就是這個。我當時是在鼎國(重慶辦事處)買的，100ml 大概 140 元，具體不記得了。當時是看它比別的進口的馬血清便宜。另外：我買了以後滅菌的。

十二、AB 血清的製備問題。

問：本人想從人的外周血中分離 AB 血清的，用於 B 淋巴細胞的培養。謝謝大家給點建議。人的血，來之不易 啊。

答：是 AB 血型人的血清嗎？這種血清即沒有抗 A 型抗原抗體，也沒有抗 B 型抗原抗體。分離血清時將採集的血液注入試管中，待血液凝固後離心分離血清。可將採集的血液放在 37°C 水浴箱中促進血液凝固，減少凝固時間。離心可在 2500~3000rpm，10min，足可以分離血清。分離後將血清吸出保存即可。分離血清的量可按採集血液的 50% 左右計算，因為紅細胞占總血液的 50% 左右。當然整個過程要注意無菌操作。

十三、Gibico 的胎牛血清內是否含糖？

問：我想做糖誘導細胞凋亡的試驗。細胞培養液里加入了 20% 的胎牛血清。因此胎牛血清裡是否含有糖對我實驗的培養液糖終濃度影響比較大。今天打電話問 NQBB 公司的技術顧問，回答我糖濃度少於 5µg/ml，因此基本可認為是不含糖。但我今天把胎牛血清送到我們醫院檢液科，結果卻是：6.2mmol/l(葡萄糖氧化酶法)。難道是檢測人血清的血糖濃度的方法不能用於檢查牛血清嗎？(另起茶水驗尿事件？)檢驗科沒有給我回答。

答：應該是不含糖的。請參照 NQBB 的網站：

http://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/B_08A00_0619_FBS_bro.pdf。第五頁我做了個記號。直接 點 擊連結就可以看到它的說明書頁面。我想我們肯定要以公司的說明書為準。至於為什麼檢驗科測起來有誤差，我想 可能是樣本不一樣，需要用標誌品矯正有關。具體需要檢驗科的戰友解釋了。

十四、血清或培養基產生了顏色或沉澱的問題：

1、問：我用的是四季青的胎牛血清， 56°C 30 分鐘滅菌後出現了白色少量絮狀沉澱，是不是污染？還能不能 再用？血清的生產日期是 2006 年 7 月(現在是 2007 年 6 月 11 日)。

答：應該問題不大。你可以取少量血清放入培養皿中， 37°C 過夜培養看看就知道是否污染了。血清中沉澱 物 的出現有許多種原因，但最普遍的原因是由於血清中脂蛋白的變性所造成，而血纖維蛋白(形成凝血的蛋白之一)在 血 涓解凍後，也會存在於血清中，亦是造成沉澱物的主要原因之一。但這些絮狀沉澱物，並不影響血清本身的質量。若 您欲去除這些絮狀沉澱物，可以將血清分裝至無菌離心管內，以 400g 稍微離心，上清液即可接著加入培養基內一起 過濾。

2、問：我用 MTT 法測細胞的增殖，用 DMSO 裂解細胞，發現把 DMSO 加入到孔中就會形成乳白色(用的含胎牛血 清的 1640 培養基，由於沒有離板子的離心機，所以沒有去除培養基直接加的 DMSO)。以前用含小牛血清的培養基沒有看到有這種情況。該怎麼解決？

答：為什麼要用離心機離心呢？難倒你養的是懸浮細胞嗎？如果是貼壁細胞的話直接將 MTT 倒掉，再加 DMSO 即可，我們就是這麼做的，效果很好！並且測細胞的增殖的話如果不去掉 MTT 就加 DMSO 的話誤差應該很大！有時不一定就是血清的原因，可能跟你的 MTT 放置的時間或以及其他成分有關！

3、問：(1)NQBB 胎牛血清 500ml，今天解凍後沒有混勻直接分裝，結果使得前面的幾管是清亮的，後面就 帶 有棕色的，不知有沒有影響？估計有什麼影響？前面的成分好還是棕色的成分好啊？

答：肯定有。最好還是重新混合重新分裝，我覺得有效成分會集中在棕顏色部分。

問：(2)為什麼會出現棕色呢？

答：血清中的棕色多一些可能是因為紅蛋白的含量高些的緣故吧。

問：(3)血清滅菌之後可以存放嗎？我的是前天滅菌的，但是沒有加到培養基裡，而是放在冰箱裡，那下次 可以直接用嗎？還是再次滅菌啊？

答：當然可以，如果多的話，分裝後最好放在 -20°C ，下次用時再解凍，也不用再滅菌。最好用一管拿一管，少許血清可以放在 4°C 。分裝時還要注意不要裝得太滿，以免溢出污染。

十五、污染和過濾的問題。

1、問：懷疑血清染菌，想用濾膜過濾一下，可否自己用 $0.22\mu\text{m}$ 濾膜過濾？對血清性質有多大影響？有做過的麼？

答：可以過濾的，血清當出廠時都是 $0.22\mu\text{m}$ 或 $0.1\mu\text{m}$ 過濾除菌。想證明有沒有染菌不用過濾這麼麻煩，只要放置於 37°C 過夜就可以了，如果有微生物污染會變渾濁的，如果還是澄清的就說明沒有問題的。實驗室中血清很難直接過濾，一般要加到培養基中再過濾。我們實驗室製備培養基時，都使用濾膜過濾，一般而言如果製備1-2瓶培養基，一個濾膜及一支30ml注射器可以過濾50ml小牛血清。如果大量製備培養基也可以將血清加到培養基中，使用 0.22 微米的大濾膜一起過濾。

2、問：我懷疑我用的完全1640培養液被污染了，準備重新過濾消毒，過濾後是否需要補充胎牛血清？如需又如何補充？

答：完全1640培養液被污染了，如果是支原體的話，過濾沒有作用，支原體可以通過濾膜。我們用1640液，都是配液後保留500ml，然後其他的分裝100-200ml，現用現配因為血清比1640要貴，如果你想過濾的話，建議你加

原比例血清，因為血清不會很容易通過濾膜。最主要的還是找到可能污染的原因。

3、問：加好了血清雙抗的培養基由於污染了再過濾後還能用嗎？

答：建議不要用了。在加了雙抗的情況下已經污染，那麼細菌污染的可能性會較小了。一般的過濾除不能去除病毒或者部分真菌的污染的。

4、問：我準備把使用的完全 1640 培養液重新過濾一遍，不知道培養液中的血清成分是否能通過濾膜，過濾後是否還需要補充胎牛血清？如需又如何補充？

答：可以透過，但是隨著液體量的增多會很慢，如果不加壓會比較麻煩，還有最好用低蛋白吸附的，不然損失是比較大的。

十六、問：懸浮細胞培養時能否加血清？如果加了會有什麼結果？為什麼懸浮細胞培養時就不能加血清？

答：血清是細胞培養基中重要的培養成份之一，對細胞生長有廣泛影響。在細胞培養時，我們通常會加入 10%的血清。血清的質量對細胞培養的成功至關重要。一般說來，牛血清包括以下成分：生長因子(如激素，白細胞介素等)，他們可以促進細胞生長；貼附因子，他們可以促進細胞的貼壁，往往只有細胞貼壁才能增值(懸浮培養的細胞除外)；蛋白質(如血清白蛋白，球蛋白等)，既可以作為營養物質，又可以中止胰酶的作用；還有很多成分不明的物質。血清還可以起到解毒作用，如脂肪酸、重金屬和某些蛋白酶的毒性。血清還可以是細胞免受機械損傷。因此，無論是貼壁細胞還是懸浮細胞，血清是必不可少的。除非因實驗要求無血清培養時，例如：為使細胞同步化時，我們會採用無血清培養的。單純的說懸浮細胞培養不能加血清就沒有太多的道理了。

十七、關於中和消化液需要的血清量。

問：用胰蛋白酶消化細胞後，需要用血清中和。具體這種中和作用所要求的胰蛋白酶和血清之間的比例是 多少？

答：做了很久的試驗，真的沒有想過胰酶和血清的對應關係。不過細想下來，這個應該也沒有固定的比值。血清的品種都是不同的，成分必然有差異，如何能確定其與胰酶的比值關係？我們消化細胞的時候，如果是傳代，細胞變形後，吸出胰酶直接加入適量的 hanks 液或者全培，這個量看自己的喜好和吹打細胞方便而定。一般都可以中止消化的。不會存在繼續消化的事情。如果是從組織上消化細胞做原代培養，我一般都使用全培進行中止，而且加的很多，0.25%的胰酶，用10%血清，按1:2的比例應該是足夠的。當然全培是2，一般我養細胞的時候，會用國產的比較便宜的血清配製全培，專門用於中止消化，這樣有幾個好處：一是中止消化的效果應該好於 hanks 液吧，再是也有利於維持細胞活性。而且這部分液體會被離心去掉，血清便宜，離心掉了不會心疼。而養細胞的時候用好血清。個人觀點，僅供參考。

十八、血清中的懸浮物問題。

1、問：發現培養的細胞瓶中背景有許多的小黑點，培養液中也有一些漂浮的物。看了之前的帖以為是膠原蟲。本打算換液，換液前特意看了下前些天配的培養液，肉眼發現培養液中有懸浮的顆粒狀物質(不多)，於是放在鏡下觀察，新鮮培養液中有一些懸浮的小顆粒，不多。(培養液是 R1640+20%牛血清+1%雙抗)於是又將分裝在4°C保存的小牛血清拿出觀察，肉眼可見5、6個白色小小球狀的物質，在血清瓶稍靠下的部位懸浮。鏡下觀察，也有少量的不知什麼物質的東西漂浮。小牛血清是 Hyclone 新西蘭的，標籤上寫已經經過2µm濾膜過濾處理。根據上述培養液的情況，是否說明培養液已被污染？如果是正常的血清是不是在鏡下不應該看到雜物，哪怕是極少量的？根據上述血清的描述，是不是說明血清也存在問題，還能用嗎？補充：細胞培養以來生長狀態就不好。買血清的時候廠家說明不用滅活，所以未滅菌。

答：(1)血清應該-20°C保存，解凍血清時，請按照的逐步解凍法(-20°C至4°C至室溫)，若血清解凍時改變的溫度太大實驗顯示非常容易產生沉澱物。

(2)血清中沉澱物的出現有許多種原因，但最普遍的原因是由於血清中脂蛋白的變性所造成，而血纖維蛋白在血清解凍後，也會存在於血清中，亦可造成沉澱物。

(3)若您一次無法用完一瓶，建議您無菌分裝血清，再放回冷凍，若存放於 4°C 時，請勿超過一個月，儲存在 2-8°C 時，血清中的各種蛋白和脂蛋白，可能聚集而形成沉澱或可見的混濁。

(4)解凍血清時，請隨時將之搖晃均勻，使溫度及成分均一，減少沉澱的發生。

(5)排出了血清的原因，在考慮實驗用品和無菌操作的問題。

(6)細菌病毒、衣原體、黑膠蟲污染也很常見，如果細胞死的太多，影響較大建議更換培養液。

2、問：今天在配培養液時，發現血清裡面有小碎片樣的漂浮物，血清仍然清亮，不渾濁。不知道是什麼，問了實驗室的學長，說仍然可以用，但還是不放心，沒有用血清。求助園子的各位達人，這可能是血清出了什麼問題？我的血清用了一個月不到，四季青的。

答：可能的原因：(1)培養液配置時 Vortex 不夠，當時是清亮的，但過一段時間會析出來；(2)真菌污染。

十九、更換無血清培養基後細胞大量死亡的問題。

問：我使用 Lipofectamine2000 轉染成骨細胞，在轉染前要換上無血清的培養基。本來條件模的好好的，轉染效率也可以接受。但是寒假一回來就發生了怪事：細胞在有血清的培養基中長的好好的，一換無血清的培養基就死亡。大概 4 個小時就能看到較多的細胞飄起來。但是原來我換無血清培養基，就算放那裡 10 個小時都是沒問題的啊。已經換了不同批次的培養基，甚至吸管什麼的都換過了，但是就是不行，是怎麼回事？

答：(1)兩週後的培養液應補加谷氨醯胺，或者重新配液，轉染時應不含抗生素。

(2)確認操作方法和環境，建議檢查一下。

(3)Lipofectamine2000，脂質體的毒性很大，如果有質粒參與對細胞損傷更大，如果 Lipofectamine2000 在常溫放置過，對細胞更大，假期冰箱是否斷過電。

(4)培養箱的溫度、CO₂ 濃度，濕度。

二十、完全培養液的相關定義。

問：“完全培養液一詞”，是指加了血清的培養液嗎？我在做含藥血清的實驗，涉及到血清添加量的問題。所以想弄明白文中所指的“完全培養液”是否是含藥血清。

答：原液是指配置後過濾除菌。不完全培養液是指不含有血清的原液，其他成分已補充。完全培養液是指不完全培養液加入血清後稱完全培養液。

二十一、血清相關知識總結。

使用胎牛血清的注意事項：

血清是細胞培養中最重要元素之一。下面是實驗室裡常會遇到的問題，僅供大家參考：

1、保存血清最好的方法：

建議血清應保存在-5℃ 至 -20℃。然而，若存放於 4℃ 時，請勿超過一個月。若您一次無法用完一瓶，建議您無菌分裝血清至恰當的滅菌容器內，再放回冷凍。

2、如何解凍血清才不會使產品質量受損：

建議您將血清從冷凍箱取出後，先置於 2~8℃ 冰箱使之溶解，然後在室溫下使之全溶。但必須注意的是，溶解過程中必須規則地搖晃均勻。

3、血清解凍後發現有絮狀沉澱物出現，該如何處理：

血清中沉澱物的出現有許多種原因，但最普的原因是由於血清中脂蛋白的變性所造成，而血纖維蛋白(形成凝血的蛋白之一)在血清解凍後，也會存在於血清中，亦是造成沉澱物的主要原因之一。但這些絮狀沉澱物，並不影響血清本身的質量。

若您欲去除這些絮狀沉澱物，可以將血清分裝至無菌離心管內，以 400g 稍微離心，上清液即可接著加入培養基內一起過濾。我們不建議您以過濾的方法去除這些絮狀沉澱物，因為它可能會阻塞您的過濾膜。

4、何謂熱滅菌：

一般是以 56°C，30 分鐘來處理已解凍的血清，因為此加熱步驟，可以使補體去活化，而補體所參與的反應有：溶細胞活性，平滑肌的收縮，肥大細胞和血小板組胺的釋放，增強吞噬作用，淋巴細胞、巨噬細胞的趨化和激活。

5、關於胎牛血清的滅菌：

有必要做熱滅菌嗎？

實驗顯示，經過正確處理的熱滅菌血清，對大多數的細胞而言是不需要的。經此處理過的血清對細胞的生長只有微小的促進，或完全沒有任何作用，甚至通常因為高溫處理影響了血清的質量，而造成細胞生長速率的降低。而經過熱處理的血清，沉澱物的形成會顯著的增多，這些沉澱物在倒立顯微鏡下觀察，像是“小黑點”，常常會讓研究者誤以為是血清遭受污染，而把血清放在 37°C 環境中，又會使此沉澱物更增多，使研究者誤認為是微生物的分裂擴增。

因此我們建議您，若非必須，您可以不需要做熱處理這一步。如此一來，不但節省您寶貴的時間，更確保您血清的質量！

6、血清相關知識：

如何避免沉澱物的產生？

我們建議您在使用血清的時候，注意下列的操作：

(1)解凍血清時，請按照所建議的逐步解凍法(-20°C至 4°C至室溫)，若血清解凍時改變的溫度太大(如-20°C 至 37°C)，實驗顯示非常容易產生沉澱物。

(2)解凍血清時，請隨時將之搖晃均勻，使溫度及成分均一，減少沉澱的發生。

(3)請勿將血清置於 37°C太久。若在 37°C放置太久，血清會變得混濁，同時血清中許多較不穩定的成分也會因此受到損害，而影響血清的質量。

(4)血清的熱滅菌非常容易造成沉澱物的增多，若非必要，可以無須做此步驟。

(5)若必須做血清的熱滅菌，請遵守 56°C，30 分鐘的原則，並且隨時搖晃均勻。溫度過高，時間過久或搖晃不均勻，都會造成沉澱物的增多。