

細胞繼代培養

1. 前言：

1.1 細胞生長至高密度時，即須收集細胞，分殖至新的培養瓶中，其稀釋比例依細胞種類而異。

1.2 收集細胞方法可用 trypsin-EDTA、cell scraper、離心處理等，處理方法依細胞種類而異。

1.3 Trypsin-EDTA 為收集吸附型細胞常用之方法。Trypsin 為胰蛋白酵素，其作用為分解細胞與瓶壁之附著蛋白，EDTA 為 chelating agent，其作用為去除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等離子，trypsin 與 EDTA 二者共同作用，可使附著之細胞自瓶壁脫落。除了 trypsin-EDTA，亦可使用 cell scraper(細胞刮勺)刮落細胞。

1.4 Trypsin-EDTA 作用時間勿太久，否則可能對細胞造成傷害或死亡。敲拍培養瓶不可太過猛烈，避免對細胞造成傷害或造成培養瓶裂痕而污染。

2. 材料：

2.1 Dulbecco's phosphate-buffered saline, $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ free

2.2 trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin-0.53mM EDTA.4Na)：若為大體積包裝，建議將其以少量分裝於無菌試管中，保存於 -20°C ，避免反覆冷凍解凍造成 trypsin 之活性降低，並可減少污染之機會。使用前放在 37°C 水槽中回溫。

2.3 新鮮培養基 2.4 無菌吸管/離心管/培養瓶。

3. 步驟：

3.1 附著型細胞(adherent cell)

3.1.1 吸掉舊培養液。

3.1.2 用 Dulbecco's phosphate-buffered saline 洗滌細胞一至二次。

3.1.3 加入 trypsin-EDTA 溶液(1ml/T-25 flask, 2ml/T-75 flask)：

方法一： 37°C 或室溫作用數分鐘，於倒立顯微鏡下觀察，當細胞將要分離而呈現圓粒狀時，吸掉 trypsin-EDTA 溶液，輕敲培養瓶邊緣使細胞自瓶壁脫落，然後加入適量之新鮮培養基，與脫落之細胞或細胞團塊混和均勻後，依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養之。

方法二： 37°C 或室溫作用數分鐘，待細胞自瓶壁脫落後，加入適量含血清之新鮮培養基，以終止 trypsin 作用（因血清中含有 trypsin inhibitor，可以終止 trypsin

作用)，離心後去除上清液，或不作離心處理，添加新鮮培養基後依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養之。

3.2 懸浮型細胞(suspension cell)

3.2.1 吸出細胞培養液，放入離心管中，離心 1000 rpm、5 分鐘。

3.2.2 吸除上清液，加入適量之新鮮培養基，與沉澱細胞(cell pellet)混和均勻後，依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養。

3.3 融合瘤 (hybridoma)

3.3.1 有些 hybridoma cell 需培養三天以上才會產生抗體，若是更換培養基，則可能會失去抗體。因此繼代培養不需離心後更換培養基，直接添加新鮮培養基稀釋細胞濃度即可。