

解凍細胞大解密

年假結束，開工第一天就必須解凍細胞來接續去年的實驗，但又怕解凍細胞後的生長率不佳嗎？細胞回收率除了與解凍細胞過程有關，也與冷凍過程以及使用之抗凍液有很大的關係。細胞在冷凍過程中會遭受許多壓力，包含滲透壓、自由基、休眠代謝等，導致多數細胞在冷凍或解凍過程中死亡，敏感的幹細胞更是難以存活。除了這些壓力之外，在操作過程中的細節亦可能成為回收率不佳的殺手。在冷凍及解凍的過程中應該注意哪些細節來增加細胞的存活率呢？



1. 解凍細胞時，為什麼細胞的存活率都不好？

解凍細胞時要掌握**快速解凍**的訣竅，而凍細胞時則要掌握**緩慢凍結細胞**之訣竅。解凍細胞要快是因為要防止冰晶再形成而傷害細胞。存活率不好要先確定解凍細胞時之流程是否快狠準，再來凍細胞溶液中的 DMSO 會傷害細胞，若一開始沒有離心去除，最好在解凍細胞完後 8-12 小時(若為貼附細胞，要先確定細胞已貼盤)再次更換新鮮培養液。除此之外也有可能是凍細胞時操作不當造成細胞在凍細胞時就已死亡。

2. 解凍細胞存活率不好，若是凍細胞時的問題？

凍細胞前要先確定細胞處在生長旺盛的 log phase，且需先檢測細胞是否還保持其性質，例如，是否還有抗體或蛋白質產生，凍細胞時的細胞濃度要在 $1\sim 5 \times 10^6$ 。再來是抗凍液之比例，DMSO 約為 5-10%，其他種抗凍液則依照說明書使用，例如 HyClone HyCryo 為 condition medium：抗凍液為 1：1。抗凍液主要用途是**放慢冰晶產生之速度**，避免冰晶刺破細胞膜，傷害細胞。凍細胞時需**緩慢降溫也是要避免冰晶快速產生造成細胞傷害**，而在 4 度到-20 度這個過程建議不要超過 1 小時，以防止冰晶過大，傷害細胞。

3. 為什麼使用 Trypsin 有些細胞很快就下來，有些無法打下來？

每株細胞特性皆不相同，無法使用單一 protocol 處理。第一次使用 trypsin 時，最好觀察此株細胞對 trypsin 的耐受程度，若細胞很快就被切斷 ECM 鍵結，則之後加入 Trypsin 後可在室溫作用，避免在 37 度中作用對細胞造成傷害。若細胞打不下來，則可以放置 37 度作用約 5 分鐘，不要放太久，避免傷害細胞。除此之外要注意的是，在加入 trypsin 之前是否有使用**不含鈣鎂離子的 PBS 或 DPBS 將舊的培養液清洗乾淨**，因舊的培養液中會中和 Trypsin 之作用，鈣鎂離子也會與 Trypsin 結合，造成 Trypsin 無法作用。

細胞培養真的是一個非常注重細節的實驗，每一個小細節都有可能對細胞造成不可抹滅的影響，且不同細胞株有不同特性，需要注意的細節會不太一樣，除了自己尋找文獻了解細胞特性外，也可以依賴實驗室學長姊的經驗分享及傳承喔！