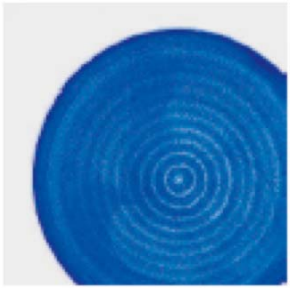
Guide Corning pour l'identification et la résolution des problèmes communs de croissance cellulaire
2ème Partie



Bulletin technique

John Ryan A., Ph.D. Corning Incorporated Life Sciences
900 Lowell Street-Chelmsford, MA 01851

Table des matières

Les problèmes liés à l'incubation 1
Les problèmes liés au milieu de culture 6
Suggestions pour la résolution des problèmes 9
Références 9

Les problèmes liés à l'incubation

Les cellules passent la quasi-totalité de leur existence dans des incubateurs, mais ces appareils ne peuvent pas toujours fournir l'environnement stable qu'elles exigent. Outre la fonction évidente du maintien d'une température constante, les incubateurs utilisés dans les systèmes de culture permettent également le contrôle de l'humidité, de l'environnement gazeux autour des cellules et indirectement du pH du milieu de culture. Idéalement, ces paramètres doivent être constants pour ne pas être source de variations expérimentales. Malheureusement, des variations peuvent se produire ce qui constitue potentiellement un problème majeur (Freshney, 1987, chapitres 2 et 3).

La température

Les différences de température dans l'incubateur, si petites soient-elles, peuvent occasionner des problèmes même pour des variations de quelques dixièmes de degré. Des ouvertures trop fréquentes des portes d'un incubateur mal isolé peuvent entraîner une réduction significative de la température, généralement localisée vers l'avant de l'incubateur. Souvent, cet effet est remarqué par la formation d'une condensation intense sur les flacons situés à proximité de l'entrée de l'incubateur. En raison de températures légèrement plus froides, les cultures dans ces flacons peuvent avoir des taux de croissance considérablement plus lents que leurs voisins au fond de l'incubateur, tout en étant plus exposées à des contaminants fongiques provoqués par la condensation. Une solution est d'utiliser un incubateur séparé pour toutes les expériences critiques dans lequel on limite le trafic d'entrée et de sortie pour minimiser les fluctuations de température. Lorsque cela n'est pas possible, les zones de l'incubateur qui présentent le moins de fluctuation de température (généralement vers l'arrière) doivent être utilisées pour un travail critique.

Habituellement les effets d'une fluctuation de température sont difficiles à visualiser et sont donc moins susceptibles d'être identifiés. La figure 8 montre un profil d'adhésion cellulaire typique sur

des cellules WI 38 causé par une fluctuation mineure de température dans une boîte. Cette boîte a été inoculée avec des cellules, placée 48 heures dans un incubateur sur une étagère en métal perforée, puis fixées et colorées. Les zones relativement claires sur la plaque correspondent parfaitement aux perforations sur le plateau métallique ce qui montre la préférence des cellules pour les zones plus chaudes directement en contact avec la partie métallique du plateau. Ces conditions apparaissent généralement lorsque les incubateurs ont été souvent ouverts, surtout pendant les premières heures d'incubation de cultures fraîchement inoculées.

Figure 8

Un problème similaire dans un flacon est illustré à la figure 9. Ici la croissance cellulaire et l'adhésion sont meilleures au niveau des trous dans les rayonnages. Cela indique que la température dans l'incubateur est un peu trop élevée pour les cellules. Ces observations indiquent que les cellules sont sensibles à d'infimes variations de température (moins de un demi-degré).

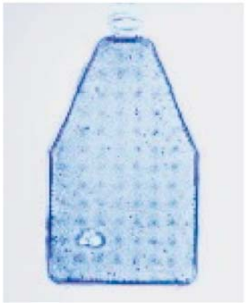


Figure 9

L'empilement des flacons peut également entraîner des différences de température et de taux de croissance d'un récipient à l'autre. Le flacon au bas de la pile, qui est en contact avec le plateau métallique, se réchauffe plus rapidement quand la pile est initialement placée dans l'incubateur. Le flacon sur le dessus est susceptible de se refroidir plus rapidement, alors que les récipients du milieu sont à l'abri de toute fluctuation de température. Il est très important de tenir compte de ces effets de position lors de la conception d'expériences pour lesquelles les taux de croissance seront déterminés. L'utilisation d'entretoises ou de flacons vides pour empêcher le contact direct avec les étagères perforées, de même que ne pas empiler les flacons lorsque c'est possible, peuvent aider à éviter ces problèmes.

L'évaporation

L'évaporation, induisant des modifications de l'osmolarité du milieu de culture, peut affecter le taux de croissance cellulaire et parfois, le profil de croissance. Les effets de l'évaporation sont faciles à observer en plaques 96 puits où les puits périphériques externes (en particulier aux quatre coins) montrent souvent une réduction marquée du volume de milieu au cours du temps. Bien que l'utilisation de couvercles adaptés réduise cet effet, il ne peut pas être totalement éliminé. Les effets visibles de l'évaporation dans d'autres types de récipients de culture, bien que

présents, sont beaucoup plus difficiles à détecter.

Les pertes par évaporation dépendent du type de récipient de culture utilisé (flacons, boîtes, plaques multi-puits, etc), leur emplacement dans l'incubateur, et la fréquence d'entrée dans l'incubateur. Le système d'humidification, le positionnement des ventilateurs d'aération, l'isolant, et les flux de circulation d'air permettent de déterminer les niveaux d'évaporation de l'appareil. L'évaporation peut être minimisée en gardant les réservoirs d'eau pleins et en humidifiant les gaz entrants (généralement du dioxyde de carbone) grâce à un cylindre de lavage des gaz (Corning Cat n ° 31770500EC par exemple) rempli d'eau purifiée avec tous gaz entrants dans l'incubateur.
La méthode suivante peut être utilisée pour créer une "carte" d'un incubateur montrant à la fois les zones de niveaux d'évaporation contrôlée et les zones à éviter pour des expériences nécessitant de longues incubations.

Procédure pour déterminer les niveaux d'évaporation dans les différentes zones d'un incubateur :

1. Déterminer le nombre total de boîtes qui seront nécessaires puis le nombre d'étagères et la densité de boîtes par étagère. Au moins 3 étagères (haute, milieu et basse) avec 9 à 16 boîtes par plateau (en matrice de 3×3 ou 4×4) sont recommandées pour chaque essai.

2. Numéroter consécutivement les fonds de toutes les boîtes. Puis pipetter avec précision la quantité appropriée de milieu dans chaque boîte (4 à 5 ml pour une boîte de 60 mm de diamètre), et noter le poids de chaque boîte (sans le couvercle en place). L'eau peut remplacer le milieu sans affecter la précision, ce qui élimine certains frais et évite les problèmes de contamination. Couvrir les boîtes et les placer dans la position appropriée dans l'incubateur. Assurez-vous que la position de chaque plat est correctement enregistrée afin que la carte puisse être précise.

3. Incuber pendant la durée souhaitée. C'est généralement la durée moyenne de votre expérience. Il est préférable pendant cette période de poursuivre une utilisation normale de l'incubateur afin de refléter les niveaux réels d'évaporation prévus. Sinon, une utilisation «normale» devra être simulée par l'ouverture périodique de l'incubateur.

4. Retirez les boîtes de l'incubateur par petits groupes et peser rapidement chacune d'entre elle **sans le couvercle**. Toute condensation sur le couvercle représente une perte d'eau et ne doit donc jamais être prise en compte dans le processus de pesage. La différence entre le poids initial de milieu ou d'eau (en grammes) et le poids final après évaporation, pour chaque boîte, divisée par le volume de milieu ou d'eau en millilitres ajouté initialement (× 100) est une approximation trés précise de la perte par évaporation totale exprimée en pourcentage.

$$\frac{\text{Initial weight (in grams)} - \text{Final weight}}{\text{Volume of water added (in mL)}} \times 100 = \%\ \text{Evaporation Loss}$$

5. Construire la carte montrant les niveaux d'évaporation sur les différents plateaux de l'incubateur. Tous les «points chauds» se distinguent nettement, leur cause pouvant alors être déterminée et corrigée; ou bien ces zones seront évitées à l'avenir. Des niveaux d'évaporation supérieurs à 10-15% peuvent avoir des effets néfastes sur les cultures. Ainsi des différences dans les niveaux d'évaporation à différents endroits dans l'incubateur causent des variations considérables dans les résultats expérimentaux.

Les vibrations

Les vibrations de l'incubateur peuvent être responsables de certains des profils de croissance les plus bizarres qui soient observés. Ses effets se font principalement ressentir sur les cellules en cours d'adhésion après l'inoculation du flacon. Dans les boîtes, les vibrations vont pousser les cellules sur les bords ou au milieu du récipient ou parfois vont provoquerla disposition des cellules en anneaux concentriques. La figure 10 montre ce type de modèle dans une culture de fibroblastes d'embryon de poulet.

Figure 10

Dans cet exemple, la totalité du lot de 40 boîtes placées dans l'incubateur ont montré des profils d'adhésion similaires. Bien que la vibration ayant causé ce problème eût toujours eté présente dans le laboratoire, ce profil n'était jamais apparu jusqu'à ce que le réservoir de CO_2 alimentant l'incubateur ne se soit vidé pendant l'incubation. Cette absence de CO_2 avait entraîné une augmentation du pH du milieu et a rendu l'adhésion cellulaire plus lente, laissant le temps aux vibrations de provoquer leur effet.

La figure 11 montre des profils typiques qui se produisent dans les flacons à cause des vibrations. Les profils d'adhésion cellulaire dans ces flacons ont tendance à être plus variés en raison de la forme irrégulière du récipient. Les changements dans la fréquence et l'amplitude des vibrations ou la localisation des flacons sur le plateau de l'incubateur affectera également la répartition des cellules. La netteté ou l'intensité des profils s'affaiblissent au fil du temps, surtout avec des lignées cellulaires mobiles, et sont plus visibles lorsque les flacons sont colorés, après 24 à 48 heures d'incubation.

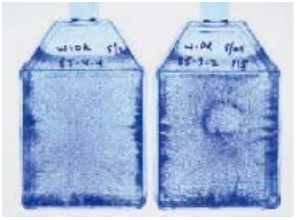


Figure 11

Trouver la source des vibrations peut s'avérer difficile. Elle peut être évidente comme un moteur de ventilateur desserré à l'intérieur de l'incubateur par exemple, mais les vibrations peuvent également être causées par une source plus éloignée. Un lieu de passage important, les unités de climatisation, les compresseurs, hottes à flux laminaire, centrifugeuses, réfrigérateurs et autres appareils motorisés doivent être aussi éloignés que possible des incubateurs.

Les incubateurs doivent être placés sur des tables ou des paillasses solides et lourdes qui ne sont pas partagées avec des équipements vibrants. Leur positionnement sur un plancher

directement au niveau des structures de la construction permettra de réduire les effets des vibrations naturelles des bâtiments. Des emplacements le long des murs extérieurs, s'ils sont situés loin des zones de passage à la fois intérieures et extérieures, sont souvent moins sujet aux vibrations que les espaces centraux des bâtiments. Si les incubateurs ne sont pas suffisamment stabilisés et mis de niveau, les effets des vibration peuvent être accrus. Réaliser des expérimentations délicates en fin de journée peut également aider à éliminer certaines des vibrations causées par lesactivités journalières des occupants d'un laboratoire.

L'horizontalité

Des profils d'adhésion inhabituels peuvent également apparaitre lorsque les récipients de culture ne sont pas placés de niveau dans l'incubateur : empilements instables de flacons ou utilisation d'étagères qui n'ont pas été mises de niveau au préalable. La figure 12 montre les puits colorés de deux plaques 6 puits, dont l'une était placée sur un plateau de l'incubateur qui n'était pas de niveau.

Figure 12

L'effet «croissant de lune» provoqué par le manque de milieu sur un plateau incliné est clair. Les étagères doivent être vérifiées avec un niveau à bulle et les ajustements réalisés en suivant les recommandations du fabricant de l'incubateur. Il est recommandé de vérifier périodiquement les étagères pour s'assurer qu'elles sont de niveau, surtout après leur déplacement pour nettoyage.

Parfois, un profil de croissance inhabituel indique l'occurence de causes multiples. La figure 13 montre un flacon coloré qui présente des rangées de lignes parallèles causées par un problème de vibration dans l'incubateur. La croissance des cellules plus marquée du côté gauche indique quant à elle un défaut de niveau.

Figure 13

Les gaz

L'incubateur, souvent considéré comme une source majeure de contamination biologique, peut également être une source de contamination chimique. Les mélanges de gaz diffusés dans les incubateurs (contenant généralement du dioxyde de carbone pour aider à réguler le pH des milieux) peuvent contenir des impuretés toxiques, notamment des traces d'huiles ou d'autres gaz comme le monoxyde de carbone, qui peuvent avoir été contenus lors d'une utilisation préalable des cylindres recyclables. Ce problème est très rare pour les gaz médicaux de qualité, mais plus fréquent pour les mélanges de gaz industriels moins chers. Il faut également être attentif lors de l'installation de nouveaux cylindres pour s'assurer que la bouteille de gaz est correcte. D'autres contaminants chimiques sont les résidus volatils toxiques laissés après le nettoyage et la désinfection des incubateurs. Les odeurs de désinfectant ne doivent pas être détectable par l'utilisateur au moment de la remise en service d'un incubateur fraichement nettoyé.

Les problèmes liés au milieu de culture

Comme mentionné précédemment, le milieu et le récipient de culture sont les deux principaux suspects dès qu'apparait un problème de croissance ou d'adhésion des cellules se produisant sans cause évidente. Sauf lorsqu'il est très contaminé, un bon milieu de culture n'est pas différent en apparence d'un milieu défectueux. La seule bonne façon de déterminer la qualité du milieu est de l'utiliser pour cultiver des cellules, ce qui est la procédure de contrôle de qualité de base utilisée par les fabricants et celle à utiliser pour valider les milieux réalisés au laboratoire.

Les cultures de cellules répondent de différentes manières à des milieux déficients ou toxiques en fonction de la nature et l'ampleur du problème. Ces réponses peuvent varier entre de légères modifications du taux de croissance ou de la fixation des cellules à la destruction totale de la culture. Déterminer si le milieu est responsable d'un problème est relativement facile: il suffit de tester le lot suspect contre un lot validé pour son efficacité. Déterminer pourquoi le milieu est défectueux est en revanche extrêmement difficile en raison du nombre de composants et des étapes complexes mises en place. Par conséquent, le temps et l'énergie sont beaucoup mieux utilisés à la prévention des problèmes qu'à leur résolution suite à la recherche de leurs causes; la gestion de la prévention est la clé pour le succès de la production de milieux. Les sections suivantes décrivent quelques-uns des problèmes courants et plus rares pour fabriquer et utiliser des milieux de culture (Jakoby et Pastan, 1979, chapitre 5).

Erreurs de formulation

La première étape est de définir le milieu le mieux adapté à vos applications. Habituellement les recommandations de la littérature scientifique ou de vos collègues sont de bons points de départ. Malheureusement, il ya beaucoup de confusion dans ce domaine à partir des nombreuses formulations utilisant des acronymes identiques ou similaires. Le catalogue actuel d'un des grands fabricants de milieux propose pas moins de 17 formulations différentes de milieux 1X appelés collectivement MEM pour «Eagle's Minimal Essentiel Medium». Cela n'inclut pas les six formulations pour l'α-MEM. Le même catalogue répertorie 22 autres formulations liquides du «Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) qui sont de compositions très différentes par rapport au milieu Eagle's MEM. Il ne faut pas s'étonner de la confusion et des erreurs commises lors de la sélection ou de la commande des milieux.

Les formulations publiées dans des revues scientifiques contiennent également des erreurs occasionnelles ou des modifications intentionnelles qui ajoutent à la confusion (Burke et Croxall, 1983). Une attention toute particulière est donc nécessaire pour veiller à ce que le milieu que vous faites ou que vous achetez est bien celui qui a été recommandé et que vous connaissez sa composition.

Lorsque vous fabriquez vous même les milieux, les formulations utilisées devraient être soigneusement vérifiées à partir d'au moins deux sources fiables. Les problèmes les plus courants causés par les milieux proviennent d'erreurs commises lors de leur préparation. Une feuille de formulation et un protocole de préparation, intégrant toutes les instructions ou précautions spéciales, doivent être rédigés pour tous les milieux et solutions fabriqués au laboratoire, et utilisés par tout le monde. La rédaction de fiches de lot donnant la liste de tous les réactifs utilisés, leurs numéros de lot, les poids ou les volumes utilisés, le pH, la date, les noms des préparateurs et les conditions de stockage sont essentiels pour assurer l'uniformité du produit, réduire les risques d'erreurs et tracer les erreurs si elles se produisent.

Qualité des réactifs

L'autre source importante de problèmes est constituée par les composants du milieu y compris l'eau, les réactifs et les suppléments spéciaux tels que les sérums et les antibiotiques. Une eau de la plus haute qualité disponible doit toujours être utilisée. Des précautions particulières doivent être prises pour éliminer toutes les traces de métaux, de matières organiques dissoutes et d'endotoxines. Les endotoxines peuvent avoir divers effets sur les cellules cultivées et sont souvent trouvées dans l'eau purifiée sur résines échangeuses d'ions. L'eau purifiée ne doit pas être stockée sur de longues périodes avant utilisation. La qualité de l'eau doit être vérifiée périodiquement en utilisant des tests de croissance sensibles à des densités clonales en comparaison de standards connus (Freshney, 1994, chapitre 7).

Il est sage d'acheter des réactifs chimiques de la plus grande pureté disponible pour éviter les problèmes associés aux contaminants en traces. Ceci est particulièrement important pour les milieux sans sérum, pour lesquels les effets des contaminants ne sont pas masqués par la présence de sérum. Une fois achetés, les réactifs doivent être maintenus dans des conditions de stockage optimales pour éviter toute dégradation de leur qualité. Le même lot de produit chimique devrait être utilisé chaque fois que le milieu est fabriqué; quand un lot est remplacé, le nouveau lot de milieu doit être immédiatement comparé à un lot précédent pour assurer une bonne reproductibilité de lot à lot.

Tampons

Après le mélange, le milieu est tamponné par l'ajout de bicarbonate de sodium et ajusté au pH adéquat. Il est également utile de vérifier l'osmolarité; des erreurs dans l'ajout de réactifs peuvent être découvertes grâce à une déviation inattendue de l'osmolarité.

Beaucoup de problèmes de croissance sont provoqués par un manque de CO_2, inférieur au niveau requis par le système tampon bicarbonate. Cela se traduit par un manque de stabilité du pH ce qui peut nuire à la fixation des cellules et à la croissance. Habituellement, plus la concentration de bicarbonate de sodium est élevée, plus la quantité de CO_2 nécessaire pour obtenir un pouvoir tampon optimal est importante (Tableau 2).

Le système le plus commun est un milieu tamponné avec des sels de Earle (Earle's Balanced Salts) contenant 2,2 g/L de bicarbonate de sodium. Ce système est conçu pour une culture en récipients ouverts (boîtes, micro-plaques, ou flacons) qui permettent les échanges gazeux en environnemnt humidifié enrichi en CO_2 (en général 5%). Un deuxième système est un milieu tamponné avec des sels de Hanks (Hank's Balanced Salts) ne contenant que 0,35 g/L de bicarbonate de sodium. Ce système tampon est conçu pour être utilisé en récipients scellés ou étanches aux gaz et n'est pas adapté pour les boîtes et les microplaques.

Souvent, les systèmes tampons à base de bicarbonate ci-dessus sont complétés par l'ajout d'HEPES, un tampon organique largement utilisé. L'utilisation de ce tampon organique peut entraîner des problèmes supplémentaires lors de l'exposition du milieu à la lumière fluorescente.

(Pour plus d'informations, voir la section sur la toxicité induite par la lumière fluorescente ci-dessous.)

Tableau 2 : quantités de bicarbonate de sodium nécessaires pour tamponner les milieux de culture communs. Plus la concentration de bicarbonate de sodium est élevée, plus la quantité de CO_2 à ajouter dans l'incubateur est élevée.

Cell culture media	Sodium bicarbonate levels (g/L)	Extra CO_2 needed
Leibovitz's L-15 Medium	None	No
Eagle's MEM with Hanks' salts	0.35	No
Medium 199 with Hanks' salts	0.35	No
Ham's F12	1.176	Yes
DMEM/F12	1.2 to 2.438	Yes
RPMI 1640	2.0	Yes
Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) with Earle's salts	2.2	Yes
McCoy's 5A	2.2	Yes
Medium 199 with Earle's salts	2.2	Yes
MEM Medium with Earle's salts	2.2	Yes
CMRL 1066 Medium with Earle's salts	2.2	Yes
Iscove's Modified Dulbecco's medium	3.024	Yes
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	3.7	Yes

Filtration

La stérilisation par filtration est généralement la dernière étape avant l'addition de tous les suppléments stériles. Deux problèmes potentiels peuvent se produire: d'abord, des substances interférentes présentes dans la membrane peuvent contaminer le milieu et, d'autre part, de précieux composants du milieu peuvent être perdus en se liant à la membrane du filtre. Bien que la plupart des membranes contiennent généralement des traces inoffensives de substances extractibles, certaines membranes de cellulose en particulier peuvent contenir des agents mouillants qui, à des concentrations élevées, peuvent affecter la croissance des cellules. Ces agents peuvent être facilement enlevés en toute sécurité avant utilisation des filtres en passant une petite quantité d'eau chaude ultra-pure à travers le filtre. Certains composants des membranes, tels que le nitrate de cellulose ou le nylon, peuvent se lier à des macromolécules présentes dans le milieu, notamment les peptides et les protéines utilisés comme facteurs de croissance ou d'attachement (Brock, 1983). Des essais doivent être effectués pour s'assurer que ces compléments importants ne sont pas perdus suite à la filtration.

Sérum

Les sérums utilisés comme additifs aux milieux ont longtemps été une source de problèmes pour les cultures cellulaires. Outre le coût élevé du sérum, la qualité et les performances variables, et l'apport potentiel de mycoplasmes, d'endotoxines et d'autres contaminants peuvent poser problème. Bien que de nombreux progrès ont été accomplis dans l'utilisation des milieux sans sérum et des milieux à concentration de serum réduite, beaucoup d'utilisateurs cultivent encore leurs cellules en présence de serum. Lorsque cela est possible, il est toujours conseillé de pré-tester plusieurs lots de sérum avant d'en choisir un pour l'achat. Le test le plus sensible possible et qui reflète l'utilisation prévue de serum doit être utilisé.

La toxicité induite par la lumière fluorescente

L'effet délétère de la lumière fluorescente sur les milieux de culture est une source de cytotoxicité induite chimiquement trop souvent négligée. Il est très important de stocker les

milieux et les cellules en croissance dans le noir, loin des sources de lumière fluorescente qui interagissent avec les composants du milieu sensibles à la lumière (riboflavine, tryptophane et HEPES). Ces interactions aboutissent à la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres qui sont toxiques pour les cellules. Ce problème bien documenté est cependant souvent ignoré en cas de problèmes de croissance cellulaire (Wang, 1976, Wang et Nixon, 1978). Comme les effets toxiques sur un milieu mal entreposé augmentent lentement avec le temps, ce problème est particulièrement difficile à identifier. Outre la cytotoxicité directe, d'autres effets néfastes sont induits par la lumière, notamment les mutations génétiques (augmentation des taux de mutation et des aberrations chromosomiques).

Suggestions pour la résolution des problèmes

Ce guide a tenté d'identifier et de résoudre certaines des causes fondamentales des problèmes de culture cellulaire. Beaucoup d'autres problèmes peuvent se produire. Voici quelques étapes recommandées qui peuvent être utilisées pour vous aider à identifier les causes des problèmes que vous rencontrez :

1. Identifier et définir clairement le problème. Ceci peut exiger des tests supplémentaires pour reproduire le problème. Cela contribue également à partager les problèmes au sein d'une équipe, en utilisant les connaissances et l'expérience de vos collaborateurs.

2. Il est souvent utile de décomposer les problèmes complexes en sous-problèmes qui peuvent être plus facilement compris et traités.

3. Bien organiser les faits reconnus peut être très utile. Soyez précis, reliez les causes et les effets et écarter tous les faits qui sont périphériques au problème central. Ne négligez pas l'évidence. Un problème bien posé est un problème à moitié résolu.

4. Une fois qu'il y a une compréhension claire du problème, commencez par chercher la cause. Ne succombez pas à la tentation de résoudre les problèmes en changeant tout, ceci peut aggraver la situation ou masquer le problème d'origine.

5. Recherchez et réfléchissez à toutes les causes possibles. Identifiez tous les changements qui ont eu lieu dans le laboratoire, dans les cultures, dans les milieux et les solutions, etc. et qui peuvent se rapporter à ce problème. La bonne tenue des notes est essentielle pour cette étape. Ensuite, sélectionnez les meilleures hypothèses et commencez à évaluer si elles contribuent réellement au problème. Soyez créatif ! Cela peut nécessiter des tests et des expérimentations.

6. Déterminez et mettez en œuvre la meilleure solution sur le long terme, non seulement pour résoudre le problème, mais aussi pour prévenir sa réapparition. Cela nécessite une planification rigoureuse.

Références

1. Amstein, C.F.; Hartman, P.A.: Adaptation of Plastic Surfaces for Tissue Culture by Glow Discharge. J. Clin. Microbiol. 2:46¬54, 1975.
2. Brock, T.D.: Membrane Filtration: A User’s Guide and Reference Manual. Madison, Wisconsin: Science Tech, 1983.
3. Burke, C. N.; Croxall, G.: Variation in Composition of Media and Reagents Used in the Preparation of Cell Cultures From Human and Other Animal Tissues: Dulbecco’s, Earle’s, and Hank’s Balanced Salt Solutions. In Vitro 19: 693¬698, 1983.
4. Freshney, R.I.: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. New York: Allan R. Liss, Inc. Third Edition, 1994.

5. Hudis, M. Plasma Treatment of Solid Materials. in Hollahan, J. R.; Bell, A. T.; Ed. Techniques and Applications of Plasma Chemistry. New York: John Wiley and Sons, 113¬147, 1974.
6. Jakoby, W. B. and Pastan, J. H.: Ed. Methods in Enzymology: Cell Culture. (Especially Chapters 1, 2, 5, 7 and 10) Vol. 58, New York: Academic Press, 1979.
7. Lincoln, C.K. and Gabridge, M.G. Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Preven¬tion and Elimination. In Animal Cell Culture Methods, edited by J. P. Mather and D. Barnes, Methods in Cell Biology, Volume 57, Chapter 4, Academic Press, San Diego, 49¬65, 1998.
8. MacMichael, G. J.: The Adverse Effects of UV and Short Wavelength Visible Radiation on Tissue Culture. American Biotechnology Laboratory: July/August, 1986.
9. Masover, G. K.; and Buck, D. W.: Detecting Mycoplasmas in Cell Cultures. MD & DI: 43¬98, 1983.
10. McGarrity, G. J. Spread and Control of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures. In Vitro 12:643¬647, 1976.
11. McGarrity, G. J.; Sarama, J.; and Vanaman, V.: Cell Culture Techniques. (Excellent overview of mycoplasma contamination) ASM News 51:170¬183, 1985.
12. McGarrity, G. J.: Detection of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures. In K. Maramorosch; Ed. Advances in Cell Culture. Vol. 2, New York, Academic Press, 99¬132, 1982.
13. Ramsey W. S.; Herti, W.; Nowlan E. D.; Binkowski N. J.: Surface Treatments and Cell Attachment. In Vitro 20: 802 ¬808, 1984.
14. Rottem, S. and Barile, M. F. Beware of Mycoplasmas. Trends in Biotechnology 11:143¬150, 1993.
15. Ryan, J.: Understanding and Managing Cell Culture Contamination. Corning Life Sciences Technical Bulletin. This is available on the Corning Life Sciences web site at www.corning.com/ lifesciences.
16. Tchao, R. Fluid Shear Force and Turbulence¬Induced Cell Death in Plastic Tissue Culture Flasks. In Vitro Toxic. 9:93¬100, 1996.
17. Wang, R. J.: Effect of Room Fluorescent Light on the Deterioration of Tissue Culture Medium. In Vitro 12: 19¬22, 1976.
18. Wang, R. J. and Nixon, B. T. Identification of Hydrogen Peroxide as a Photoproduct Toxic to Human Cells in Tissue Culture Medium Irradiated with “Daylight” Fluorescent Light. In Vitro 14:715¬722, 1978.
19. Waymouth, C.: Osmolality of Mammalian Blood and of Media for Culture of Mammalian Cells. In Vitro 6: 109¬127, 1970.

CORNING