

细胞培养

- 1、首先，观察细胞培养瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象。
- 2、用75%酒精擦拭细胞培养瓶表面，显微镜下观察细胞状态。因运输问题，部分贴壁细胞会有少量从瓶壁脱落；先不要打开培养瓶盖，将细胞置于细胞培养箱内静置培养2-4小时，以便稳定细胞状态。
- 3、仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如贴壁特性（贴壁/悬浮）、细胞形态、所用基础培养基、血清比例、所需细胞因子、传代比例、换液频率等。
- 4、静置完成后，取出细胞培养瓶，镜检、拍照，记录细胞状态（所拍照片将作为判断依据）；建议细胞传代培养后，定期拍照、记录细胞生长状态。
- 5、贴壁细胞：若细胞生长密度超过80%，可正常传代；若未超过80%，移除细胞培养瓶内培养基，预留5ml左右继续培养，直至细胞密度达80%左右再进行传代操作，瓶盖可稍微拧松。
- 6、悬浮细胞：将细胞培养瓶内液体全部转移至50ml无菌离心管内，1200rpm离心5min，离心后上清培养基可收集备用，管底细胞沉淀加入5ml培养基吹打、重悬。镜检时，若细胞密度超过80%，可将细胞悬液分至2个细胞培养瓶内培养，补加培养基至5ml；若细胞密度未超过80%，将细胞悬液移至原瓶继续培养，直至细胞密度达80%左右时再进行传代操作。

温馨提醒

- 1、可将培养瓶内多余的培养基转移至50 ml无菌离心管中，备用；细胞首次传代时，可以将该培养基按照一定比例和原有的培养基混合使用，让细胞逐渐适应培养条件。
- 2、确认细胞状态良好后，应及时将部分细胞冻存，再进行后续的实验，避免后期实验失误可能发生细胞污染或死亡而导致的细胞丢失。
- 3、建议收到细胞后前3天，100X、200X、400X各拍3张细胞照片，记录细胞状态，便于后续有问题时沟通交流。

细胞处理

复苏细胞

将含有1mL细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入4mL培养基混合均匀。在1000RPM条件下离心4分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜（或将细胞悬液加入10cm皿中，加入约8ml细胞培养基，培养过夜）。第二天换液并检查细胞密度。

细胞传代

如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。对于贴壁细胞，传代可参考以下方法：弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1-2次。加2 ml消化液（0.25% Trypsin-0.53mM EDTA）于培养瓶中，置于37℃培养箱中消化1-2分钟，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加少量培养基终止消化。按6-8ml/瓶补加培养基，轻轻打匀后吸出，在1000RPM条件下离心4分钟，弃

去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀。将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

细胞冻存

待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。下面T25瓶为例：细胞冻存时，弃去培养基后，PBS清洗瓶底1-2次后加入1ml胰酶，细胞变圆脱落后，加入2ml完全培养基终止消化，可使用血球计数板计数。1000RPM离心5分钟去掉上清。用血清重悬浮，加DMSO至最终浓度为10%。加入DMSO后迅速混匀，按每1ml的数量分配到冻存管中，注意冻存管做好标识。按每个冻存管细胞数目大于 1×10^6 个细胞冻存。将冻存管置于程序降温盒中，放入-80度冰箱，至少2个小时以后转入液氮灌储存。记录冻存管位置以便下次拿取。

细胞运输和保存

可选择干冰运输及发送复苏存活细胞方式：（1）干冰运输，收到后立即转入液氮冻存或直接复苏；（2）存活细胞，收到后应继续生长，传代达到细胞生长状态良好时，再进行冻存。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台

