

# 细胞复苏、传代与冻存操作流程

## 一、仪器与试剂

仪器	试剂	耗材
离心机	胎牛血清（FBS）	离心管（15ml、50ml）
生物安全柜	无菌 1×PBS pH=7.2	T-25 细胞培养瓶
电动移液器	0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA	一次性无菌移液管（2ml、5ml、10ml）
CO <sub>2</sub> 培养箱	完全培养基（含血清）	1.8mL 冻存管
倒置显微镜	冻存液：90%FBS+10%DMSO	程序降温盒
液氮罐	异丙醇	
恒温水浴锅		
超低温冰箱		

护目镜、厚毛线手套等

## 二、操作流程：

### 复苏

- 1) 将恒温水浴锅中的水预热到 37℃；
- 2) 准备一支 15ml 离心管，加入 5ml 含 10%FBS 的完全培养基，放入 37℃ 水浴锅中预热；
- 3) 戴上护目镜，厚毛线手套后，从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入 37℃ 恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率；
- 4) 将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中，混匀后，1000rpm 离心 5min；
- 5) 准备一个 T-25 培养瓶，写上细胞名称、日期，再加入 4ml 完全培养基；
- 6) 离心完成后弃去上清，用 1ml 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，混匀后转入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养静置。

**注意：**从液氮中取出细胞冻存管时，若冻存管内有液氮进入，需拧松冻存管，排出内部残留的液氮，之后拧紧冻存管，置于干冰上，然后放入 37℃ 水浴中，避免温差太大造成液氮快速化而爆炸。

## 传代 (细胞传代建议一传二)

- 1) 当细胞汇合度达到 85%以上时, 可进行传代。
- 2) 在生物安全柜内, 打开培养瓶瓶口, 收集瓶内的培养基;
- 3) 向培养瓶内加入 3ml 无菌的 1×PBS 后, 水平放置培养瓶, 使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积, 吸弃 PBS;
- 4) 向瓶内加入消化液 1ml, 浸润底面后放入 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2min;
- 5) 孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起, 若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中, 将悬液吸入 15ml 离心管;

注: 如还有部分细胞未消化下来, 可采用分步消化:

- ① 准备一个无菌的 15ml 离心管, 加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基;
- ② 将消化下来的细胞吸入①中的离心管内中和 (避免吹
- ③ 向之前消化的培养瓶中加入 1ml 胰酶继续消化 2min 左右, 轻拍培养瓶, 95%左右细胞脱落后加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中和, 中和后的细胞悬液移入①中的离心管。

- 6) 1000rpm 离心 5min;
- 7) 准备两个新的 T-25 培养瓶, 各加入 4ml 完全培养基。
- 8) 离心完成后, 弃上清, 用 2ml 完全培养基重悬离心细胞, 将重悬后的细胞转入 2 个 T-25 培养瓶, 每个培养瓶各 1ml;
- 9) 水平放置培养瓶, 震荡混匀后, 将培养瓶置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。

## 冻存 (细胞冻存建议每瓶 T25 冻一支)

- 1) ~6) 参照传代步骤
- 7) 离心完成后, 弃上清, 用 1mL 冻存液重悬细胞沉淀, 然后转入 1.8ml 冻存管中;
- 8) 将冻存管转入充满异丙醇的程序降温盒中, 之后转入-80℃冰箱中过夜降温;
- 9) 第二天, 取出降温完成的序降温盒中的冻存管, 尽快转入液氮罐中保存。