

# 使用说明书:贴壁细胞复苏和培养

## 接收样品

细胞产品使用干冰冷藏运输。收到细胞后,可直接放置液氮保存。建议接收细胞后的一周内进行复苏和传代。

## 复苏和培养

1. 水浴锅37°C预热。
2. 准备好细胞完全培养基,温浴到37°C。
3. 取15 mL离心管中加入9 mL完全培养基。
4. 从液氮中取出冻存的细胞,立即放入-80°C冰箱(目的是让进入冻存管的液氮挥发)。
5. 在-80°C放置2~3 min后,取出冻存细胞,将冻存管迅速放入37°C水浴锅中,快速晃动使管中内含物尽快融化。仔细观察,待冻存管内含物完全融化后取出。

**注意:**

  - ① 尽可能避免没过管帽,以减少污染的风险。
  - ② 要快速完成细胞复苏过程,融化过程时间过长,会造成复苏后的细胞活性较差。
6. 用70%~75%的酒精擦拭消毒冻存管口的外表面。
7. 在超净台中打开冻存管,用吸管将细胞冻存悬液转移至装有9 mL完全培养基的15 mL离心管中。注意避免产生气泡。
8. 为了减少细胞损失,再往冻存管中加入1 mL完全培养基,稍微吹打,收集至离心管中。
9. 将细胞悬液经250 ×g(如使用Eppendorf 5810R离心机,对应转速为1134 rpm)离心5 min。
10. 离心后尽量去除上清液,加入1~2 mL的完全培养基(已预热到37°C),轻轻吹打混匀细胞沉淀。
11. 将细胞全部接种到1个T25培养瓶或底面积相当的培养器皿中,加入足量的完全培养基。轻轻摇晃细胞培养器皿使细胞均匀分布。
12. 放入37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。
13. 复苏后的第2天,给复苏的细胞换用新鲜的完全培养基(已预热到37°C)。
14. 之后,每2天给细胞换新鲜的完全培养基直到细胞达80%~90%的汇合度。
15. 当细胞达80%~90%的汇合度,进行消化传代。

## 细胞冻存

一般细胞传代3次后即可分出小部分细胞进行冻存。

1. 配制细胞冻存液:70% DMEM、20% 血清(FBS)、10% 二甲基亚砜(DMSO)。室温下待用。
2. 将消化的细胞使用PBS清洗后,加入1-2 mL完全培养基重悬细胞,轻轻吹打混合均匀。细胞计数,计算细胞重悬液的细胞浓度。
3. 离心,弃去上清。加入适量细胞冻存液,使得细胞终浓度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞/mL。
4. 轻轻吹打混合均匀细胞,然后分装至2 mL冻存管。分装体积不超过1 mL。
5. 在冻存管上标记细胞名称、冻存日期与操作人。
6. 冻存程序以梯度降温方式进行:将冻存管置于4°C冷冻10分钟,然后转移至-20°C冷冻30分钟,然后转移至-80°C冷冻16~18小时(或隔夜),最后放入液氮长期储存。
7. 液氮下冻存的细胞一般可保存3年。