## 一、仪器与试剂

细胞复苏、传代与冻存操作流程

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **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） |
| CO2 培养箱 | 完全培养基（含血清） | 1.8mL 冻存管 |
| 倒置显微镜  液氮罐 | 冻存液：90%FBS+10%DMSO  异丙醇 | 程序降温盒 |
| 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

CO2 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气**

**化而爆炸。**

## （细胞传代建议一传二）

**传代**

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℃ CO2 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**（避免吹打）；**

**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中的离心管内**

1. 1000rpm 离心 5min；
2. 准备两个新的 T-25 培养瓶，各加入 4ml 完全培养基。
3. 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；
4. 水平放置培养瓶，震荡混匀后，将培养瓶置于 37℃，5%CO2 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

1. 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；
2. 将冻存管转入填充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃冰箱中过夜降温；
3. 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。

# 赛百慷（上海）生物技术股份有限公司

**注册地址：中国（上海）自由贸易试验区希雅路 11 号 14 号楼 4 楼**

**办公地址：上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 2 楼电话：400-021-2021**

**网址：**[**www.icellbioscience.com**](http://www.icellbioscience.com/)