细胞培养基础

0、养细胞要用心，每天固定时间观察，并做相应处理。

**越快越好：细胞换液、传代、铺板、冻存、复苏，都越快越好，折腾时间越久、次数越多，细胞状态越差，越容易污染，培养箱是细胞最适宜的环境。**

细胞培养基础：消化、计数、传、铺、扩、冻、复。H1、D1、H5、95。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 传、铺、扩 | W6 | W12 | W24 | W48 | W96 | T25 | T75 |
| Area/cm2 | 9.6 | 4 | 2 | 1 | 0.32 | 25 | 75 |
| Medium/mL | 2 | 1 | 0.5 | 0.2 | 0.1 | 5-6 | 15-18 |
| Seeding/万 | 40 | 20 | 10 | 5 | 0.4-6 | 100 | 300 |
| Confluency/万 | 150 | 80 | 40 | 20 | 5 | 400 | 1200 |
| 0.25%Trypsin/mL | 0.4 | 0.2 | 0.1 |  | 护城 | 1 | 3 |

**表格Confluency仅为估计值，若铺、冻等还以严格细胞计数为准。**

**Seeding数不绝对：**若尽快长满Scratch，W6可80万；若单细胞轴向比、胞膜外突，W6可10-15万。普通铺板后5d长满，收PRO/RNA，或传铺冻等。

1、细胞：H5贴壁，长满后可双层长，很少漂浮，可PBS洗\*2；H1贴壁或悬浮，长满后较易漂浮，**仅PBS洗\*1。**H5小、倍增快、单细胞活力也很强、不怕稀、T25可达450万、一传四，H1大、倍增慢、单细胞活力很弱、很怕稀、T25约350万、一传三。（不要用D35小眼睛铺板，需放进大皿不方便）

2、消化稀释计数：消化1-3min。胰酶终止离心后，先1mL吹散，再稀释至所需传、铺的总体积，约20万/ml，10ul计数，四角平均。**消化后吹打脱壁用吸管，避免细胞破碎。**1ml枪重悬稀释混匀应轻柔，**反复吹打，注意枪头过满倒吸。**

3、换液、传代：3-4天配液变黄，换液。70%-80%后换一次液，使细胞吃饱喝足，过夜后传代。

4、皿、孔、瓶：收PRO/RNA用W6；D60、D100、D150已经拆开的易污染，若用于扩细胞，直接拆新包；T75扩细胞用于新细胞系、或动物实验需注射大量细胞；T25最常用，注意用带滤膜的。

5、铺：同一个时间点不同处理铺同一板，不同时间点铺不同板。**50ml离心管内Medium稀释到总终体积，如铺6孔 W6 2ml/孔、2瓶T25 6ml/瓶，则稀释到总终体积24ml，50ml离心管内吹打均匀；分铺时先用1ml Medium重复使用润湿所有孔底，然后加入细胞悬液，快速大幅度十字晃动5次，以保证铺板均匀。**

6、冻：**切记冻存盒放入-80。**消化离心后，4°C血清配冻存液，1ml/支，适当富余，0.22um过滤，冻存液稍微吹打重悬，分装。150-200万/支。冻3-4百万/支。冻存液配方：FBS:DMSO = 900:100uL，一次可多配点，3周内可用。

7、复：37°水浴预热，2-3min观察，融化后立即离心，10% 重悬，1支复1瓶T25，若时间久、细胞损失较多、复1瓶很稀，则3支复1瓶，或2支复一孔W6。