

## ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：（技术）SOP-2.14 版次：01

细胞传代及收集标准操作规程		修订年份： 2012 年
修 订 人：潘傅晶	审 核 人：	批 准 人：
修订日期：2012.9	审核日期：	批准日期：
颁发部门：	分发部门：	生效日期：

### 细胞传代及收集标准操作规程

1. 目的及原理 防止细胞生长过于密集，保持细胞活力。
2. 适用范围：本实验方法适用于细胞实验人员进行细胞传代及收集的各项操作。
3. 人员职责：
4. 器材仪器试剂

各型号的移液枪及枪头、细胞计数器、倒置显微镜、PBS 溶液、胰蛋白酶溶液、完全培养基、无血清培养基 CO<sub>2</sub> 培养箱等。

#### 5. 操作步骤

- 5.1 从培养箱中取出培养瓶，目测检查培养基颜色是否为橘红色。
- 5.2 将培养瓶置于显微镜下，观察细胞形态及覆盖率，显微镜用好后需将灯光调至最低档，然后关掉。
- 5.3 将培养瓶转入超净台内。
- 5.4 以移液器吸出培养瓶内原有的培养基，并加入 5mlPBS 清洗（除去瓶内少量的培养基及死细胞），再以移液器吸出 PBS，重复 1-2 次。
- 5.5 加入适量消化液（0.25%胰酶-0.02 EDTA 溶液）消化细胞，加入量以消化液刚好能够覆盖到培养瓶中的单层细胞为准(通常 T75 的培养瓶 加入 1ml 消化液，T175 的培养瓶加入 2ml 消化液)，慢慢转动培养瓶 使消化液覆盖到所有的细胞，然后将培养瓶 转入培养箱 1min 后取出镜下观察，待细胞变圆后且略有松动时，轻拍培养瓶壁，协助细胞从壁上脱落。
- 5.6 加入 3ml 含血清培养液，终止细胞消化。

5.7 以移液器分别吹打培养瓶上、中、下部位的细胞，保证细胞脱壁。然后反复吹打培养瓶中的细胞（咀嚼），形成单个分散的细胞悬液。

5.8 将所有细胞悬液集中在一个 T75 的培养瓶中，混匀，进行细胞计数，根据计数结果，计算细胞数量。

5.9 将总的细胞混悬液转入离心管（15 or 50 ml）中，常温下，以 1000rpm，5min 条件离心，弃上清。

5.10 根据细胞总数及所需得到的细胞密度，计算并加入所需量的无血清培养基，使细胞单个分散均匀，并将细胞分装成 1 ml 每小管。

## 6. 注意事项

6.1 加入消化液后在培养箱内不宜超过 1 分钟，否则容易影响细胞活力。

6.2 不能用 PBS 或者是无血清培养液。

6.3 分装好的小管应立即放置冰上，转移出细胞房，送至动物房。