

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：（技术）SOP-2.15 版次：01

细胞冻存标准操作规程		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：

细胞冻存标准操作规程

1. 目的及原理

细胞冻存的基本原则是慢冻，实验证明这样可以最大限度的保存细胞活力。目前细胞冻存多采用甘油或二甲基亚砷作保护剂，本实验室采用二甲基亚砷。这两种物质能提高细胞膜对水的通透性，加上缓慢冷冻可使细胞内的水分渗出细胞外，减少细胞内冰晶的形成，从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。

2. 适用范围：本实验方法适用于细胞实验人员进行细胞冻存的各项操作。

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、CO₂ 培养箱等。

5. 操作步骤

5.1 冻存液的配制（配方：90% 含 10%胎牛血清的培养液：10% DMSO ），按配方在冻存细胞前预先配制好。

5.2 首先用吸管吸出培养瓶中的细胞生长培养液，然后以 PBS 清洗细胞(除掉剩下的少量培养液及悬浮的死细胞)，再用吸管吸出所加入的 PBS。

5.3 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 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 1-2min 后取出观察，待细胞略有松动，轻拍培养瓶

壁，协助细胞从壁上脱落，

5.4 加入 3ml 含 10%胎牛血清的培养基，终止细胞消化。

5.5 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。

5.6 将单个分散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。

5.7 按照 1×10^6 细胞/ml 的浓度，将细胞重新混悬于冻存液中，并转入冻存管中。

以 marker 笔在冻存管上标明细胞名称，冻存时间，冻存代数，冻存人等信息。

5.8 将冻存管放入程序冻存盒中，然后转入-80℃冰箱内冷冻过夜。

5.9 将-80℃过夜冷冻的冻存管转入液氮罐中的冻存小盒中

5.10 建立冻存细胞库的地图，记录其放置位置，液氮长期冻存。

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 或者无血清培养液。

6.3 细胞消化不能太过否则严重影响细胞活力。

6.4 冻存信息要写全。

6.5 不要忘记将冻存管转入液氮中。

6.6 放入细胞后，要及时更新细胞库，并作详细记录。

6.7 冻存小盒拿出时间不宜过长。