



SOP-CELL-003-细胞冻存

1.使用工具:

显微镜	移液器	离心管板架	冻存管板架	离心机	冻存盒
-----	-----	-------	-------	-----	-----

2.使用耗材:

培养基	5ml 离心管	枪头	DMSO
胰酶	冻存管	Gibco 血清	PBS

3.实验过程:

- 3.1 冻存前一天, 将密度为 80%的细胞以 1:2 比例传代一次
- 3.2 冻存当天, 将前一天传代过后的处于对数生长期的细胞从培养箱取出
- 3.3 吸掉皿中原有培养基
- 3.4 加入 3mlPBS 缓冲液, 均匀摇晃皿, 使 PBS 可清洗到皿每个角落
- 3.5 洗掉清洗用的 PBS 缓冲液
- 3.6 加入 1ML 胰酶, 均匀摇晃皿, 使胰酶可均匀接触到皿每个角落
- 3.7 将加完胰酶已摇晃均匀的皿放回 37 度培养箱
- 3.8 消化一定时间 (一般为 1min 到 2min 之间), 取出细胞皿
- 3.9 将皿拿于左手, 用右手沿着皿壁轻轻拍打, 看到细胞有滑落即为消化好
- 3.10 上一步操作也可换为在显微镜下见细胞变圆即可
- 3.11 加入 2ml 相应培养基与 10cm 皿中终止消化
- 3.12 均匀摇晃已经加入终止液的细胞皿
- 3.13 使用 1ml 移液器, 对细胞进行吹打, 使其成为单细胞悬液
- 3.14 吹打结束后, 吸取全部液体到 5ml 离心管
- 3.15 将离心管标记好之后, 置于离心机中以 800RPM 离心 5min
- 3.16 配置冻存液, 配方为 80%基本培养基+10%Gibco 血清+10%DMSO
- 3.17 离心结束后, 将离心管中上清倒去
- 3.18 以每个 10cm 皿加 1ml 冻存液的量, 加入冻存液
- 3.19 将冻存液-细胞吹打均匀为单个细胞悬液后以每管 1ml 量加入冻存管
- 3.20 将冻存管置于冻存盒中, 放置于 4 度冰箱 1H
- 3.21 将 4 度冰箱冻存盒取出, 置于-20 度冰箱 1H
- 3.22 将-20 度冰箱冻存盒取出, 置于-80 度冰箱 96H
- 3.23 将-80 度冰箱冻存盒内细胞转移至液氮罐长期保存

4.注意事项

- 4.1 细胞一定要吹打为单个细胞悬液
- 4.2 冻存液先置于 4 度冰箱预冷
- 4.3 要梯度降温, 遵循“慢冻快融”原则