

细胞培养

1.细胞复苏

在复苏细胞前，打开恒温水浴锅并加热至 37 °C,从-80 °C冰箱取出待复苏细胞，置于水浴锅中加热融化，期间持续摇晃，加速融化并避免冰晶对细胞造成损伤。待冻存管内细胞完全融化后，置于常温离心机中，800 rpm 离心 3~5 min。酒精消毒后放入超净台，吸弃冻存液，再加入 1 mL 完全培养基，吹打均匀，重悬后打入新的 10 cm 培养皿中，再加入 10 mL 新鲜完全培养基，轻轻摇晃，使细胞分布均匀，最后置于 37 °C , 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

2. 细胞传代

在细胞传代前，先用显微镜观察细胞状态，状态良好，无污染且密度达到 85%~95%之间，酒精消毒后于超净台进行传代。将培养皿中原有培养基吸弃，再每皿加入 1~2 mL Phosphate Buffer Saline (PBS) 缓冲液，覆盖底面即可，盖上盖子轻轻摇晃培养皿，完全润洗后，吸弃 PBS，重复一次后，加入 300~1000 μL 胰酶进行消化，加入胰酶后轻轻摇晃培养皿，使其完全覆盖底面，视细胞贴壁能力不同选择吸弃胰酶或保留胰酶浸泡消化，待细胞变圆后，加入 1-2 mL 新鲜完全培养基终止消化。轻轻吹打并将消化下来的细胞收集于 15 mL 离心管中，做好标记，于室温离心机 500 rpm 离心 3~5 min，待离心结束后，将离心管酒精消毒后置于超净台内，吸弃上清，视沉淀大小用 1~2 mL 新鲜完全培养基将细胞重悬，并平均分配至 2~5 个新的培养皿中，每皿加入新鲜培养基后，轻轻晃动培养皿使细胞分布均匀，最后置于 37 °C , 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

3. 细胞冻存

在细胞冻存前，先用显微镜观察细胞状态，状态良好，无污染且密度达到85%~95%之间，酒精消毒后于超净台进行传代。将培养皿中原有培养基吸弃，再每皿加入 1~2 mL PBS，覆盖底面即可，盖上盖子轻轻摇晃培养皿，完全润洗后，吸弃 PBS，重复一次，加入 300~1000 μ L 的胰酶进行消化，加入胰酶后轻轻摇晃培养皿，使其完全覆盖底面，待细胞变圆后，加入 1~2 mL 新鲜完全培养基终止消化。轻轻吹打并将消化下来的细胞收集于 15 mL 离心管中，做好标记，于室温离心机 500 rpm 离心 3~5 min，待离心结束后，将离心管酒精消毒后置于超净台内，吸弃上清，视沉淀大小用 1~2 mL 无血清冻存液重悬细胞，并加入冻存管内，做好日期、细胞系和冻存人员的标记，液氮速冻后保存于-80 °C冰箱中。