

培养和冻存条件须知

培养和冻存条件准备

- A. 准备 DMEM 培养基 ;优质胎牛血清 10% ;GlutaMAX-1 谷氨酰胺 1% ;HEPES 1M Buffer solution 1% ;双抗 1%
- B. 气相 : 空气 95% ; 二氧化碳 5% ; 温度 37 摄氏度 ; 培养箱湿度为 70%~80%
- C. 冻存液 : 90%血清+10%DMSO 现用现配 , 冷却后使用

活细胞培养操作程序	冻存细胞的复苏
<p>①有些细胞在物流运送过程中会因振动或者抛掷导致细胞从瓶壁脱落和脱落后成团的情况。若显微镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下,可去除培养瓶中灌液培养基,加入新配制的完全培养基 6~8mL,放到细胞培养箱中继续培养。若有未贴壁的细胞需要离心回收,重悬打入到原培养瓶中。若细胞生长密度达 80%~90%以上,可以对细胞进行传代处理。传代过程中,若因运输振动或者抛掷导致脱落的细胞同样需要离心回收。</p>	<p>①将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37°C水浴中迅速摇晃解冻,融化过程必须晃动冻存管,但是晃动时应避免水没过管盖造成污染。这样才能让冻存液融化迅速、均匀;解冻后用 75%酒精擦拭冻存管外表面,在超净台中打开冻存管,用移液枪吸取细胞冻存悬液,转移至已经预热好的含有 4~6mL 完全培养基的离心管中混合均匀。如有必要可用 1 mL 预热好的完全培养基洗涤冻存管 1 次,收集残留细胞,减少损失。在 1000RPM 条件下离心 3~5min,弃去上清液,用预热好的完全培养基重悬细胞,然后将细胞悬液加入到已经预热好的含有 5ml 完全培养基的 T25 培养瓶(或 60mm 皿)中摇匀置于 37°C培养箱过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。</p>

②换液:细胞在没有长满的情况下,需要在完全培养基营养枯竭前进行更换,通常为 48~72 小时需要更换一次新鲜完全培养基,换液是不需要 PBS 润洗细胞的,抽出旧培养基轻柔注入预热好的新鲜完全培养基即可。注意,由于细胞贴壁不牢,抽出旧培养基后不要丢弃收集起来,液体存在脱落和悬浮细胞,进行该部分的离心,无论离心后是否能观测到沉淀均用完全培养基重悬离心管打回原瓶。

③细胞传代:如果细胞密度达 85%~90%,即可进行传代培养。

- A. 收集:将培养瓶中的悬浮的细胞收集到离心管中。用不含钙、镁离子的 PBS 润洗培养容器上的细胞 1-2 次。由于细胞贴壁不牢 PBS 润洗后细胞会脱落所以 PBS 也要回收离心管中。

- B. 加入 0.25% (w/v) 胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中 (T25 瓶 1~2mL, T75 瓶 2~3mL), 置于 37°C 培养箱中消化 1~2 分钟 (难消化的细胞可以适当延长消化时间), 然后在显微镜下观察细胞消化情况, 若细胞大部分变圆并脱落, 灭菌培养耗材后迅速拿回操作台, 左手虎口紧握住培养瓶左壁, 右手轻敲几下培养瓶底部和右侧, 依靠震动根据惯性原理脱落细胞, 这一步绝不可用移液枪吹落细胞, 后加入 3~6ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。
- C. 将收集到的悬浮细胞、PBS 清洗液中的细胞和消化下来的贴壁细胞轻轻打匀合并到离心管, 在 1000RPM 条件下离心 3~5min, 弃去上清液, 补加 1~2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1:2 的比例分到新 T25 瓶中, 添加 5~6ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力, 后续传代根据实际情况按 1:2~1:3 的比例进行。

④细胞冻存: 收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。

下面 T25 瓶为例:

- A. 细胞冻存时按照细胞传代操作的过程收集中和消化好的细胞到离心管中, 可使用血球计数板计数, 来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml。
- B. 1000rpm 离心 3~5min, 去掉上清。用配制好的细胞冻存液重悬细胞, 按每 1ml 冻存液含 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml 分配到一个冻存管中, 将细胞分配到冻存管中后标注好名称、代数、日期等信息。
- C. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中, -80 度冰箱中过夜, 之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

北京伊事达科技有限公司

电话: 13564444959

官网: www.followme-shop.com

地址: 北京市海淀区东北旺西路58号尚科办公社区C区一楼



公众号



客服