

细胞培养操作说明

复苏:

1. 从液氮中取出细胞冻存管，快速将其置入 37℃水浴中解冻直至冻存管中无结晶，75%的酒精擦拭冻存管外壁；
2. 将冻存管中的细胞移至含 6ml 完全培养基的 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；
3. 弃上清，沉淀用 6ml 完全培养基重悬，接种 25cm² 培养瓶，于 37℃，5%CO₂ 细胞培养箱中培养；

传代:

(1) 贴壁细胞:

1. 细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃 25cm² 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；
2. 添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1ml 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5ml 完全培养液终止消化，再轻轻敲打细胞使之脱落，将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；
3. 弃上清，沉淀细胞用 1-2ml 完全培养基重悬，按 1:2 比例进行分瓶传代，补加培养基后放入 37℃，5%CO₂ 细胞培养箱中培养；

(2) 悬浮细胞:

待细胞达到 1×10^6 /ml 左右可按照以下方法换液培养或传代。

方法①: 收集细胞，1000rpm 离心 5min，弃去上清液，补加 1-2mL 培养液后吹匀，将细胞悬液按 1: 2 到 1: 3 的比例分到含培养基的新瓶中。

方法②: 竖立放置培养瓶，细胞沉淀后弃去上半量培养基，将细胞悬液按 1: 2 到 1: 3 的比例分到含培养基的新瓶中。

冻存:

1. 离心收集细胞并进行计数(参考离心条件: 1000rpm, 5 min)。彻底移去离心管中的上清液；
3. 加入适量的无血清细胞冻存液(EK-Bioscience 货号: S002)于离心管中，调整细胞浓度至 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL。轻柔混匀，制成细胞冻存悬液；
4. 将离心管中的细胞冻存悬液分装于已标示完全的冻存管中；
5. 直接将含细胞悬液的冻存管放入-80℃冰箱，长期冷冻保存或转入液氮。