



细胞使用说明书

1. 到货须知

1) 观察: 收到细胞后, 请迅速检查并拍照记录以下信息: 对于室温或 4°C 运输的细胞 (细胞在 T25 细胞培养瓶中), 确认 T25 培养瓶的完整性, 培养液有无泄漏或浑浊等异常; 对于干冰运输的细胞 (细胞在冻存管中), 核实干冰是否完全挥发以及细胞有无解冻。若发现异常情况, 请及时联系 18616107285(微信同号), 并提供图片到 life-ilab@obiosh.com。

2) 处理:

对于 T25 瓶细胞处理方法: 详见李记细胞产品说明卡。

对于冻存管细胞复苏处理方法:

- ① **消毒:** 75%酒精喷冻存管后, 用干净的纸或酒精棉球擦拭冻存管, 放入超净台。
- ② **准备工具和培养基:** 预热配置的细胞完全培养基 (含胎牛血清), 准备一个新的 15 mL 无菌离心管和一个无菌的 T25 细胞培养瓶。
- ③ **添加培养基:** 将 4 mL 完全培养基添加到 T25 细胞培养瓶, 备用。将 4 mL 完全培养基添加到 15 mL 离心管中, 备用。
- ④ **快速融化:** 准备 37°C 水浴, 迅速取出细胞, 将冻存管放入水浴中摇晃使之融化。
- ⑤ **离心:** 融化完全后的冻存管酒精棉球擦拭, 在超净台中打开冻存管, 用 1 mL 移液器将细胞悬液取出, 加入到步骤 3 准备好的含培养基的离心管中, 混匀, 放入离心机中, 1200 rpm 离心 3-5 min。
- ⑥ **重悬细胞:** 离心停止后取出离心管, 小心地弃上清液, 加入 1 mL 完全培养基, 轻吹打混匀成悬液。
- ⑦ **接种和传代:** 将细胞悬液全部吸取转移到步骤 3 中准备的 T25 细胞培养瓶中, 混匀后放置 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养。次日于显微镜下观察细胞状态, 视情况可换液或直接传代实验。

注意事项:

- ① 在整个操作过程中, 请确保无菌操作, 避免细胞污染。
- ② 对于冻存管细胞, 收到细胞后, 需立即转入液氮冻存或直接复苏, 建议尽快复苏, 提高细胞的存活率。
- ③ 复苏细胞一般采用快速融化法, 以保证细胞外结晶快速融化, 以避免慢速融化水分渗入细胞内, 再次形成胞内结晶损伤细胞。
- ④ 冻存细胞配套提供洗涤液与复苏液, 可替代上述完全培养基使用。试剂使用前置于 37 °C 水浴解冻; 洗涤液用于离心步骤洗涤细胞, 复苏液用于后续细胞接种培养。单支冻存细胞, 推荐使用 3 mL 洗涤液、5-6 mL 复苏液。

2. 传代方法

对于贴壁细胞:

通常情况下, 细胞密度达 80%-90%, 即可进行传代培养。具体传代步骤为: ①**洗涤细胞:** 将细胞培养瓶从培养箱中取出, 倒掉培养基, 用适量的无菌生理盐水 (如 PBS) 润洗细胞 1-2 次; ②**消化细胞:** 向培养瓶中加入适量的消化剂 (如胰酶-EDTA), 轻轻晃动, 使消化剂与细胞充分接触。将培养瓶放回 37°C 培养箱中消化约 1-3 min (根据细胞类型, 这个过程需要时间有差异), 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, 迅速拿回操作台, 轻敲几下培养瓶后加入与消化剂体积相等的完全培养基 (含有胎牛血清), 以停止胰酶作用终止消化。③**收集细胞:** 将细胞悬浮液转移到一个无菌离心管中, 离心 (一般为 1000-1200 rpm, 时间 5-10 min), 将细胞沉降在离心管底部, 离心后, 倒掉上清液并轻轻弹打离心管, 使细胞松散。④**重悬浮和计数:** 向离心管中加入适量的新鲜培养基, 轻轻将细胞悬浮均匀。然后用细胞计数板或自动细胞计数器计算细胞密度。⑤**接种与培养:** 根据细胞密度和预期传代比例, 将细胞分配到新的培养瓶或培养板中。通常, 将细胞密度稀释到适当的水平以保证细胞在接下来的几天内生长良好。置于培养箱中培养。

对于悬浮细胞:

通常情况下, 当细胞密度适中 (具体密度取决于细胞类型) 并且大部分细胞呈圆形、分布均匀时, 可以进行传代。具体传代步骤为: ①**收集悬浮细胞:** 轻轻摇动细胞培养瓶, 使悬浮细胞均匀分布。使用无菌移液器吸取细胞悬浮液, 根据需要进行转移到一个无菌离心管中。离心, 一般为 1000-1200 rpm, 时间 3-5 min, 将细胞沉降在离心管底部。离心后, 倒掉上清液并轻轻弹打离心管, 使细胞松散。②**重悬浮和计数:** 向离心管中加入适量的新鲜培养基, 轻轻将细胞悬浮均匀。用细胞计数板或自动细胞计数器计算细胞密度; ③**接种与培养:** 根据细胞密度和预期传代比例, 将细胞分配到新的培养瓶或培养板中。通常, 将细胞密度稀释到适当的水平以保证细胞在接下来的几天内生长良好。置于培养箱中培养。



对于部分贴壁和部分悬浮的细胞:

这类细胞需要结合贴壁细胞和悬浮细胞的操作进行。①**观察和评估细胞**: 根据贴壁细胞的覆盖程度和悬浮细胞的密度判断是否需要传代。②**收集悬浮细胞**: 轻轻摇动细胞培养瓶, 使悬浮细胞均匀分布。使用无菌移液器吸取细胞悬浮液, 根据需要将其转移到一个无菌离心管中。③**洗涤贴壁细胞**: 用适量的无菌生理盐水 (如 PBS) 润洗细胞 1-2 次; ④**消化贴壁细胞**: 向培养瓶中加入适量的消化剂 (如胰酶-EDTA), 轻轻晃动, 使消化剂与细胞充分接触。将培养瓶放回 37°C 培养箱中消化约 1-3 min (根据细胞类型, 这个过程需要时间有差异), 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, 迅速拿回操作台, 轻敲几下培养瓶后加入与消化剂体积相等的完全培养基 (含有胎牛血清), 以停止胰酶作用终止消化。⑤**收集贴壁细胞**: 将含有脱落的贴壁细胞的培养基倒入之前收集悬浮细胞的离心管中。⑥**离心贴壁和悬浮细胞**: 将含有贴壁细胞和悬浮细胞的离心管放入离心机, 离心 (一般为 1000-1200 rpm, 时间 5-10 min), 将细胞沉降在离心管底部, 离心后, 倒掉上清液并轻轻弹打离心管, 使细胞松散。⑦**重悬浮和计数**: 向离心管中加入适量的新鲜培养基, 轻轻将细胞悬浮均匀。用细胞计数板或自动细胞计数器计算细胞密度; ⑧**接种与培养**: 根据细胞密度和预期传代比例, 将细胞分配到新的培养瓶或培养板中。通常, 将细胞密度稀释到适当的水平以保证细胞在接下来的几天内生长良好。置于培养箱中培养。

注意事项: 在整个操作过程中, 请确保无菌操作, 避免细胞污染。还需注意消化剂的使用时间和浓度, 以免对细胞造成损伤。不同类型的细胞可能需要使用不同浓度的消化剂和处理时间。建议根据特定细胞系的需求进行优化。

3. 细胞冻存

待细胞生长状态良好时, 可进行细胞冻存, 以便长期保存和使用。下面以 T25 瓶为例, 一般的细胞冻存过程为:

- ① **准备细胞**: 从培养箱中取出生长良好的细胞培养瓶, 观察细胞形态和数量。细胞应在传代的最佳时期 (例如, 贴壁细胞达到约 80% 的培养瓶覆盖度, 悬浮细胞密度适中) 进行冻存。
- ② **收集细胞**: 根据贴壁细胞的传代方法收集细胞。
- ③ **离心**: 将收集到的细胞放入离心管, 用离心机离心 (一般为 1000-1200 rpm, 时间 5-10 min), 将细胞沉降在离心管底部。离心后, 倒掉上清液并轻轻弹打离心管, 使细胞松散。
- ④ **添加冻存液**: 向离心管中加入适量的冻存液。常用的冻存液为含有 5-10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide, 二甲基亚砷) 和 40-90% FBS (Fetal Bovine Serum, 胎牛血清) 的培养基。将细胞在冻存液中悬浮均匀。
- ⑤ **分装**: 将含有细胞的冻存液分装到预先准备好的冻存管中。一般每管放置 100-200 万细胞, 视细胞类型和实验室具体要求而定。
- ⑥ **冷冻**: 将装有细胞的冻存管放入一个带有低温冷冻控制的冰箱或冷冻盒中, 进行渐冷至 -80°C。渐冷过程一般需要将细胞放入 4°C 环境 20 min, -20°C 环境 2 h, 然后转移到 -80°C 环境中至少 6 h。这一步的目的是确保细胞内水分在冷冻过程中逐渐排出, 避免冰晶的形成导致细胞破裂。
- ⑦ **液氮储存**: 将已经在 -80°C 冻存过的细胞转移到液氮罐中 (约 -196°C) 进行长期储存。
- ⑧ **记录**: 记录冻存细胞的信息, 包括细胞类型、冻存日期、冻存液成分、细胞数量等。

注意事项:

- ① 在整个细胞冻存过程中, 请确保无菌操作, 避免细胞污染。
- ② 在冻存过程结束后, 务必记录相关信息, 以便日后查询和使用。
- ③ 在一些情况下, 为避免血清中未知成分对实验的干扰, 研究人员可能选择使用无血清冻存液来冻存细胞。一般的操作方法为: 只需将含血清细胞冻存细胞过程中的第 4 步**添加冻存液**, 添加为**无血清细胞冻存液**。第 6 步**冷冻过程**只需将冻存管放入 -80°C 环境 24 h。其他步骤同含血清冻存液的冻存过程。
- ④ 尽管无血清冻存液在某些情况下可能是必要的, 但血清成分对于细胞的生长和存活通常具有保护作用。因此, 在使用无血清冻存液时, 可能需要对细胞的恢复过程进行特殊关注, 以确保细胞的活性和稳定性。在细胞复苏时, 可以使用含血清的培养基来提高细胞的生长和存活率。如有可能, 请根据特定细胞系的需求进行优化。
- ⑤ 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性, 必须在二级生物安全台内操作, 并注意防护, 所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
- ⑥ 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。冻存管浸没在液氮中会泄漏, 并会慢慢充满液氮。解冻时, 液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子, 从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。

【注】: 收到细胞后请及时处理, 一周内发现细胞异常, 请及时联系 021-50778506, 并提供图片到 life-ilab@obiosh.com。