



收到常温细胞后如何处理？

1. 首先，观察细胞培养瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象。若有，请拍照，并及时与技术支持联系（所拍照片将作为后续服务依据）。
2. 用 75%酒精擦拭细胞培养瓶表面，显微镜下观察细胞状态。因运输问题，部分贴壁细胞会有少量从瓶壁脱落；**先不要打开培养瓶盖，将细胞置于细胞培养箱内静置培养 2-4 小时**，以便稳定细胞状态。
3. 仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如**贴壁特性（贴壁/悬浮）、细胞形态、所用基础培养基、血清比例、所需细胞因子、传代比例、换液频率等**。
4. 静置完成后，取出细胞培养瓶，镜检、拍照，记录细胞状态（所拍照片将作为后续服务依据）；建议细胞传代培养后，定期拍照、记录细胞生长状态。
5. 贴壁细胞：**若细胞生长密度超过 80%，可正常传代**；若未超过 80%，移除细胞培养瓶内培养基，**预留 5ml 左右继续培养**，直至细胞密度达 80%左右再进行传代操作，瓶盖可稍微拧松。
6. 悬浮细胞：将细胞培养瓶内液体全部转移至 50ml 无菌离心管内，1200rpm 离心 5min，离心后上清培养基可收集备用，管底细胞沉淀加入 5ml 培养基吹打、重悬。镜检时，若细胞密度超过 80%，可将细胞悬液分至 2 个细胞培养瓶内培养，补加培养基至 5ml；若细胞密度未超过 80%，将细胞悬液移至原瓶继续培养，直至细胞密度达 80%左右时再进行传代操作。

温馨提醒

1. 可将培养瓶内多余的培养基转移至 50ml 无菌离心管中，备用；**细胞首次传代时，可以将该培养基按照一定比例和客户自备的培养基混合使用，让细胞逐渐适应培养条件**。
2. 确认细胞状态良好后，应及时将部分细胞冻存，再进行后续的实验，避免后期实验失误可能发生细胞污染或死亡而导致的细胞丢失，影响后续实验。
3. 建议客户收到细胞后前 3 天，100X、200X、400X 各拍 3 张细胞照片，记录细胞状态，便于后续和技术支持沟通交流。



贴壁细胞传代

1. 从培养容器中吸出用过的细胞培养基并丢弃；
2. 用不含钙、镁的平衡盐溶液冲洗细胞（每 10cm^2 培养表面积约 2mL 溶液）；从与贴壁细胞层相对的容器一侧轻轻加入冲洗液，以避免搅动细胞层，前后摇晃容器数次（注：冲洗步骤可去除可能抑制解离剂作用的少量血清、钙和镁）；
3. 从培养容器中吸出冲洗液并丢弃，**向培养瓶中加入预热的解离剂**；试剂量应足以覆盖细胞层（每 10cm^2 大约 0.5mL）；
4. **轻轻摇晃容器，使试剂完全覆盖细胞层**；吸出多余解离试剂，T25 细胞培养瓶留 200ul 左右即可；
5. 将培养容器在室温下孵育约 2 分钟（**请注意实际孵育时间根据所用细胞系不同而有所差异**）；
6. 在显微镜下观察细胞解离情况；如果解离程度未达 90%，可将孵育时间延长几分钟，**每 30 秒钟检查一次解离情况**；也可轻轻拍打培养容器以加快细胞解离；
7. 细胞解离程度大于等于 90%时，倾斜培养容器，使细胞上液体尽快流尽；加入所用解离剂两倍体积的预热完全生长培养基；吹打细胞层表面数次，使培养基分散；
8. 将细胞转移到 15mL 无菌离心管中，以 $200\times g$ 的离心力离心 3-5 分钟（**请注意离心速度和时间依细胞种类不同而有所差异**）；
9. 用最少体积的预热完全生长培养基重新悬浮细胞沉淀，**将细胞悬液按照推荐比例稀释**，并将适量体积的细胞悬液转移到新的细胞培养容器中，把细胞放回培养箱（注：如果使用培养瓶，将其放入培养箱前应将瓶盖旋松，以便进行充分的气体交换，除非您使用的是通气式培养瓶和透气性瓶盖）。

悬浮细胞传代

方法一：

1. **当细胞适合传代（即：处于对数生长期而未达到汇合状态）时**，从培养箱中取出培养瓶，使用无菌吸管从培养瓶中取出少量细胞样品；如果吸取样品前细胞已经沉淀，应转动培养瓶，使细胞在培养基中均匀分布；
2. 通过此样品，采用血球计数器或细胞计数仪测定总细胞数；计算将细胞稀释到推荐接种密度时需要加入的培养基体积；
3. 在无菌状态下将适量预热的生长培养基加入到培养瓶中；必要时可将培养的细胞分到多个培养瓶中；
4. **将培养瓶的瓶盖拧松一圈，以便进行充分的气体交换（或者使用透气性瓶盖）**，并将培养瓶恒温培养箱中静置培养（注：为了尽量减少细胞碎片和无用的代谢副产物在培养体系中蓄积，每周应将细胞悬液至少离心一次，离心力为 $200\times g$ ，时间为 3-5 分钟，然后用新鲜的生长培养基重新悬浮细胞沉淀）。



方法二：

1. 将细胞悬液转移到 15mL 无菌离心管中，以 $200\times g$ 离心力离心 3-5 分钟（请注意离心速度和时间依细胞种类不同而有所差异）；
2. 用最少体积的预热完全生长培养基重新悬浮细胞沉淀，将细胞悬液按照推荐比例稀释，并将适量体积的细胞悬液转移到新的细胞培养容器中；
3. 将培养瓶的瓶盖拧松一圈，以便进行充分的气体交换（或者使用透气性瓶盖），并将培养瓶恒温培养箱中静置培养。

细胞冻存

1. 配制冻存培养基，于 2°C - 8°C 下储存，直至使用；注意使用何种冻存培养基取决于所用细胞系；
2. 冻存贴壁细胞时，利用传代（详细步骤参考细胞传代）时所用方法轻柔地使细胞从组织培养容器上脱离下来；用该细胞所需完全培养基重新悬浮细胞；根据所需活细胞密度，计算冻存培养基需要量；
3. 以约 $200\times g$ 的离心力将细胞悬液离心 3-5 分钟；在无菌条件下小心倒掉上清液，不要搅动细胞沉淀；
4. 用预冷的冻存培养基重新悬浮细胞沉淀，将其调整至该细胞适合的活细胞密度；
5. 将细胞悬液分装到若干冻存管中；分装时，应不时轻轻混合细胞，使其保持均匀的细胞悬液状态；
6. 使用可控制降温速度的冷冻装置冷冻细胞，使温度每分钟大约降低 1°C ；或将装有细胞的冻存管放入 Nalgene 细胞冻存盒中，然后将冻存盒置于 -80°C 条件下过夜；
7. 将已经冷冻的细胞转移到液氮罐中储存。
8. 没有上述条件的实验室，亦可按下列顺序依次降温： $\text{室温}\rightarrow 4^{\circ}\text{C}30\text{min}\rightarrow -20^{\circ}\text{C}30-60\text{min}\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ 过夜 \rightarrow 液氮保存。

细胞复苏

1. 将装有冻存细胞的冻存管从液氮罐中取出，立即放入 37°C 水浴中；
2. 在 37°C 水浴中轻轻转动冻存管，直到冻存管内仅剩余一小块冰芯，使细胞迅速解冻（1 分钟内）；
3. 将冻存管转移到超净工作台内；打开盖子前，用 75% 酒精擦拭冻存管外部；
4. 将解冻的细胞逐滴转移到装有适量经过预热、适合该细胞系的完全生长培养基的离心管内；
5. 以大约 $200\times g$ 的离心力将细胞悬液离心 3-5 分钟；实际离心速度和时间取决于细胞种类；
6. 离心后，检查上清液是否清澈，有无完整的细胞沉淀；在无菌条件下，小心倒掉上清液，不要搅动细胞沉淀；
7. 轻轻将细胞重新悬浮在完全生长培养基中，然后转移到合适的培养容器和推荐的培养环境中（注：培养瓶尺寸取决于冻存管冻存的细胞数量，培养环境取决于细胞和培养基类型）。



细胞培养常见问题及解决方法

问题	原因	解决方案
细胞生长缓慢	生长培养基使用不当	按照生产商的建议，使用相应的预热生长培养基。
	生长培养基中血清质量差	使用其他批次血清。
	传代操作不当	按照生产商的建议消化时间及传代比例进行操作。
	换液过于频繁	降低换液频率，参考生产商推荐的换液频率。
	细胞传代次数过多	使用传代次数较少的健康细胞。
	细胞生长超过汇合状态	哺乳动物细胞传代应在细胞处于对数期、未达到汇合状态时进行，建议细胞密度达 80-90% 传代。
	细胞被支原体污染	将细胞、培养基和试剂丢弃；新取一只冻存细胞，并且使用新的培养基和试剂。
细胞复苏存活率低	细胞冻存不当	新取一只冻存细胞，并储存在液氮中。将细胞储存在液氮中，直至复苏。
	自行制备的冻存细胞无活性	将细胞按照生产商推荐的密度冻存。
		制备冻存细胞时使用传代次数少的细胞。
		严格按照生产商推荐的操作程序冻存细胞。请注意本手册推荐的冷冻程序是冻存细胞的一般流程，只能作为指导原则使用。
	细胞复苏方法不当	新取一只冻存细胞。
		严格按照生产商推荐的操作程序复苏细胞。请注意本手册推荐的解冻程序是复苏细胞的一般流程，只能作为指导原则使用。
	复苏培养基使用不当	确保冷冻细胞解冻迅速，接种前用预热的生长培养基缓慢稀释细胞。
		使用生产商推荐的培养基。确保培养基使用前已经预热。
细胞稀释过度	按照生产商的建议，将解冻后的细胞高密度接种，以改善复苏效果。	
处理细胞时动作不够轻柔	冻存和复苏过程对大多数细胞都会造成不利影响。不要通过涡旋振荡或者用力敲打培养瓶的方法使细胞脱落(培养昆虫细胞时除外)，也不要高速离心细胞。	
冻存液中所用保护剂在储存过程中未避光	如果未避光储存，冻存保护剂会转变为对细胞有毒性的物质；新取一只冻存保护剂，重新冻存细胞。	