

细胞复苏

1.解冻

1.1 从液氮中取出装有冷冻细胞的冻存管，37°C水浴，快速晃动至完全融化（<1分钟），快速解冻细胞。

2.转移

2.1 打开前，使用75%乙醇小心擦拭冻存管外部。在超净工作台中，用移液器缓慢将细胞悬液沿管壁加入预热完全培养基于离心管中，稀释细胞悬液。

3.离心

3.1 800-1000 rpm离心5-10分钟。根据细胞类型不同，调整实际离心速度和持续时间参数（如原代细胞建议800 rpm/5min）。

4.弃上清

4.1 弃上清，用新鲜预热培养基重悬细胞。

5.培养

5.1 将细胞悬液转移至培养皿或培养瓶，补加培养基至适宜的体积，放入5% CO₂、37°C的培养箱中进行培养。

细胞传代

1.观察

1.1 显微镜下确认细胞密度是否达到80%-90%，形态是否正常。

2.洗涤

2.1 无菌移液管彻底吸弃培养液。
2.2 PBS轻轻润洗细胞，清除残留血清蛋白及二价离子（钙和镁）。
2.3 培养容器中吸弃PBS。

3.消化

3.1 加入0.25%胰酶，使用足够的胰酶覆盖细胞层（每10 cm²约0.5 mL）。轻轻摇动培养容器以完全覆盖细胞层，放入37°C培养箱孵育消化（1-5分钟）。实际孵育时间因细胞类型不同而异。

4.离心

4.1 吹打混匀细胞成单细胞悬液，收集至离心管，800-1000 rpm离心5-10分钟。离心速度和时间因细胞类型不同而异。

5.传代

5.1 弃上清，加入新鲜培养基重悬，按1:2-1:10等比例或通过细胞计数板进行细胞计数，将适当体积或数量的细胞移液至新的加入培养基的培养容器中，摇匀细胞，然后将细胞放回培养箱。

细胞冻存

1.制备

1.1 10% DMSO + 90%胎牛血清配制冻存液，4°C储存。合适的冷冻液取决于细胞系种类。

2.收集

2.1 PBS润洗细胞，胰酶消化细胞后，加入含血清培养基终止消化，800-1000 rpm离心5分钟，弃上清。

2.2 细胞团块重悬于冻存液中（密度 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL）。

3.分装

3.1 细胞悬浮液分装至冻存管（1 ml/管）中。分装时轻轻混合细胞以保持细胞悬浮液均匀。

4.标注

4.1 标注细胞名称、代数、日期，建立冻存档案。

5.降温

5.1 4°C放置30分钟-1小时，-20°C放置1-2小时，-80°C过夜，转入液氮（-196°C），彻底停止细胞代谢，实现长期保存。

5.2 或程序降温盒进行梯度降温，确保细胞以适宜的速率降温至-80°C，再转入液氮长期保存。

常见问题解析

1. 细胞存活率低怎么办？

①DMSO残留毒性：解冻后立即离心（1000 rpm，5分钟）并更换预温培养基重悬2次，确保残留浓度 $<0.1\%$ ；②解冻操作不当：37°C水浴快速解冻（ ≤ 60 秒），持续摇晃至冰晶消失。③冻存液错误：严格配制10% DMSO浓度，现配现用并混匀；④降温程序缺陷：采用程序降温盒或分步降温法；⑤细胞状态不佳：选择活力 $>90\%$ 的对数生长期细胞，冻存前同步支原体检测；⑥血清质量问题：选用经认证的高端FBS，避免反复冻融。

2. 细胞结团或碎片多怎么办？

①解冻不均匀：解冻时持续晃动冻存管，确保均匀受热；②离心不充分，细胞未完全沉淀，导致残留碎片，延长离心时间，确保细胞完全沉淀；③细胞消化不充分：延长消化时间至细胞完全变圆、间隙增大，加入含血清培养基终止消化；④吹打力度不当：吹打时力度均匀，完全分散细胞，避免产生气泡；⑤培养基更换不及时：复苏、传代后及时换液，去除死亡细胞和碎片；⑥细胞状态差：冻存前确保细胞处于对数生长期，活力 $>90\%$ ，易结团细胞（悬浮细胞、肿瘤细胞等）可加入0.5% BSA或延长吹打时间。

3. 细胞形态异常或分化，生长缓慢怎么办？

①培养环境失稳： CO_2 浓度偏离导致pH失衡，需定期校准监测，湿度不足可加水盘补偿；②营养缺陷：谷氨酰胺易分解需每1-2周补加，血清批次差异需验证，培养基过期致缓冲失效；③密度不当影响信号传导或营养竞争，胰酶消化超时损伤细胞膜；④细胞状态问题：老化细胞（传代 >50 次或活力 $<90\%$ ）分化迟缓，隐性支原体污染抑制生长；⑤管理疏漏：延迟换液致废物积累，血清需避光保存，谷氨酰胺宜短期存放。

参考文献

- [1] 刘斌. 细胞培养:第3版[M]. 西安: 世界图书出版西安有限公司, 2018.
- [2] Capes-Davis A, Freshney R I. Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications[M]. 8th ed. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd, 2021.