



动物检验检疫技术

专业教学资源库

传代细胞的复苏、培养和冻存



培训目的

- 学会传代细胞的复苏
- 学会传代细胞的培养
- 学会细胞的冻存



仪器

P2实验室

二氧化碳培养箱

倒置显微镜

生物安全柜

水浴锅

液氮罐等



实验材料

pH7.2生理盐水、DMEM、胰酶、碳酸氢钠、超纯水、DMSO、新生牛血清、细胞培养瓶、滴管、冻存管、等



一、前期准备

- 按常规配制含DMEM、PBS、0.25%胰酶、100x双抗等。
- 将洁净的滴管、细胞瓶等包装。
- 将包装好的PBS、滴管、细胞瓶等高压蒸汽灭菌。
- 将配置好的DMEM、胰酶、双抗等过滤除菌。



二、细胞的复苏

- 15ml离心管和细胞瓶中分别加入5-6ml 细胞培养液。
- 从液氮中取出冻存管，迅速于37水浴中融化。
- 将细胞移入15ml离心管，离心。
- 以1ml培养液悬浮细胞。
- 将细胞移入细胞瓶，置于二氧化碳培养箱中培养。
- 观察：次日观察细胞生长情况。



三、细胞的传代培养

- 洗涤：弃掉细胞瓶内的培养液，用PBS洗涤细胞3次；
- 消化：在细胞瓶内加入0.25%胰酶 1ml，轻摇，使其覆盖细胞表面；将细胞瓶置于37温箱中作用3min；
- 轻拍细胞瓶，加2ml DMEM于细胞瓶中，用滴管反复吹打细胞悬液，使细胞充分分散；
- 在新的细胞瓶中加入DMEM 5ml，并移细胞悬液1ml于已经加有DMEM的细胞瓶，轻轻摇匀，置于37℃ 培养箱中培养；次日观察细胞生长状态。



四、细胞的冻存

- 冻存液的配制：10%DMSO+30%血清+60%DMEM，混合均匀；
- 细胞消化：将生长状态良好的细胞进行洗涤消化；
- 加入冻存液：在细胞瓶中加入2ml冻存液，轻轻吹打混匀，装入冻存管；
- 将冻存管置于-80℃冰箱保存；
- 将冻存管移入液氮罐中冻存。



- 分组
- 注意严格的无菌操作
- 组织须尽量剪碎
- 分装细胞注意细胞悬液的浓度



动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!