



细胞培养

收货处理方法及操作说明



细胞处理原则

- 严格的无菌环境。务必保证实验室、超净台/生物安全柜和培养箱的清洁。
- 规范的操作方式。请按照操作说明描述的方式操作，注意操作细节。
- 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。

☎ 131 5166 7797

☎ 400-990-0791

✉ info@Cas9x.com

🌐 www.cas9x.com



关注海星公众号

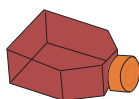


海星商城二维码

细胞收货处理方法

收到细胞后请务必仔细阅读产品资料，了解细胞相关信息，如贴壁特性（贴壁/悬浮/半贴壁半悬浮）、细胞形态、培养体系、传代比例和换液频率等。

海星生物寄送细胞分为“T25培养瓶常温运输”或“冻存管干冰运输”等方式，请根据不同的运输方式进行相应处理。



T25培养瓶常温运输

1. 收到细胞后，请先检查培养瓶是否完好，培养基是否外渗、浑浊，并核对瓶身上的标签信息、细胞数量是否与发货清单一致。如有异常情况，及时与我们联系。

注意：培养瓶内飘浮的小体积絮状物可能是脱落的细胞，对于这种情况，建议在细胞培养箱静置2 h后再观察，如仍有细胞未贴壁，可收集培养上清离心后再接种到原瓶或新的培养容器中。

2. 用75%酒精消毒细胞培养瓶表面，不要打开培养瓶，将细胞平放于细胞培养箱内静置1~2 h，待细胞恢复基本生长状态后，再进行后续操作。

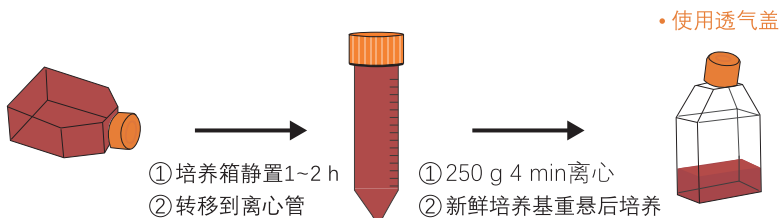
3. 显微镜下观察细胞状态：



贴壁细胞若汇合度低于80%，请及时更换为预热的完全培养基培养。若细胞汇合度高于80%，可进行传代。后续根据细胞汇合度继续培养或消化传代。



悬浮细胞需要收集培养瓶中的所有细胞悬液。250 g离心4 min后弃去上清。使用预热的完全培养基重悬，将细胞悬液接种到合适的培养容器中。后续根据细胞汇合度继续培养或消化传代。



悬浮细胞收货处理方法



冻存管干冰运输

1. 收到细胞后，请先检查包装是否完整，干冰是否充足，冻存管有无破损等情况，并核对冻存管上的标签信息、细胞管数是否与发货清单一致。
2. 低温保存的细胞非常脆弱，细胞收到后如在24 h内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过24 h请存放于液氮中。建议尽快复苏，具体复苏操作见：“细胞复苏步骤”。若复苏有异常，及时与我们联系。

细胞培养操作步骤

请提前准备以下试剂

所需试剂 	试剂名称	推荐货号 (HyCyte®)
	1×PBS磷酸盐缓冲液	GUPB-R001
	胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)不含酚红	GUTP-R001
	完全培养基	细胞配套完全培养基
	一步冻存液	GUCP-R201

注意：悬浮细胞培养不需要使用胰蛋白酶消化液；HyCyte®一步冻存液为即用型、无血清、非程序降温的冻存液。

细胞换液

1. 细胞处理后的第二天，在显微镜下观察细胞状态，如死细胞较多且细胞密度较低，需要进行换液操作。
 - ① 悬浮细胞请在高倍镜下观察，一般而言，活细胞轮廓圆润、界限清晰、透明度大、折光性强。如细胞活率较高，则继续正常培养。
2. 如需换液，参考以下步骤：
 - ① 悬浮细胞：收集培养容器中的所有细胞悬液。250 g离心4 min后弃去上清。使用预热的完全培养基重悬，将细胞悬液接种到合适的培养容器中。
 - ② 贴壁细胞：直接弃去培养容器中的上清，添加预热的完全培养基至原培养容器中。
 - ③ 半贴壁细胞：收集培养容器上清中的所有细胞，250 g离心4 min后弃去上清。使用预热的完全培养基重悬，接种至原培养容器中。
3. 之后，每2~3天更换一次完全培养基，后续根据细胞生长密度和状态传代或冻存。

细胞传代

1. 预热完全培养基（贴壁和半贴壁细胞还需要预热胰酶和PBS）。

2. 细胞收集。



悬浮细胞直接收集培养容器中的所有细胞悬液至离心管中。



贴壁/半贴壁细胞需要对细胞进行**消化处理**，步骤如下：

① 用PBS洗涤细胞2次。洗涤过程中注意动作轻柔，清洗全面。



贴壁细胞直接弃去培养容器中的培养上清。用PBS洗涤细胞2次，洗涤后的PBS直接弃去，无需保留。



半贴壁细胞需收集培养容器中的培养上清至离心管中。用PBS洗涤细胞2次，洗涤后的PBS需收集至离心管中。

② 加入胰酶，迅速铺匀，确保其充分接触细胞表面。

③ 显微镜下观察消化情况，约70%~80%细胞收缩变圆后，轻拍培养容器外壁，使细胞脱离培养容器底面。立即加入胰酶双倍体积的完全培养基，轻摇培养容器，使培养基和胰酶迅速混匀，终止消化。

④ 吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来，将细胞悬液转移至离心管中。

3. PBS洗涤培养容器1~2次，收集所有细胞悬液至离心管中。

4. 收集的所有细胞悬液250 g离心4 min。

5. 离心后去除上清。加入2 mL预热的完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。

6. 将细胞按 $(2.5\sim 4.0) \times 10^4$ 个活细胞/cm²接种至适宜的培养容器内。

注意：如未计数，也可按照适宜比例进行传代，首次传代建议按照1:2进行，后续可根据细胞实际生长情况参考说明书传代比例范围灵活调整。

7. “十字法”摇匀细胞，将培养容器放入细胞培养箱中。

8. 后续根据细胞生长密度和状态进行补液（悬浮细胞）/换液（贴壁/半贴壁细胞）、传代或冻存等操作。

细胞冻存

1. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。

2. 消化细胞，取少量细胞悬液计数。细胞悬液经250 g离心4 min。

3. 离心后去除上清，用适量**4℃预冷**的冻存液重悬细胞。将细胞按比例或数量分装至冻

- 存管中。一般冻存密度为 $(1.0\sim2.0)\times10^6$ 个/mL。
- 注意：**细胞长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。如离心后用冻存液重悬计数，请将细胞放置于4℃冰箱内，以减弱细胞代谢，较好的保持细胞状态。
4. 如使用海星一步冻存液，冻存管直接竖直放入-80℃冰箱即可完成“一步”冻存。
如使用程序冻存液，需将冻存管放入提前预冷的程序降温盒后放入-80℃冰箱。
5. 24小时后可将冻存管转移到液氮进行长期保存。
- 注意：**细胞不可长期保存在-80℃冰箱中。建议24 h后尽快转移至液氮中。

细胞复苏

1. 开启37℃水浴锅。预热完全培养基，提前将细胞从液氮中取出，放于-80℃冰箱，让冻存管中液氮挥发。
2. 洁净工作台内准备15 mL离心管，加入至少5 mL预热的完全培养基。
3. 从-80℃冰箱中取出细胞。快速将冻存管置于37℃水浴锅内，快速晃动，使冻存液迅速融化。
- 注意：**1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化均匀。晃动时应避免水没过管盖增加污染风险。
2) 管内冻存液融化至只剩一个约2mm直径的冰晶时，可停止水浴。继续晃动冻存管至冰晶融化。
4. 用75%酒精消毒冻存管表面。在洁净工作台内小心开盖，尽量避免气泡溢出，轻柔吹打数次，转移至预先准备的离心管内。用少量完全培养基洗涤冻存管1~2次，一并收集至离心管内。
5. 250 g离心4 min。离心后去除上清。加入2 mL完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。（如有台盼蓝可取少量细胞悬液进行染色计数）
6. 将细胞平均接种到1个T25培养瓶或底面积相当的培养容器中，加入足量完全培养基，摇匀细胞，将培养容器放入培养箱中培养。
7. 复苏次日，观察细胞状态并换液，具体操作见“细胞换液”。
- 注意：**贴壁/半贴壁细胞接种24 h内不应扰动。部分细胞贴壁较慢，复苏后48 h不应扰动，具体注意事项见相应细胞说明书。

常见培养器皿底面积和加液量参考

培养器皿	底面积(cm ²)	添加培养液量(mL)	消化胰酶添加量(mL)
96孔板	0.32	0.1	0.03
24孔板	2.0	1.0	0.1
12孔板	4.5	2.0	0.2
6孔板	9.6	2.5	0.5
3.5 cm培养皿	8.0	3.0	1.0
6 cm培养皿	21	5.0	1.0
10 cm培养皿	55	10	2.0
25 cm ² 培养瓶	25	5.0	1.0
75 cm ² 培养瓶	75	15~30	3~5

注意：添加培养液体积和胰酶添加量仅供参考，特殊细胞可适当进行调整。



其他注意事项

- ① **接收时贴壁细胞成团脱壁：**细胞本身特性贴壁不牢，或者因细胞增殖过快导致汇合度过高挤压空间，加上运输颠簸导致的脱壁现象。可通过静置2-3 h的方式让细胞重新贴回，或者将脱壁的细胞按照悬浮细胞的处理方式，收集离心并接种至新的培养器皿。
- ② **培养体系内有黑点：**在排除污染的情况下，通常为运输原因导致细胞出现应激反应，导致细胞分泌次级代谢产物，在细胞状态恢复后可减少或者消失。
- ③ **低代次保种：**建议细胞在更早的代次进行保种。首次传代时，如细胞离心后收集到的细胞较多，可以少量冻存保种。
- ④ **部分细胞培养条件特殊**（如需要提前对培养容器底面进行包被，复苏/传代处理后需要更长时间贴壁），请仔细阅读相应细胞说明书后进行操作。
- ⑤ **培养体系内有絮状物：**在排除污染的情况下，通常为部分死细胞解离而成的细胞碎片，以及释放的胞内物质缠绕而成，在后续培养过程中会逐渐减少并消失。
- ⑥ **培养体系内有不明细丝物质：**在排除真菌污染的情况下，通常为细胞培养操作过程中，吸管或吸头尖端刮蹭到培养器皿底面而脱落的材料，对细胞培养无任何影响，会随着传代培养清除。

售后条例

1. 请留存细胞的镜下照片作为售后依据，以免影响售后结果。
2. 由于客户使用的细胞培养条件，与本公司提供的资料或者技术人员提议的替代方案不一致，从而导致细胞生长出现问题，均不在售后范围内。
3. 本公司仅对细胞检测报告上的检测指标负责。其他有超出承诺范围以外的指标，均不在售后范围内。
4. 由于细胞状态受环境、操作和运输等多方面因素的影响，细胞签收超过两周产生的质量问题均不在售后范围内。

发表【中文论文】请标注：

细胞由苏州海星生物科技有限公司提供

发表【英文论文】请标注：

Cells were kindly provided by Suzhou Haixing Biosciences Co., Ltd