

# 细胞的冻存和复苏

细胞的冻存和复苏是保存细胞样品的好方法, 在得到稳转细胞系后的第一时间应该及时冻存, 避免意外发生. 本Protocol是实验室常规操作

## 细胞冻存的基本原则

细胞冻存需要遵循 **慢冻快化原则**, 冻存过程中使用冻存盒使温度逐渐降低, 而在复苏时直接使用37°C温水快速化冻。细胞冻存盒采用异丙醇作为传热介质, 其中温度是每分钟变化1°C, 直至与环境平衡。

### 冻存细胞:

1. 检查细胞间冻存盒是否可用, 检查冻存盒中异丙醇的量是否足够, 提前将冻存盒放置于-20°C冰箱, 确保在使用前达1小时以上, 检查冻存管是否足够
2. 检查细胞状态及细胞密度是否良好
  - 果蝇D.mel-2细胞一个T75只可冻1管 (每管1 mL)
  - Human细胞一个T75可冻2管, 一个T25冻1管 (每管1 mL)
3. 常规胰酶消化和传代, 将传代外的细胞收至1.5 mL管中使用掌上离心机短离30秒, 或将细胞收至15 mL管中, 使用25°C室温, 1000 rpm离心5 min (注意配平)
  - ! 务必正常传代, 在确保冻存无误之后再弃置
4. 离心期间准备冻存液和冻存管
  - 冻存液是含10% DMSO的培养基, 因为DMSO溶解放热, 需要根据冻存细胞数量提前配制 (每个样品900  $\mu$ L培养基 + 100  $\mu$ L DMSO)
  - 取出冻存管后标记细胞的基因信息、传代几代、冻存时间、操作者姓名等
5. 离心结束后, 去除上清含胰酶的培养基, 每个样品加入1 mL冻存液, 混匀, 转移至冻存管中
6. 立即将冻存管放入-20°C冻存盒, 盖子不要太紧避免异丙醇流出, 在-20°C保持约1小时 (半小时以上, 3小时以内)
7. 后将冻存盒放入-80°C冰箱至少12小时 (通常过夜)
8. 将细胞从-80°C冰箱冻存管中转移至液氮中, 及时填写更新冻存表
  - ! 操作液氮时务必小心, 防止冻伤
9. 冻存盒室温恢复温度后, 补充异丙醇, 及时放回-20°C冰箱

## 复苏细胞:

1. 提前准备好工作台、T25培养瓶及2个1.5 mL管, 提前热培养基
2. 准备一个500 mL大烧杯, 从细胞间水浴锅中取37°C灭菌水, 拿到外面液氮罐旁
3. 对照细胞冻存表取出细胞, 确保标签和表格无误, 确保冻存管盖子盖紧后, 将冻存管放进烧杯中, 将其余细胞放回液氮罐  
! 取出和放回液氮罐时, 务必缓慢操作, 让液氮慢慢流出或浸入, 可使用镊子夹取冻存管
4. 拿住冻存管在烧杯中不断搅, 确保细胞完全化冻, 没有冰晶, 期间前往细胞间
5. 将化冻的冻存管放在桌子上 (盖子里的水倒掉), 换手套, 喷酒精擦干后拿入超净台 (标记可能会掉, 务必小心)
6. 将细胞全部吸出至1.5 mL管中, 掌上离心机离心20秒, 离心期间准备培养基  
1个样品时可均分配平离心, 重悬时可将两管合并后再吹散; 多个样品需要做好标记
7. 弃去上清, 换新培养基重悬, 转移至T25中, 标记, 摇匀, 镜检, 无误后放入培养箱, 次日观察细胞状态, 传代一次后可正常实验
8. 及时更新细胞冻存表

修订日期 2023-10-08