

贴壁细胞传代步骤

一、所需仪器：

离心机
生物安全柜
电动移液器
CO₂ 培养箱
倒置显微镜

二、所需试剂：

胎牛血清（FBS）
无菌 1×PBS pH=7.2
消化液：0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA
完全培养基（含血清）

三、所需耗材：

离心管（15ml、50ml）
T-25 细胞培养瓶
一次性无菌移液管（2ml、5ml、10ml）
1.8ml 冻存管
程序降温盒

四、操作步骤：

- 1.将需要传代的细胞从 CO₂ 培养箱中取出，在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基；
- 2.向培养瓶内加入无菌 1×PBS 3ml，之后水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养平面上所有的面积，吸弃 PBS；
- 3.重复步骤 2 一次，之后向瓶内加入消化液 1ml，轻微震荡后放入 37℃ CO₂ 培养箱中孵育 2-4min；
- 4.孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，如还有部分细胞未消化下来，可在生物安全柜内用移液管吸起消化液，吹打培养平面；
- 5.向消化下细胞的培养瓶中加入 1ml 含血清的完全培养基终止消化，然后将培养瓶中的液体转入 15ml 离心管中，300g 离心 5min；
- 6.离心完成后，弃上清，用 2ml 完全培养基重悬细胞，将重悬后的培养基转入 2 个 T-25 培养瓶，每个培养瓶各 1ml，再向每个培养瓶中各加入 4ml 完全培养基；
- 7.水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使细胞均匀分布在培养平面上，然后将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中静置培养。