

## 细胞冻存步骤

### 一、所需仪器：

-86℃超低温冰箱  
离心机  
生物安全柜  
电动移液器  
CO<sub>2</sub>培养箱  
倒置显微镜  
液氮罐

### 二、所需试剂：

胎牛血清（FBS）  
细胞培养级 DMSO  
冻存液：80%FBS+20%DMSO  
无菌 1×PBS pH=7.2  
消化液：0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA  
异丙醇

### 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.将需要那冻存的细胞从 CO<sub>2</sub> 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都的面积，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℃CO<sub>2</sub> 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，如还有部分细胞为消化下来，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 0.5mlFBS 重悬细胞，再加入 0.5ml 冻存液，用移液管充分混匀，之后转入 1.8ml 冻存管中；
- 7.将冻存管转入填充异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃冰箱中过夜降温；
- 8.第二天，取出降温完成的序降温盒中的冻存管，尽快转入液氮罐中保存。