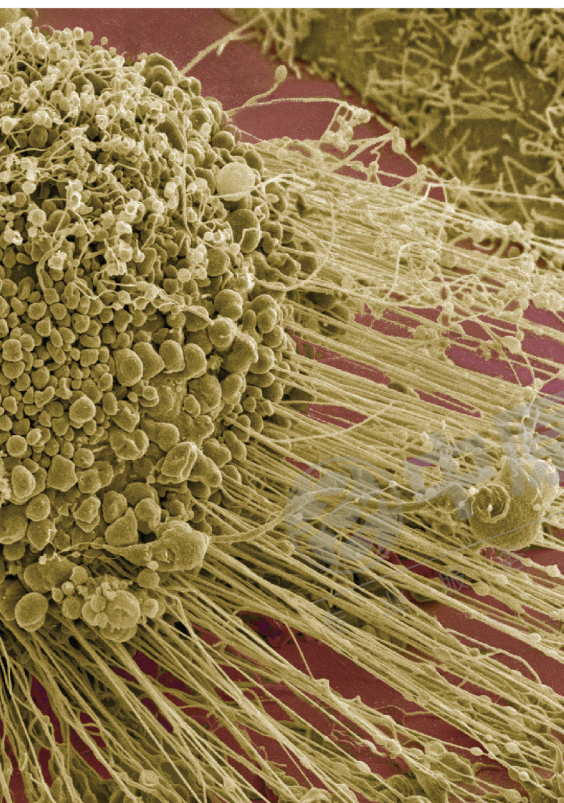


ATCC[®] 动物细胞培养指南

中原生物
专业服务



中原生物
助力科技



ATCC[®]

THE ESSENTIALS OF
LIFE SCIENCE RESEARCH
GLOBALLY DELIVERED™

本手册仅供参考，具体操作方法以ATCC产品说明书为准。



1. ATCC细胞系概述

ATCC的细胞系和杂交瘤细胞通常保存在冻存管中用干冰运输，或是在培养瓶中常温运输。在收到冻存细胞后，很重要的一点是迅速解冻使其立即复苏并除去DMSO，然后将它们放置到培养基中。如果做不到上面这点，需将细胞存储在液氮中（-130°C以下）。不要将冻存细胞储存在高于-130°C的温度下，这会使细胞存活率迅速下降。

1.1 产品说明书

ATCC细胞株寄送时附带说明书，说明书中有关于处理细胞的详细信息。简短版本的说明书，可以在ATCC网站上找到或致电ATCC的技术服务部门索取。产品说明书或COA文件中包含具体批次信息，如每管细胞的数量，建议分裂或传代的比例，和已知细胞的传代代次。

1.2 准备培养基

复苏细胞时需要准备合适的培养基，血清和细胞生长所需的添加剂。大部分产品，可以在订购细胞系时从ATCC购买。ATCC在培养和保存细胞时也是使用相同的试剂。（见注1）

注1：

虽然大多数细胞系可以在不止一种培养基中生长，但是当培养基改变时，细胞的性质也会变化。因此，使用ATCC推荐的培养基来培养细胞会获得最好的效果（见产品信息说明书和ATCC网站）。

1.3 开启冻存管

1. 准备一个培养瓶，加入适宜细胞培养的培养基，液体体积按照说明书的推荐配置，并平衡培养基的温度和pH（CO₂）。

2. 在37°C水浴中或细胞的正常生长温度下将冻存管轻轻摇动。解冻要快，约2分钟或直到冰晶融化即可。

3. 从水浴中取出冻存管并用浸泡或喷洒70%乙醇的方式来消毒。进一步的操作均需无菌操作台中严格无菌条件下进行。

4. 拧开冻存管的管帽并将内容物转移到一个含有9 ml 推荐培养基的无菌离心管中。通过温和离心（125 × g 10 min）除去冷冻保护剂（DMSO）。弃去上清，并用1或2 ml完全培养基重悬细胞。将这些细胞悬液转移到含有完全培养基的培养瓶中并轻轻摇动以彻底混匀。

5. 培养24小时后检查细胞状态并在需要进行传代。（见注2）

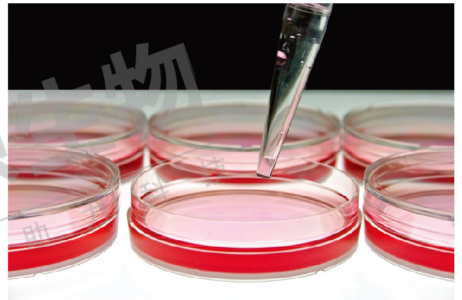
注2：

某些细胞系，如杂交瘤细胞，需要几天的时间才能从冻存状态完全复苏。某些杂交瘤细胞在培养的第一天活力较差，并会产生细胞碎片。在此之后，细胞就会开始复苏，并进入指数增长。

1.4 培养瓶培养

某些ATCC细胞，是在培养瓶中以活细胞的形式运输的。这些培养瓶中会接种细胞，孵育并保证细胞能生长，然后补充培养基后再运输。

在收到培养瓶后，目视检查培养基是否污染。包括异常的pH变化（苯酚红变为黄色或紫色），浑浊度，或有无颗粒。在低倍率（100×）的倒置显微镜下观察培养基中是否有微生物污染以及细胞的形态。



如果细胞是单层贴壁生长：

1. 无菌操作，取出大约5至10ml的运输培养基。运输培养基可以保存在4°C备用。
2. 将培养瓶放在产品说明书中推荐的温度和CO₂浓度下培养（大多数细胞系为37°C与5%CO₂）直到细胞可以传代培养。

如果细胞不贴壁或是悬浮状态生长：

1. 在无菌条件下，将培养瓶的全部内容物转移到离心管中。
2. 在125 × g转速下离心5 ~ 10 min。
3. 取出大约10 ml运输培养基的上清液，并重悬细胞。将取出的运输培养基储存在4°C备用。
4. 无菌条件下，转移悬浮细胞到25 cm²或75 cm²的培养瓶中，培养瓶大小取决于细胞株（见产品说明书）。
5. 按照产品说明书中推荐的温度和CO₂浓度培养细胞，直到细胞可以传代培养。

原代细胞来源于一块碎的或酶消化的组织。原代培养物，是多种类型细胞的混合物，保留了其来源组织的特点。

一段时间后，原代培养的细胞会达到融合状态，即在培养瓶中的所有可用空间由于细胞扩增都被覆盖。在此之后，细胞需要消化（通常用蛋白水解酶，如胰蛋白酶）为单个细胞并且传代（分裂，传代或转移）。在第一次传代以后，培养物通常被称为一个细胞系。每一次传代培养，细胞群体由于快速生长的细胞占主导地位而变得更均匀。具有所需特性的细胞也可以通过克隆，从培养物中选出。

二倍体细胞很少可以倍增超过几代。它们只有有限的复制能力，并且在细胞倍增20至80次后开始减缓并最终停止分裂。最近的证据表明，某些细胞中观察到的细胞衰老与预计的复制性衰老不同，可能是由于不适当的培养条件导致的。还有其他数据显示，对某些物种的细胞系（尤其是人源的）即使生长在改进的培养条件下仍存在复制衰老。这种衰老是由细胞分裂时染色体末端（端粒）缩短调控的。

相反，传代（或永生性）细胞具有无限增殖能力。这些细胞系通过多种手段中的其中一种来使细胞永生性或转化。许多传代细胞来自肿瘤组织。ATCC收集的大部分细胞系是传代的，只有少数如CCD-1117Sk人皮肤成纤维细胞（ATCC CRL-2465™）或CCD-18Co人结肠细胞（ATCC CRL-1459™）是有限传代的。更多关于ATCC细胞永生化的信息可以在ATCC网站上查找。

正如以上提到的，细胞系要么在培养瓶表面贴壁生长（锚定依赖性）要么悬浮生长（非锚定依赖性）。细胞的生长和分裂，通常遵循一个由四个阶段组成的特征性增长模式：停滞期，对数期（指数期），平稳期（平台期）和衰退期。

停滞期——将细胞接种至培养瓶之后，细胞逐步恢复的同时，缓慢生长。

对数期（指数期）——细胞进入一个对数生长的时期，一直持续到整个生长表面被占满或细胞密度超过培养基提供营养的能力。

平稳期——细胞增殖减慢或停止。

衰退期——如果不更换培养基且细胞数量不减少，细胞活力会下降，并出现细胞死亡。

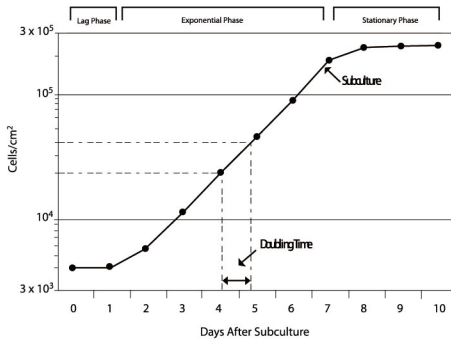
为了确保活力，遗传稳定性和表型稳定，必须使细胞保持在对数期。这意味着细胞需要在进入平稳增长阶段之前，或在单层细胞长成100%融合之前，或在悬浮细胞达到推荐的最大细胞密度之前定期进行传代培养。为每个细胞系绘制生长曲线，对于测定该细胞系的生长特性是必要的。

任何ATCC细胞系的生长和增殖的详细信息，参见运输包装里提供的具体细胞系的产品说明书。简短版本的说明书，也可以在ATCC网站上找到，或致电ATCC技术服务部门索取。

2. 细胞培养和传代

2.1 细胞代次和倍增水平

原代的细胞培养一般以1:2的比例扩增（每次传代分成两部分）。大多数连续细胞系以较高的速率复制并且在高分裂比传代。细胞代次是指细胞经过不断传代进入新培养瓶中的传代次数。对于二倍体培养，从培养开始算起，细胞代次基本等同于细胞双倍扩增倍数（群体倍增水平，PDL）。但对于连续细胞系来说，细胞在高分裂比例传代。因此，对于连续细胞系PDL不能确定细胞代次。在大多数情况下，PDL只是一个估计数值，因为无法确定细胞死亡是由于坏死，凋亡，接近衰老还是细胞不再分裂的情况。



2.2 适应新的培养基或者血清

为了保证细胞系特性的连续，需保持细胞系在相同培养基和血清中培养，并在传代时以相同的方法补充培养基。培养条件的变化，有可能改变细胞系的特性。

培养一个新的细胞时要特别注意培养基一致性的问题。因为来自于不同厂家的培养基，即使名字相同或类似，配方也略有差异。仔细阅读说明书，配方，标签，确保使用正确的培养基，细胞能适应新的培养基。所有ATCC细胞系，在细胞信息中都注明了培养基。大多数情况下，推荐的培养基和血清都可以跟随细胞一起购买。

使用下面的程序，使细胞适应新的培养基：

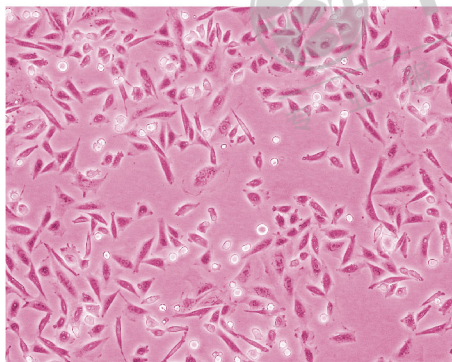
1. 以1:2的比例传代到新培养瓶中。
2. 在两个培养瓶中，观察细胞生长，对比形态和生长速度的变化。如果相同，传代培养下一代细胞时，细胞1:2分配，培养基采用1:3的比例（25%原培养基，75%新培养基）。
3. 观察细胞生长速度，对比原来和现在的细胞形态。传代培养下一代细胞时，细胞1:2分配，培养基采用1:7的比例（12.5%原培养基，87.5%新培养基）。
4. 观察细胞生长速度，对比原来和现在的细胞形态。如果形态一致，传代培养下一代细胞时，细胞1:2分配，培养基采用全部新培养基。此时，细胞适应了新的培养基。

2.3 培养温度

大多数动物细胞的最佳生长温度在37°C。昆虫和两栖动物细胞需要较低的生长温度(如28°C)，因为一些动物细胞是温度敏感型。而培养的细胞可以承受相当大幅度的降温，大部分细胞可在4°C存活数天，很少量细胞能在超过最佳温度2°C以上，存活几个小时或更长时间。

2.4 检测培养基

定期仔细地观察培养基中细胞的形态和活性。肉眼观察细胞培养基，检查是否污染。这包括异常的pH变化(红色变为黄色或紫色)、浑浊度或有无颗粒。同时，仔细检查是否有小真菌菌落，它们漂浮在液体和空气界面。特别是要检查容器的边缘，因为这些位置不易通过显微镜被检查到。

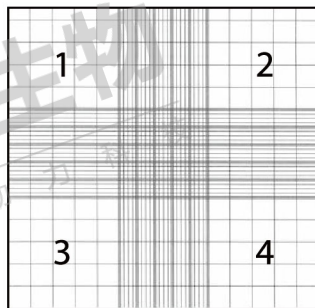


2.5 细胞计数

为了建立或监测细胞生长率，而且为了使已知数量的细胞适应新的培养基，进行细胞计数是很必要的。血细胞计数器通常用于估计细胞数量和确定细胞生存能力。

血细胞计数器是一个较厚的载玻片，有两个计数室，两边各一个。每个计数室有一个镜像表面 3×3 mm， 9 mm^2 的正方形网格。盖玻片和载玻片之间有 0.1 mm 空隙，每 9 mm^2 的格子有 0.0001 ml 。

血细胞计数器能很好的测定细胞活性，但由于相对较少的细胞数量，所以不能精确测定细胞数。自动计数器将产生最可靠的数据，尤其是在结合血细胞计数器的活性测定数据情况下。



2.6 细胞活力

活性分析是检测出总细胞中具有活力的细胞数量。结合细胞的总数分析，有活力的细胞数量是对细胞培养基状态是否良好的一个指标。最常见的和快速的方法，是根据细胞膜的完整性作为细胞活力的指标。台盼蓝和赤藓红B (ATCC No.30-2504) 染色法，可根据有无完整细胞膜区分死细胞和活细胞。

虽然两种试剂的染色方式一致，但ATCC建议用赤藓红B代替台盼蓝。选用台盼蓝，使用前需孵育细胞 2 min 至 5 min 。如果超出这个时间，细胞将开始死亡并着色。赤藓红B不需要孵育。

赤藓红B染色结果更准确，假阴性和假阳性结果更少。赤藓红B染色解决方案提供了一个清晰的背景，不像台盼蓝会结合血清蛋白质，使染色细胞更明显，更容易识别。此外，更容易发现微生物污染或培养基中的沉淀。另外，台盼蓝有毒并且是潜在的致癌物质。

2.7 传代培养单层贴壁细胞

为了保证单层贴壁细胞的对数生长，需要定期传代。当细胞生长接近指数生长后期(汇合率大约70%到90%)，准备传代。针对接种过程，ATCC提供的产品说明中，会推荐细胞传代分配比例和补充培养基策略。

单层贴壁细胞传代，需要打断细胞之间的连接。对于比较松散的连接，猛击培养瓶侧壁，可以分离细胞。很多情况下，需要胰蛋白酶/EDTA的蛋白水解酶来消化。对于一些细胞系，需要采用刮等机械方法分离细胞。细胞分离成为单细胞悬液后，被稀释到适当的密度并转移到新的培养瓶中，在适当的生长培养基中，细胞将再贴壁生长和分裂。

此程序适合大多数贴壁细胞。然而，由于每种细胞都是独一无二的，孵化时间和温度、清洗次数或溶液配方可能会有所不同。分离过程中，应用显微镜密切观察细胞，以防止细胞损伤。这个过程根据容器使用合适的培养体积。

2.8 悬浮细胞

大多数原代细胞、有限传代细胞系和连续传代细胞系都是单层贴壁细胞。其他细胞，尤其是那些来自造血或某些肿瘤组织，是悬浮生长的。

相对于单层贴壁细胞来说，悬浮细胞的传代更具有优势，可以使用稀释的方法来传代。单层贴壁细胞需要蛋白水解酶，会造成细胞损伤。悬浮细胞生长没有延迟。

悬浮细胞对实验室空间要求较小，传代培养是线性放大的。细胞可以在发酵罐中培养，类似于酵母或细菌的发酵罐培养。

根据细胞类型，悬浮培养接种密度从 2×10^4 至 5×10^5 活细胞/ml。收获时细胞密度 2×10^6 细胞/ml。如果细胞接种密度过低，他们将经历增长延迟阶段，增长非常缓慢甚至完全死亡。如果细胞密度过高，细胞可能耗尽培养基中营养，而突然死去。每份ATCC细胞说明书和网站产品描述中，都会注明推荐的接种和传代密度、添加培养基方法及培养基配方。

2.9 在悬浮体系中培养单层贴壁细胞

L-929 (ATCC CCL-1™), HeLa (ATCC CCL-2™) 和 BHK-21(ATCC CCL-10™)细胞系可以适应悬浮体系生长。随着时间的推移，其中的一些细胞不会再自身聚集或者贴壁。然而，这些新的细胞系可能失去原代细胞特性或者获得与原代细胞不同的特性。在大多数情况下，使用机械搅拌保持悬浮状态。切记，大多数贴壁细胞如果要进行悬浮培养，体系中需要有微球的帮助。

3. 完全培养基

3.1 基础培养基

细胞培养基成分复杂，包括盐类、糖类、维生素、氨基酸、代谢前体、生长因子、激素和微量元素。对这些物质的需求因细胞而有差异，这也导致大量的不同培养基配方出现。主要碳源物质通常是葡萄糖，有时也会使用半乳糖代替，这是因为半乳糖的代谢速度较慢。氨基酸（尤其是L-谷氨酰胺）和丙酮酸盐也可作为碳源。



除了营养成分，培养基也会帮助维持培养体系的pH和渗透压。pH的维持依靠一种或多种缓冲液体系，最常见的包括CO₂/NaHCO₃、磷酸盐和HEPES等，血清也可以作为完全培养基的缓冲液。酚红作为pH指示剂加入培养基中，可通过颜色变化监测pH变化。

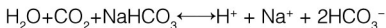
3.2 基础培养基组分

3.2.1 碳酸氢钠和缓冲液

细胞的存活和生长，需要CO₂同时也会产生少量CO₂。在培养基中加入CO₂可以与HCO₃⁻形成平衡，所以很多种类的培养基会通过CO₂/HCO₃⁻体系平衡pH。CO₂直接溶解在培养基中并形成H₂CO₃。随着细胞代谢并产生更多的CO₂，培养基pH下降并导致下面的化学平衡向右移动：



理想的pH范围是7.2—7.4，可以通过补充NaHCO₃和调节上层空气中的CO₂水平来维持，化学过程如下：



组织培养时，细胞可能在开放体系中（培养基上层空气和培养箱中空气可以自由交换）生长，也可能在封闭体系中（培养基上层空气和培养箱中空气相互隔离）生长。培养基中的缓冲体系需要与这些培养方式匹配，否则细胞状态会由于代谢压力而变差。

封闭体系中的CO₂水平是由细胞代谢调节的。培养容器必须密封（如拧紧细胞瓶盖）以保存细胞产生的CO₂。因此，与开放体系相比，封闭体系可以对细胞提供更多的保护以避免污染，对培养箱的要求也更低。封闭体系使用的缓冲体系通常基于Hank's液，该体系的NaHCO₃水平较低。

在开放体系中培养细胞时，可通过控制空气湿度（可以减少培养基蒸发）和CO₂的调节方式（如果培养基含NaHCO₃）来维持pH。在开放体系中，需要含更高NaHCO₃浓度的Earle's平衡盐溶液，并且由培养箱维持5—10% CO₂。通常，1.2—2.2 g/L NaHCO₃配合5% CO₂，3.7 g/L NaHCO₃配合10% CO₂。精确的计量因培养基配方而不同。

有些情况下，研究人员会向培养容器中连续充入过滤除菌并含5% CO₂的空气，然后严格密封并放置在干燥且无CO₂的培养箱中。实际上，这时培养基也是处于开放系统中。

除了Leibovitz's L-15 (ATCC No.30-2008)，ATCC所有培养基都要匹配5% CO₂。绝大多数ATCC培养基含1.5g/L NaHCO₃以及额外的丙酮酸钠。ATCC modification of McCoy's 5A (ATCC No.30-2007)中含2.2 g/L NaHCO₃，无丙酮酸钠。

3.2.2 HEPES 缓冲液

HEPES和其他有机缓冲液可以有效调节培养基pH，适用于多种细胞系。实际上，某些标准培养基配方包含HEPES。但是，HEPES可能会有毒性，尤其是对某些已分化细胞，所以使用前需首先评估其效果。

3.2.3 Phenol red 酚红

酚红可作为培养基的pH指示剂。酚红在低pH时显示黄色，在高pH时则显示紫色。绝大多数组织培养时，pH为7.4，应显示为鲜红色。

3.2.4 L-谷氨酰胺

L-谷氨酰胺(ATCC No. 30-2214)是所有哺乳动物细胞和昆虫细胞的必需氨基酸。与其它氨基酸相比，L-谷氨酰胺在液体培养基中更不稳定。因此，为了延长保质期，商品化的液体培养基中经常不添加L-谷氨酰胺。这种情况下，使用前要先无菌加入L-谷氨酰胺。由于在干燥状态下比较稳定，所以绝大多数干粉培养基中都已预添加L-谷氨酰胺。

3.2.5 非必需氨基酸

所有培养基配方包含十种必需氨基酸，同时包括半胱氨酸、谷氨酰胺和酪氨酸。在一些培养基配方中包含其他非必需氨基酸(丙氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸，甘氨酸，谷氨酸，脯氨酸，丝氨酸)，降低了细胞的代谢负担，有利于细胞增殖。

3.3 培养基添加物

ATCC推荐的完全培养基，需要添加一些在基础培养基和血清中没有的成分，包括激素，生长因子及信号分子，目的是维持细胞增殖和正常的细胞代谢功能。

添加物可以改变完全培养基的渗透压，这可能影响细胞的生长。加入添加物后，最好重新检查一下完全培养基的渗透压。对于脊椎动物细胞系适宜的渗透压在260 mOsm/kg 到 320 mOsm/kg。

添加剂加入基础培养基后，完全培养基的保质期需要根据具体情况决定。如果完全培养基包含蛋白类添加剂(如：表皮生长因子、牛血清白蛋白等)，降解速度会比基础培养基更快。

3.4 渗透压

虽然大多数细胞系可以承受的渗透压压力范围比较宽泛，但脊椎动物细胞承受的压力范围较窄，在260 mOsm/kg 至 320 mOsm/kg。相比之下，无脊椎动物细胞承受的渗透压不在这个范围内。例如，蜗牛胚胎(ATCC CRL-1494™)，需要渗透压大约155 mOsm/kg，然而有些昆虫细胞在360mOsm/kg至375 mOsm/kg更适宜生长。大多数商业培养基会标注渗透压，在盐溶液，药物或者激素溶解在酸性或碱性溶液，或者加入较大体积缓冲溶液(如：HEPES)后，需要检测培养基渗透压。

3.5 抗生素或抗真菌剂

抗生素或抗真菌剂加入到细胞培养基中一般用于以下目的：1) 预防污染；2) 一旦发现污染作为一种挽救手段；3) 诱导表达重组蛋白，4) 保持转染细胞的选择性压力。在常规细胞培养中，除非特别需要(比如用G418维持转染细胞的选择压力)，一般不推荐使用抗生素或抗真菌剂。因为抗生素对许多细胞有毒性，并且掩盖支原体、细菌污染。此外，它们可以干扰敏感细胞的代谢。

如果使用抗生素，青霉素链霉素溶液(ATCC 30-2300)可以每100ml的细胞培养液加入0.5-1 ml，使青霉素终浓度为50-100 IU/ml，链霉素终浓度为50-100 μg/ml。另一种抗生素庆大霉素(ATCC30-2303)，使用终浓度为50-100 μg/ml。抗真菌两性霉素B(ATCC 30-2301)使用终浓度2.5 μg/ml。以上浓度适用于含血清培养基。对于无血清培养基，至少减少50%的浓度。

3.6 动物血清

血清在细胞培养中为细胞提供氨基酸，蛋白质，维生素（特别是脂溶性维生素如A，D，E，K），碳水化合物，脂肪，激素，生长因子，矿物质及微量元素。此外，血清还可以缓冲培养基，抑制蛋白酶酶，增加培养基的粘度，降低在移液或搅拌时造成的剪切力。目前血清确切的成分是未知的，而且批次差异比较大。

3.6.1 储存

血清在-20℃或更低温度可以储存30天以上。ATCC血清通常存储在-70℃。请勿在高于-20℃条件下储存血清。建议将血清分装储存，避免反复解冻。

3.6.2 解冻

血清解冻程序如下：

- 1.将血清放置于2-8℃过夜；
- 2.把瓶子放在37℃水浴中，轻轻晃动混匀集中在瓶底的溶液。

血清溶解后，不要继续放置在37℃。也不要将血清放置于更高温度解冻。若在40℃以上水浴解冻血清，并且解冻时不混匀，将导致瓶内出现沉淀物。

3.6.3 浑浊和沉淀

所有的血清可能保留一些纤维蛋白原。某些外部因素可能引发纤维蛋白原转变为纤维蛋白，导致血清解冻后可能会观察到絮状物或混浊。这些物质的存在不会改变血清的性能。如果有必要，可以通过0.45 μm滤膜过滤去除。

如果在37℃或更高的温度解冻血清时间太长，血清中会出现沉淀。这个现象可能被误认为是微生物的污染。此沉淀可能包括磷酸钙结晶，但不改变血清的性能。血清热灭活也会导致沉淀的形成。

3.6.4 热灭活

通常ATCC不使用热灭活血清，除非某特定的细胞系特别需要。热灭活通常是不必要的。热灭活会降低或破坏血清中的生长因子，影响某些细胞的生长。

热灭活最初是为了灭活补体及支原体。目前，如果血清中出现支原体，可以通过过滤去除。而去除补体通常是不必要的，除非是在准备或检测病毒或细胞毒性试验时。有研究显示，血清37℃孵育就可以灭活血清中热不稳定的补体成分。只有很少一部分细胞在这种灭活血清中生长得更好。如胚胎干细胞和许多昆虫细胞。

下面的程序可用于热灭活血清：

- 1.解冻血清。
- 2.水浴56℃预热。放入血清瓶，使用足够的水保证水面没过血清。
- 3.温和的倒置血清瓶，再放入水浴，水浴的温度将下降。
- 4.当水浴温度再次达到56℃，继续加热30 min。每5min轻轻混匀，以保证均匀加热。
- 5.从水浴中取出血清瓶，快速冷却（缓慢冷却有时可能使失活补体再次恢复活性），-20℃或更低温度储存。

4. 低温储存

4.1 综述

随着细胞被冷冻至冰点以下，悬液中冰晶和溶质的浓度有所增加。如果冷却过程中，胞内水分可以渗出细胞，则可以减少胞内冰晶。通常1°C/min的降温速度可以促进此过程。但是，水分的丧失会导致细胞收缩，当这种收缩达到一定程度，又会导致细胞活性的剧烈下降。冷冻保护剂，如甘油或者二甲基亚砜（DMSO），可以缓解这种效应。细胞冻存的标准程序是在含有冷冻保护剂的培养基中，将细胞缓慢冷冻至-70°C，然后将冻存管转移到液氮中以保持低于-130°C的环境。

4.2 冻存培养基

5%–10%的甘油和DMSO是最常见的冻存保护剂。虽然DMSO对细胞有毒性，但是与甘油相比，其渗入细胞的速度更快，而且冻存重复性更好（而且细胞复苏效率更好）。但是，DMSO一方面会导致某些细胞（如HL-60早幼粒细胞）分化，另一方面对某些细胞（如HBE4-E6/E7肺上皮细胞）的毒性也过大。对于这些细胞，则应使用甘油。甘油可以通过高压蒸汽灭菌，而DMSO只能通过过滤除菌。DMSO或者甘油至少应达到试剂级（或者更高级别，如细胞培养级），并且分装，避光保存。

4.3 冻存管

冻存管材质分为两种：玻璃或者塑料。玻璃管更难操作，但更适合珍贵细胞的长期保存，而且一旦适当密封，其安全性也更高。

4.4 程序降温盒

有很多方法可以实现1°C/min的降温速度。电脑控制的可编程电子降温系统是最好的方式，可以精确保持降温速度。这也是ATCC唯一采用的方法。但这种设备价格较高，仅当对冻存非常敏感的细胞时才有必要使用。

比较经济的方式是将冻存管放置于冻存盒中，在低于-70°C的冰箱中冻存24小时。已有一些商业化冻存盒产品能够非常接近1°C/min的理想降温速度。或者可以将冻存管放置于壁厚大约15mm的1L容积的聚苯乙烯盒子中，并填充入纸、棉绒或者泡沫起到隔热的作用。

4.5 液氮罐冻存

长期保藏所需要的超低温（低于-130°C）环境，可以使用低温冰箱，更普遍的方法是保存在液氮罐中。液氮储存分为两种方式：将冻存管完全浸入液氮中或者悬于液氮液面以上的蒸气中。液体体系需要更多的液氮，后期维护简单，但是液氮有可能进入密封不严的冻存管中，并在细胞复苏时发生冻存管爆炸。

因此，ATCC强烈建议保存在液氮蒸气中。液氮蒸气会在罐内产生一个垂直的温度梯度。液氮底层为-196°C，而上层温度会受到液氮余量和液氮罐敞口时长的影响。为保证储存安全，请确保罐中液氮充足，以使上层温度低于-130°C。所有的储存系统都应配备温度报警装置。



4.6 冻存程序

以下程序适用于大多数细胞，如果必要，可以适当调整。冻存培养基的配方请参考其细胞说明书。收获时，细胞应处于指数生长期。

1. 冻存前先检测细胞是否受到细菌、真菌、支原体和病毒的污染。通常冻存后10–14天才能得到污染检测结果，如果确定有污染，应将该细胞销毁。

2. 冻存培养基由完全培养基和5% DMSO (ATCC No. 4–X) 组成。由于DMSO的溶解会放热，所以不能向细胞悬液中直接加入未稀释的DMSO。

3. 以温和速度 ($125g \times 10 \text{ min}$) 离心收集细胞，并以 1×10^6 – 5×10^6 活细胞/ml 的密度重悬细胞。继续培养细胞直到复苏后细胞活性得以确定。

4. 在冻存管上标记好细胞名称，编号和冻存日期等信息。然后每管加入1–1.8 ml 细胞悬液 (视冻存管体积) 并密封。

5. 室温条件下，将细胞在冻存培养基中平衡15–40 min (勿超)。这段时间中，可以将细胞悬液等分加入冻存管中。40min后，细胞活性可能会受到DMSO的影响而下降。

6. 将冻存管置于已预冷至4°C的程序降温盒，并将降温盒置于–70°C (或更冷) 的冰箱中至少24小时。或者，使用已预冷至4°C的可编程电子降温系统以1°C/min的速度将冻存管降温至–40°C以下，然后迅速降至–130°C。

7. 将冻存管迅速转移至液氮罐或者–130°C冰箱。通常，冷冻的细胞会以10°C/min的速度升温，一旦达到–50°C以上，细胞会剧烈受损。

8. 记录冻存位置和过程细节等信息。

9. 置于–130°C 24小时后，取出一只冻存管并复苏，以测定细胞活性和是否污染。

4.7 冻存细胞复苏

应以最快速度融化冻存的细胞溶液，然后迅速与完全培养基混合，并接种到合适的细胞瓶中。虽然单层培养的细胞可以从多孔板中复苏，但其复苏状态和细胞培养瓶并不一致。

杂交瘤等某些细胞系的完全复苏时间可能需要几天。在复苏的第一天，某些杂交瘤细胞活性较差且会产生细胞碎片。复苏时，多数细胞都会出现活性下降的现象，并在融化后24小时达到活性最低值。即使不是全部，这种活性下降的多数情况可能是由冻存过程中压力变化诱导的凋亡导致的。在这个时间点后，细胞开始恢复并进入指数生长期。

1. 准备细胞培养容器 (如T–75细胞瓶)，加入至少10 ml适当的培养基，并平衡温度及pH。

2. 从液氮罐中取出冻存管，并在37°C (或适合该细胞的温度) 水浴中缓慢摇动至冰晶彻底融化 (约2 min)，注意解冻过程要迅速。

3. 从水浴中取出冻存管，浸泡入或者喷涂酒精消毒。后续的操作，需在无菌操作台中，并保证严格无菌。

4. 拧开冻存管盖，将细胞悬液转移至含有9 ml完全培养基的无菌离心管中。温和离心 ($125g \times 10\text{min}$)，弃去上清即冻存保护剂，注意不要扰动细胞层，加入1–2 ml完全培养基重悬细胞。缓慢吹打使细胞团变松散 (如果细胞成簇生长，则不要过分吹打)。将细胞悬液转移至含培养基的容器中充分混合。

5. 24小时后，检测细胞状态。如果需要，可以进行传代。

ATCC FROM 1925



权威

ATCC致力于为科研领域提供世界上最全最多样化的人、动物和植物细胞。



可靠

ATCC每株细胞都经STR基因分型鉴定正确。选择正确的细胞，是实验成功的一半！

Nature杂志，将**严格审查**论文所涉及的细胞系的来源。选用ATCC细胞，使您**轻松面对**审核！

ATCC中国独家代理
北京中原生物



www.sinozhongyuan.com

400-8100-881