

High 5细胞传代SOP

1.主要仪器

仪器名称	型号/厂家
生物安全柜	苏州安泰空气技术有限公司
组合式全温度振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
显微镜	上海无陌光学仪器有限公司
Count star自动细胞计数仪	上海睿钰生物科技有限公司
低速离心机	安徽中科中佳科学仪器有限公司
冰箱	长虹美菱股份有限公司
电热恒温水箱	天津市泰斯特仪器有限公司
电动移液器	Thermo

2.主要试剂

试剂名称	货号	生产公司
Express Five SFM	10486-025	Gibco
DMSO	D2650-100mL	SIGMA

3. 实验步骤

3.1细胞复苏

- (1) 37°C预热培养基。准备15ml离心管中加入10mL 预热培养基，备用。
- (2) 根据细胞冻存记录找到High5细胞，同时核对冻存管上的信息。
- (3) 迅速将冻存管放入37°C水浴锅中，并不断摇动，约1-2min后冰块融化至绿豆大小时，即可拿出，擦干冻存管外壁并用酒精消毒，再放入安全生物柜中(水浴溶解时不要让水没过冻存管螺旋口)。
- (4) 待冻存管外壁酒精挥发，将细胞加入步骤1中添加10 mL 培养基的离心管内，1000rpm，离心5min(该步骤目的在于去除DMSO)。弃上清，向离心管中加入5mL培养基，轻轻吹打成悬液。
- (5) 将悬液加入125mL摇瓶，冻存规格为 1.0×10^7 cells/支，将培养基补至30mL。计数，观察并记录细胞状态。

3.2 细胞传代

- (1) 提前37°C预热培养基。

HI5 培养基：Express five +9%Gln

- (2) 细胞计数。提前打开电脑及计数仪。在生物安全柜中取100-200ul细胞于EP管中。细胞涡旋混匀，取样20ul，从计数板月牙形加样口缓慢匀速地加入细胞，计数。一般细胞密度在 $2.0-4.0 \times 10^6$ cells/ml，活力在90%以上，活细胞状态良好，传代培养；反之，重新复苏细胞。

(3) 传代。一般传代密度 $0.3-0.5 \times 10^6$ cells/ml，2-3d，细胞生长至 $2-5 \times 10^6$ cells/ml。如果传代密度为 0.5×10^6 cells/mL，则两天后需要再次传代；传代密度为 0.3×10^6 cells/mL，则三天后需要再次传代。

(4) 细胞传代一个月，为防止细胞老化而影响转染等实验，则重新复苏该细胞。

3.3 细胞冻存

(1) 计数。活力90%以上，生长速率正常，细胞密度在 $2.0-4.0 \times 10^6$ cells/ml之间，适合冻存。冻存规格为 1.0×10^7 cells/支。冻存管最大体积1.8ml。根据冻存规格，配置一定体积的冻存液，冻存液为90%培养基+10% DMSO，4°C存放半小时待用。冻存液现配现用。

(2) 标记冻存管以及准备冻存盒。一般冻存管管盖标记细胞名称，侧面标记细胞名称、冻存规格、冻存日期。标记完后，喷酒精放至安全柜中，待用。检查孔内是否残留异丙醇（防止异丙醇溶解标记。每次使用冻存盒时注意补齐异丙醇到相应液面，冻存3-5次更换异丙醇）。

(3) 根据冻存数量，计算所需细胞悬液的体积。在生物安全柜内取所需的细胞悬液，室温离心。1000rpm，离心5min。弃上清。加入(1)中冻存液，轻轻吹匀细胞，分装，拧紧。一般每支冻存管分装1.0ml。最终放入冻存盒中，平端冻存盒尽快放入-80°C冰箱中。第二天，放液氮。

(4) 在细胞冻存表中记录冻存的细胞、冻存量以及日期。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台