**哺乳动物细胞培养操作流程**

1. 材料和设备
2. 超净工作台
3. 倒置相差显微镜
4. 离心机
5. 二氧化碳培养箱
6. 恒温水浴锅
7. 防护面罩
8. 血球计数仪
9. 电动移液枪
10. 一次性无菌移液管
11. 废液缸
12. 75%酒精
13. 抽纸
14. 培养瓶
15. 离心管
16. 离心管架
17. 完全细胞培养基
18. 无菌PBS溶液
19. 细胞消化液
20. 胎牛血清
21. 细胞冻存管
22. 细胞冻存液
23. DMSO
24. 冰箱
25. 液氮罐
26. 哺乳动物细胞复苏操作  
    1. 设置恒温水浴锅温度至37 oC，加热。

2. 打开超净工作台紫外线灯开关，照射30分钟。

3. 启动超净工作台风机，鼓风20分钟。

4. 使用75%酒精和抽纸清洁超净工作台台面。

5. 将完全细胞培养基、电动移液枪、一次性5毫升无菌移液管、离心管架、15毫升离心管、培养瓶和废液缸等物品放入超净工作台内，远离进风栅栏。

6. 使用无菌操作技术，使用电动移液枪和一次性5毫升无菌移液管吸取9毫升完全细胞培养基至15毫升离心管内，待用。

7. 在穿戴好防护面罩的情况下，从液氮罐中取出冻存的细胞，并迅速置于37 oC恒温水浴锅中融化。

8. 将融化的细胞转移至超净工作台内，使用无菌操作技术，将细胞吸至盛有9毫升完全细胞培养基的15毫升离心管中。

9. 离心管平衡后，1000 RPM, 室温离心5分钟。

10. 在超净工作台内，将离心管中的上清吸出，并弃于废液缸中。

11. 吸取5毫升的完全培养基至离心管中，重悬浮细胞沉淀，并转移至T25细胞培养瓶中，轻旋瓶盖，留少许空隙，便于二氧化碳气体交换。

12. 将培养瓶放置二氧化碳培养箱进行培养。

1. 哺乳动物细胞传代操作

1. 使用倒置相差显微镜观察细胞生长情况。待细胞汇合度到达90%以上时，进行细胞 传代。

2. 打开超净工作台紫外线灯开关，照射30分钟。

3. 启动超净工作台风机，鼓风20分钟。

4. 使用75%酒精和抽纸清洁超净工作台台面。

5. 将完全细胞培养基、电动移液枪、一次性无菌移液管、离心管架、离心管、培养瓶、PBS溶液、细胞消化液、废液缸和培养的细胞等物品放入超净工作台内，远离进风栅栏。

6. 对于悬浮培养细胞，使用无菌操作技术，将细胞悬液转移至离心管中，1000 RPM, 室温离心5分钟。吸弃上清，再使用3倍原始培养体积的完全细胞培养基重悬浮细胞沉淀，分配至3个新的培养瓶中，放置二氧化碳培养箱进行培养。

7. 对于贴壁细胞，使用无菌操作技术，吸弃培养基，再使用1倍原始培养体积的PBS溶液轻柔漂洗细胞。吸弃PBS溶液，加入0.5倍原始培养体积的细胞消化液消化细胞。倒置相差显微镜下观察细胞消化程度，待90%的贴壁细胞自瓶壁上脱落时，迅速加入1倍原始培养体积的完全细胞培养基中和细胞消化液。将消化的细胞转移至离心管中，1000 RPM, 室温离心5分钟。吸弃上清，再使用3倍原始培养体积的完全细胞培养基重悬浮细胞沉淀，分配至3个新的培养瓶中，放置二氧化碳培养箱进行培养。

8. 对于半贴壁细胞，使用无菌操作技术，吸弃培养基，再使用3倍原始培养体积的完全细胞培养基反复吹打细胞，将细胞自瓶壁上解离，然后分配至3个新的培养瓶中，放置二氧化碳培养箱进行培养。

1. 哺乳动物细胞冻存操作
2. 使用倒置相差显微镜观察细胞生长情况。待细胞汇合度到达90%以上时，进行细胞 传代。
3. 打开超净工作台紫外线灯开关，照射30分钟。
4. 启动超净工作台风机，鼓风20分钟。
5. 使用75%酒精和抽纸清洁超净工作台台面。
6. 将完全细胞培养基、电动移液枪、一次性无菌移液管、离心管架、离心管、PBS溶液、细胞消化液、废液缸和培养的细胞等物品放入超净工作台内，远离进风栅栏。
7. 使用上述细胞传代中的细胞解离方法，将培养的细胞自培养瓶瓶壁上解离，使用血球计数仪对悬液中的细胞数目进行计数。将细胞悬液转移至离心管中，1000 RPM, 室温离心5分钟。吸弃上清，按照1x106细胞数/毫升的密度，加入相应体积的细胞冻存液。以1毫升/管，分装到细胞冻存管中。
8. 分步降温冻存。将细胞冻存管依次置于4 oC冰箱1小时，-20 oC冰箱1小时和-80 oC冰箱过夜，然后液氮或液氮气相中保存。

五、注意事项和事项说明

1. 完全细胞培养基。

不同的细胞，使用不同的细胞培养基，参照购买细胞时的商品说明书配制完全培养基。常用的细胞培养基有RPMI-1640和DMEM培养基。胎牛血清的浓度一般为10%。

2. 细胞消化液。

常用的细胞消化液有胰酶细胞消化液、EDTA细胞消化液等。一般使用商品化的细胞消化液。

3. 细胞冻存液。

常用的细胞冻存液配方为：70%培养基，20%胎牛血清和10%DMSO。可使用商品化的细胞冻存液。

4. 培养基废液处理。

培养基废液应通过高压灭菌进行无害化处理。

六、视频链接

1. 细胞培养操作流程

[凯基生物远程课堂——细胞培养基础-教育-高清完整正版视频在线观看-优酷 (youku.com)](https://v.youku.com/v_show/id_XOTI2MDI5Nzc2.html?spm=a2h0c.8166622.PhoneSokuUgc_21.dscreenshot)