

仅供科研使用

版本号: B 版

B95-8 细胞说明书

【货号】 BC-C-MO-003**【规格】** 1*10⁶ 个/T25 培养瓶 (或冻存管)**【保存】** 液氮保存, 长期**【产品介绍】**

英文名称	B95-8 (种属鉴定正确)
中文名称	绒猴 EB 病毒转化的白细胞 (种属鉴定正确)
种属	猴源
组织来源	外周血淋巴细胞
生长特性	悬浮生长
细胞形态	淋巴母细胞样
传代比例	3×10 ⁵ -5×10 ⁵ cells/mL
换液频率	2~3 次/周
培养体系	RPMI-1640+10% FBS+1% P/S
培养条件	5% CO ₂ ; 37℃
冻存条件	冻存液: 90%FBS+10%DMSO; 液氮中长期保存。

【操作步骤】**【细胞复苏】**

1、取出 1mL 冻存管后, 迅速放入 37℃ 水浴锅中不断摇晃使其解冻, 直至冻存管中无结晶 (此过程尽量在 2min 内完成);

2、准备 15mL 离心管, 加入 2-6mL 完培, 将冻存管中的细胞悬液移至离心管, 1000 rpm 离心 3~5min; (比较难养的细胞可适量增加离心管中的完培)

3、吸弃上清, 用新鲜培养基重悬细胞, 接种至无菌的培养器皿中, 轻晃动混匀后放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

注: 复苏第二天若细胞状态较好, 但漂浮碎片较多可做换液处理;

复苏的细胞需要时间恢复状态, 当复苏好后密度低于 80% 时, 2 天内暂时不要换液, 细胞生长状态恢复后再进行后续传代等操作;

【细胞传代】

当细胞汇合度达到 80%-90%，即可传代培养。

收集细胞：贴壁细胞可以参考以下方法 1、吸去培养液，加入不含钙镁的 PBS，轻轻润洗瓶底 1-2 次，吸弃 PBS；2、加入 0.25%胰酶-EDTA 消化液（T25 瓶 1-2mL，T75 瓶 2-3mL），铺匀瓶底放入培养箱中消化 1-2min；（部分细胞贴壁较牢，可采用分步消化：将消化下来的细胞转移至离心管终止，在培养瓶中加入胰酶继续消化，直至大部分细胞脱落）3、倒置显微镜下观察大部分细胞变圆脱落，迅速加入完全培养基终止消化，完培与胰酶比例为 2:1；4、轻轻吹打细胞后吸出转移至离心管中。**半贴壁半悬浮细胞需先收集悬液至离心管再参考贴壁细胞操作。**

离心：收集好的细胞在 1000rpm 条件下离心 3~5min，离心好后弃除上清液。

接种：准备好新的培养瓶并添加适量完全培养基，在离心管加入 1-2mL 完全培养基重悬吹打均匀，初次传代将细胞悬液按 1:2 比例接种到新的培养瓶中，后续可根据细胞实际情况按 1:2-1:4 的比例传代；接种完成后放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

悬浮细胞建议采用半换液传代：将培养瓶站立静置 5-10min，肉眼可见细胞沉底，吸取 1/2~2/3 上清至离心管离心，将瓶内剩余悬液按 1:2 或 1:3 的比例转移至新的培养瓶，将离心管中的细胞重悬后放入培养瓶添加新鲜完全培养基即可。

【细胞冻存】

收集细胞参考细胞传代步骤。

冻存液重悬：细胞按照传代步骤收集细胞至离心管并计数，根据计数的密度决定细胞冻存数量，一般推荐细胞冻存密度为 1×10^6 - 1×10^7 个活细胞/管。离心后弃上清，加入配制好的冻存液重悬，分配到冻存管中，每管 1mL。

冻存：将冻存管放入程序降温盒中进行梯度降温，然后放入 -80℃ 冰箱降温，24h 后将冻存管转入液氮罐中。若没有冻存盒，可于冰箱 4℃ 放置 30min，随后转移至 -20℃ 冷冻 2h，接下来将其放于 -80℃ 超低温冰箱中过夜，最终放置于液氮中以长期保存。

【注意事项】

(1) 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全柜内操作，并注意防护。所有废液及接触过此细胞的器皿需灭菌后方能丢弃。

(2) 若细胞在操作过程中发生污染，需对污染的细胞进行灭活方可丢弃。

(3) 本库的细胞系（株）仅用于科研工作，未经许可不得用于其他目的，使用者不得将本库细胞系（株）转让给第三者。

(4) 细胞到货后建议在前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续用。