

细胞冻存液说明书

冻存/解冻标准流程

TBD598、TBD698 可以按照下列步骤操作，TBD798 需要先使用自体血浆配制然后冻存。

建议冻存细胞密度为 $1 \times 10^6 - 10^7$ 个/ml

一. 冻存

1. 在室温以 300 x g 离心 5 分钟。
2. 轻轻吸走上清液，注意不要扰动细胞团。
3. 用血清学吸管以 1 mL 的细胞冻存液重悬细胞。在打散细胞团时，尽量减少细胞聚集体分解。
4. 用 2 mL 的血清学吸管将 1 mL 的细胞聚集体转移到标记好的冻存管中。
5. 用以下方法冻存细胞聚集体：

推荐使用缓速降温方法，每分钟降低 1 度，随后可以在 -196° C 液氮长期保存。不推荐在 -80° C 长期保存。

逐步降温法：-20° C 保存 2 个小时，然后 -80° C 中保存 2 个小时，随后可以在 -196° C 液氮中长期保存。

二. 解冻

解冻后，应该立即铺板在预先包被好的培养皿中。上述冻存的一管细胞可以成功的铺板到 6 孔板的 1 - 2 孔。

1. 开始之前，提前准备好以下材料：试管，恢复至室温的培养基，预先包被的培养板，确保整个解冻复苏程序可以在最短的时间内完成。

注意：不要在 37° C 水浴中加热培养基。

2. 在 37° C 水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管，直到剩余少量细胞还处于结冰状态。

3. 水浴中取出冻存管，用 70% 的酒精或异丙醇擦拭除菌。

4. 用 2 mL 的血清移液管把细胞悬液转移到一个 15 mL 的锥形试管。

注意：用 2 mL 的血清移液管代替 1 mL 的枪头可以减少细胞聚集体的分解。

5. 逐滴加入 5 - 7 mL 的预热的培养基到 15 mL 的离心管中，加入的同时轻轻混匀。

6. 室温以 300 x g 离心 5 分钟。

7. 吸出培养基，使细胞沉淀完好无损。使用 2 mL 血清移液管轻轻将细胞沉淀重悬于 1 mL 的培养基中。小心保持细胞作为聚集体。

8. 将 0.5 mL 的细胞混合物转移到含有培养基的预包被的 6 孔板的培养孔中（例如，每个冻存管可以铺板两个孔）。

9. 将培养板放入 37° C 培养箱。快速前后左右的摇晃培养板数次，将细胞聚集体分布均匀。24 小时内不要移动培养板。

10. 每天换液，目测培养物以评估生长状态直到下一次传代。解冻复苏后的 6 - 7 天，查看是否有适合传代的（中心致密的）未分化的集落。

注意:解冻复苏后如果只能观察到少数的未分化的集落,只选取这些未分化的集落进行传代,并将它们铺板至相同大小的新包被的培养孔(不进行稀释传代)。

TBD798 完全冻存液制备:

- 1.取新鲜抗凝血(枸橼酸钠抗凝), 300g, 离心 10min。
- 2.自体血浆制备:
 - (1)取上半部分 $\frac{2}{3}$ 的血浆层, 放入 50ml 离心管中, 56℃, 灭活 30min
 - (2)取出离心管, 放入-20℃静置 10min
 - (3)取出离心管, 4℃, 1100g, 离心 15min
 - (4)取出上面部分澄清血浆层, 放入新 50ml 离心管中
- 3.即用型冻存液配制: 灭活后血浆: 冻存液按照 1:4 比例混合, 即可成即用型冻存液。(例: 800 微升冻存液加 200 微升灭活血浆)
- 4.离心后沉淀部分可使用分离液获得高纯度细胞。
- 5.分离后得到的细胞按照上方冻存/复苏流程进行操作。

