

# 冻存细胞复苏说明书

复苏细胞采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短时间内融化，避免由于缓慢融化使水分深入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤，最大限度的保持细胞活力。

**实验设备：**恒温水浴锅、生物安全柜、微量移液器、离心机

**试剂耗材：**离心管，吸管若干，蓝枪头，不含钙镁的磷酸盐缓冲液（DPBS），含有 10%血清的 DPBS（血清可以替换成 0.5%BSA/HSA，若需培养可以换成相应的培养基）。

**实验步骤：**

1 37°C水浴锅提前设置好，在离心管中预先加入 1-2mL 含有 10%血清的 DPBS 备用。

2 从液氮取出冻存的细胞，将管盖旋开 1/4，迅速拧紧后（防止由于热胀冷缩导致细胞冻存管炸裂），立即放入 37°C水浴锅中融化，并不时摇动使其尽快融化动作尽量轻柔避免造成细胞损伤）。

3 细胞悬液融化好（冻存管内还保留少量冰晶）后，用蓝枪头小心吸取冻存液于离心管内，缓慢加入 10%血清的 DPBS 定容至 14mL 混匀（为了能够得到更多的细胞，请清洗冻存管壁和管盖 2-3 次）后准备离心。

4 离心前，一定配平！400g，10min。

5 小心弃掉上清液，缓慢加入含有 10%血清的 DPBS 1~2mL，缓慢吹散细胞，根据不同的细胞规格补一定量的含有 10%血清的 DPBS，混匀。

6 取 20 $\mu$ L 细胞加入 180 $\mu$ L 的含有 10%血清的 DPBS 混匀（具体稀释比例可参考不同细胞计数仪的置信区间浓度），吸取 12 $\mu$ L 稀释过的细胞与 12 $\mu$ L 的 AO/PI 染色液混匀后，上机计数。

**注意事项：**

1 取出冻存管后，要迅速放入 37°C融化，避免细胞缓慢融化而破坏细胞。

2 离心时，避免转数过大或时间过长对细胞产生损伤，同时也不利于重悬细胞可根据细胞用途调整离心转速，但转速较低，离心时间较短可能会造成细胞损失。