北京优尼康生物科技有限公司
地址：北京市朝阳区双营路 11 号 3 号楼 2 单元 2101
电话：8610－64814053/54 ext.8005
传真：8610－64814275/76 ext.8008
Email: sales@bjunique.com

Greiner 冻存管安全使用须知

冻存管使用不当， 会有爆、生物安全威胁及人身伤害等风险冻存管使用不当， 会有爆、生物安全威胁及人身伤害等风险冻存管使用不当，会有爆、生物安全威胁及人身伤害等风险

细胞冻存流程 细胞冻存流程

用预热过的 PBS 对细胞进行冲洗，弃去 对细胞进行冲洗，弃去 PBS 后，加入含 后，加入含 后，加入含 EDTAEDTAEDTAEDTA的胰酶消 化液对细胞进行消（薄地覆盖表面即可，浓度须 化液对细胞进行消（薄地覆盖表面即可，浓度须 化液对细胞进行消（薄地覆盖表面即可，浓度须 根据不同的细胞系进行调整）。 根据不同的细胞系进行调整）。

37 ℃消化 细胞 3－5分钟，不可过度消化。

一旦细胞从底部脱离，即可用含血清培养基终止消化并吸管轻吹 一旦细胞从底部脱离，即可用含血清培养基终止消化并吸管轻吹 一旦细胞从底部脱离，即可用含血清培养基终止消化并吸管轻吹 一旦细胞从底部脱离，即可用含血清培养基终止消化并吸管轻吹 一旦细胞从底部脱离，即可用含血清培养基终止消化并吸管轻吹 打以重悬细胞 。

离心（ 500 00 00 × g, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 min）细胞重悬液以沉淀， ）细胞重悬液以沉淀， 弃上清， 用含血清培养 基对细胞沉淀进行重悬。

对细胞进行计数（推荐 Neubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamber Neubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamberNeubauer chamber）。

离心（ 500 500 500 500 × g, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 ming, 5 min）细胞重悬液，弃上清。用适当体积含血培养基 ）细胞重悬液，弃上清。用适当体积含血培养基 重悬细胞。

将细胞重悬液以 1:11:1 比例与冻存液（ 比例与冻存液（ 60% 培养基， 培养基， 20% FCS20% FCS20% FCS 20% FCS 20% FCS，20% DMSO20% DMSO20% DMSO20% DMSO20% DMSO20% DMSO20% DMSO20% DMSO） 进行混合后转移至 Cryo.sCryo.sCryo.s Cryo.sCryo.sTM 冻存管中。细胞的浓度应为 1－5 × 10 6 细胞 /ml 。

含有细胞的冻存管须按照 .1 K/min1 K/min1 K/min1 K/min1 K/min1 K/min1 K/min的冷却速率进行冻。将存管插在 的冷却速率进行冻。将存管插在 的冷却速率进行冻。将存管插在 含异丙醇的冻存 盒小室并放置在 .70 ℃的冰箱中可以实现上述要求。如果 的冰箱中可以实现上述要求。如果 的冰箱中可以实现上述要求。如果 冻存液中含有其他类型的样品时，则需要将 冻存液中含有其他类型的样品时，则需要将 Cryo.sCryo.sCryo.s Cryo.sCryo.sTM 冻存管在 .20 ℃， .70 ℃或者液氮的气相层进行 直接冻存。为确保每个样品的均一效 果， 4 ml 和 5 ml 的 Cryo.sCryo.sCryo.s Cryo.sCryo.sTM 冻存管需在 .20 ℃过夜冻存后再转移至 70 ℃ 或者液氮的气 相层。

北京优尼康生物科技有限公司
地址：北京市朝阳区双营路 11 号 3 号楼 2 单元 2101
电话：8610－64814053/54 ext.8005
传真：8610－64814275/76 ext.8008
Email: sales@bjunique.com

然后将 Cryo.sCryo.sCryo.s Cryo.sCryo.sTM 冻存管转移至液氮罐。为避免污染（例如支原体）并考 冻存管转移至液氮罐。为避免污染（例如支原体）并考 冻存管转移至液氮罐。为避免污染（例如支原体）并考 冻存管转移至液氮罐。为避免污染（例如支原体）并考 虑到安全预防规范的要求，建议将 虑到安全预防规范的要求，建议将 Cryo.sCryo.sCryo.s Cryo.sCryo.sTM 冻存管放置在 液氮上方的气 相层而非液氮。

细胞复苏流程
从液氮罐中取出冻存管后立即将其置于37℃水浴中进行解冻，解冻时间约1－2min，解冻时需要不停摇动冻存管令其尽快融化。此步解冻过程越快越好。

将解冻好的细胞悬液转移到15ml离心管，并立即添加一定量含血清培养基进行混合。

离心（500 ×g, 5 min）细胞重悬液，弃去上清。用适当体积的含血清培养基对细胞沉淀进行重悬后分装到1个或多个细胞培养瓶中。

请遵循细胞接种时的推荐浓度进行培养。

接下来的12个小时细胞需要静置培养。

细胞换液可在24－48h后进行。

Cryo.sTM冻存管安全使用建议
使用冻存管储存样本时，严格要求应把冻存管放入液氮的气相层或冰箱中保存！如果冻存管储存于液氮液体中，液氮有一定几率会渗入冻存管内部，复苏时液氮气化导致管内外压力不平衡，这样极易造成冻存管的炸裂，并具有生物危害性。

操作冻存管复苏，全程使用安全防护设备，建议穿实验服、戴棉质手套且在安全的实验台上进行操作。条件允许情况下，请佩戴护目镜或防护面罩。由于夏季室内温度会高于冬季，请格外小心。

冻存细胞储存过程中，冻存管的冷冻温度须均匀。不均匀的受冻将会导致冰塞的产生，冰塞会抑制两侧的液体温度传递进而产生危险的高压力并导致冻存管受损。

冻存的样本量不要超过冻存管要求的最大工作体积。

北京优尼康生物科技有限公司