KD-Freeze无血清细胞冻存液使用说明（1.2版）

# 产品说明

本产品为无血清、无动物源成分的细胞冻存液，适用于HEK293细胞、CHO细胞及杂交瘤细胞的冷冻保存。

本产品使用优点：

1. 细胞化冻复苏后可直接培养，无需离心去除冻存液；
2. 减少细胞在洗脱常规冻存液过程中的机械损伤，复苏成功率高；
3. 避免来自血清或动物来源成份的病原体污染。

# 冻存液使用前的准备

1. 本冻存液适合HEK293细胞、CHO细胞及杂交瘤等细胞的冻存，使用时无需添加任何添加物，开封即可使用；
2. 从4℃冰箱取出的冻存液可立刻使用，无需预热至室温或37℃；

# 细胞的冻存与复苏

## 3.1冻存

1. 在细胞对数生长期时收集细胞（密度约为3-6×106 cells/ml，活率98%以上），离心去上清，用该细胞冻存液重悬，控制重悬后的细胞密度为10-20×106 cells/ml；
2. 将细胞悬液分装到标记好的冻存管内，分装体积1ml/管，确保拧紧管盖使其完全密封；
3. 把冻存管放置于-80℃冰箱中冷冻过夜（此步骤若使用细胞冻存盒效果可能会更好）；
4. 次日将冻存管转移至液氮内长期保存。此过程需尽可能快速完成（建议在3min内），如果在此过程中冻存管温度升至-50℃以上，细胞则可能会迅速受损。

## 3.2复苏

1. 先准备好约500ml体积的37℃温水，从液氮罐、干冰或超低温冰箱中取出细胞冻存管，立刻放置于温水中，快速搅拌冻存管直至管内冰晶完全融化（融化过程应迅速）；
2. 解冻后用75%乙醇彻底擦拭冻存管，用移液枪将管内细胞悬液全部转移至一个装有19ml细胞培养液的规格为100ml的三角瓶中，并将其置于37 ℃，（CO2浓度根据培养液的要求设置）的培养箱震荡培养；
3. 培养3-6天后对细胞进行计数，观察细胞密度和存活率是否上升。若细胞密度达到3-6×106 cells/ml，可对细胞进行传代处理，一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态。

|  |
| --- |
| **复苏注意事项：**1. 复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内完全融化，避免由于缓慢融化而导致水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成的损伤；
2. 化冻好的细胞应快速转移至新鲜培养液中，不宜在常温条件下放置过长时间；
3. 切勿一次复苏多管细胞，以避免水温快速下降而导致细胞化冻过慢，造成细胞损伤；
4. 转移细胞时，切勿过分吹打细胞而导致细胞损伤；
5. 细胞培养时，应检查培养箱的各项条件是否正常，参数是否稳定；
6. 复苏细胞后，将细胞放置培养箱中培养3-4天再观察细胞存活率，待其活率恢复至良好状态再进行传代培养；
7. 细胞复苏后的前三天，活率稍微呈下降趋势是属正常现象，不需要每天进行细胞计数，也不需要进行离心换液，待细胞恢复三到四天，细胞活率和密度会回升，此时进行计数检测细胞有无复苏成功，若活率恢复到比较高，则视情况进行传代；
8. 若细胞活率下降至60%及以下时，应重新复苏。
 |