



# 细胞培养说明书

## 一、细胞培养条件

细胞英文名称	MC3T3-E1 Subclone 14	细胞中文名称	小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14
形态特性	成纤维细胞样	生长特性	贴壁
培养条件	a-MEM+10%FBS+ 1% P/S		
传代方法	建议第一次 1:2 传代	消化时间	3-4min 左右
培养环境	37°C, 5%CO <sub>2</sub> , 95%AIR	冻存条件	细胞库无血清冻存液
备注	如为冻存细胞，建议先复苏一株，另外一株及时放入液氮中保存。		

## 二、细胞收到后处理

### T25 瓶细胞到货处理

#### 观察：

1、收到细胞后，请及时核对培养瓶上标注的细胞名称是否与订购的细胞名称一致以及培养瓶是否有破损或漏液等异常情况。

#### 处理：

- 1、75%酒精棉球擦拭 T25 细胞培养瓶外部。
- 2、显微镜观察细胞生长情况，并对细胞进行不同倍数拍照保存（40x, 100x, 200x 各一张）。
- 3、不要打开培养瓶盖，将细胞放入 37 度培养箱中静置 3-4 小时后再做处理，以稳定细胞状态。
- 4、收到细胞后，及时查看说明书是贴壁细胞还是悬浮细胞形态，并按常规贴壁或悬浮细胞的传代方法操作。

贴壁：未超过 80%汇合度时，将瓶装的完全培养液收集至离心管中，留 5ml 完全培养基，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养；超过 80%汇合度时，根据情况传代或者冻存，具体操作见“细胞培养步骤”。首次传代，建议 1:2 传代（两个 T25）。（传代时建议一瓶用原瓶里面的完全培养基，另外一瓶用自己配的完全培养基，进行对比培养。）

**特殊细胞注意事项：**个别细胞贴壁不牢，在运输过程中发生细胞脱落，这是正常现象。请将培养瓶所有培养液收集至离心管，1000rpm 离心 5min，收集上



清（后期对比培养使用），沉淀加入胰酶 1-2ml，轻轻吹打，重悬，消化 1-2 分钟后，加 5ml 完全培养基终止反应。再离心，弃上清，加 1-2ml 完全培养基重悬。然后按 1:2 比例进行分瓶传代（两个 T25），补充新的完全培养基至 5-8ml/瓶，最后放入 37°C，5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养（注意：如收到密封培养瓶，处理完后放入培养箱培养时要将培养瓶盖子拧松）。

### 冻存细胞到货处理

- 1、收到细胞后，检查外包装情况和箱内是否还有干冰。如有外包装破损干冰已完全挥发等问题，请即时拍照联系。
- 2、将细胞取出转移至液氮或-80 度冰箱保存，建议尽早复苏。
- 3、复苏第一管如有活性状态问题及时与我们联系，会有技术人员与您沟通指导后再复苏第二管。特别说明：未与我方联系擅自复苏第二管出现问题不予售后。

## 三、细胞培养步骤

### 细胞复苏

- 1、从液氮中取出细胞冻存管（注意：佩戴防爆管面具），快速将其置入 37°C 水浴中解冻，直至冻存管中无结晶，然后用 75% 的酒精擦拭冻存管外壁；
- 2、将冻存管中的细胞移至含 5ml 完全培养基的 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；
- 3、弃上清，沉淀用 5ml 完全培养基重悬，接种 T25 培养瓶，于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养；
- 4、第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

### 细胞传代

- 1、细胞生长至覆盖培养瓶的 80% 面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；
- 2、添加 0.25% 胰蛋白酶消化液约 1ml 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5ml 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；
- 3、弃上清，沉淀细胞用 1-2ml 完全培养基重悬，然后按 1:2 比例进行分瓶传代，补充新的完全培养基至 5-8ml/瓶，最后放入 37°C，5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养；

### 细胞冻存

- 1、细胞生长至覆盖培养瓶的 80% 面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；
- 2、添加 0.25% 胰蛋白酶消化液约 1ml 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5ml 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；



3、弃上清，沉淀细胞加入 1ml/支的无血清非程序细胞冻存液，混匀后加入冻存管中。（如：冻一支，加入 1ml 无血清非程序细胞冻存液）；

4、将冻存细胞直接放入-80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 小时以上。

## 售后服务告知书

### 一、收到细胞处理方法

1. 收到细胞先不开瓶盖，瓶身擦拭酒精后放在培养箱静置若干小时（视细胞密度而定）稳定细胞状态。接着在倒置显微镜下观察细胞生长情况，并对细胞进行不同倍数拍照（建议收细胞时就整体外观拍一张照片，观察培养基的颜色和是否有漏液情况，随后在显微镜下拍下细胞状态，100×，200×各一张），观察记录细胞在运输过程中是否有污染情况。作为我方进行售后的依据。

2. 收到细胞未开封，出现污染状况我们负责免费重发一次细胞。

3. 由于细胞状态受环境、操作和运输等多方面因素的影响，故本公司只保证客户收到细胞后一周内的细胞状态，故客户需要售后是需出示收到细胞的时间证明及客户提供收货时间和发现问题后与客服人员沟通的时间证明，期间间隔时间不能大于 7 天。

4. 如客户对细胞的种类、纯度、活性等特性有疑问，需提供相应的生物学实验检测结果作为依据。

### 二、细胞出现问题，可重发的情况有哪些？判定标准是什么？

1. 细胞运输途中遭遇的各种问题，细胞丢失、瓶身破损、培养液严重漏液等，重发；

2. 细胞污染问题，请在收到产品 48 小时内，给我们提出真实的实验结果，核实后重发；

3. 常温发货的细胞静置 24 小时后，干冰冻存发货的细胞复苏后 24 小时后，绝大多数细胞未存活，（需提供真实清晰的细胞状态照片），重发；

4. 干冰冻存发货的细胞复苏后 24 小时后或常温发货的细胞静置 4 小时并且未开封，出现污染，重发；

5. 细胞活性问题，请在收到产品 7 天内给我们提出真实的实验结果，用台盼蓝染色法鉴定细胞活力，核实后予重发；

6. 细胞收到当天以及第 2,3 天请拍照，3 天未告知的，视为产品合格。4-7 天内出现问题有



提供收到细胞前 3 天照片和细胞出现问题时照片以及细胞相关操作的详细步骤的，并跟技术人员沟通的，由技术人员判定为我方责任的，重发。技术人员判定为双方承担责任的由双方进行协商处理或者按合同价的 50%收费重发。

### 三、细胞出现问题，不予以重发的情况有哪些？

1. 客户造成细胞污染，不重发；
2. 客户不正确操作致细胞状态不好，不重发；
3. 非本库推荐细胞培养体系致的细胞状态不好，不重发；
4. 细胞状态不好，未提供细胞培养前 3 天照片的，不重发；
5. 细胞培养时经其它处理的，不重发；
6. 细胞收到 2 天内，未告知，不重发；
7. 视具体情况而定。

**注意：**若对细胞鉴定存在争议，可以在收到细胞 3 个月内提供真实有效的 STR 检测证明，本公司承诺无条件退还细胞款项，其他情况本公司将不予受理。