

注意：由于该细胞的特殊性，收到细胞后请严格按照以下操作说明进行，凡应不按以下操作说明而导致的细胞污染、及生长缓慢等现象，中心概不负责赔偿。

ZF4 细胞培养

ZF4 细胞系是使用 1 天的斑马鱼胚胎细胞培养得来，为成纤维细胞系。

一、主要试剂：

DMEM/F12 (1:1)：GIBCO，货号：C11330500BT

胎牛血清：GIBCO，货号：10099-141C

双抗 penicillin/streptomycin：GIBCO，货号：15140122

胰酶：GIBCO，货号 25200056

DMSO（分析纯）：SIGMA

二、培养基准备

将试培养基 DMEM-F12(1:1) (500ml) 取出 55ml 后，补加 50ml 胎牛血清（4℃过夜解冻,终浓度为 10%）及 5ml 双抗（终浓度为 100 U/mL penicillin ， 100 g/mL streptomycin）。

三、ZF4 细胞复苏与培养：

1、细胞复苏

液氮取出后，迅速投入度水浴中30℃中并不时摇动令其尽快融化；用

28度左右血清培养液稀释到原体积4倍，减少DMSO对细胞毒害；
1200rpm，5min去上清，加新鲜培养液28°C，5% CO₂培养，次日更换培养基。

2、细胞培养液更换

2-3天更换一次，将旧培养基吸出，加入28°C水浴20min预热的新鲜培养基，28°C，5% CO₂培养。

四、ZF4 细胞传代

当细胞长到培养皿/瓶覆盖度~80%时可进行传代。

1、先将培养皿/瓶内培养基吸出，加入适量胰酶，至大部分细胞形状呈圆形后吸出大部分胰酶，总消化时间约为1-2min（**具体消化时间与使用胰酶浓度及牌子有相关性，建议消化时于显微镜下观察**），用手轻拍培养皿/瓶，使细胞脱离培养皿/瓶。

2、加入28°C水浴20min预热的新鲜培养基，用移液管轻吹培养基使成单细胞悬液。

3、按细胞数量，传入2-3个培养皿/瓶，28°C，5% CO₂培养。

五、细胞冻存

1、将胰酶消化好的单细胞悬液用新鲜培养基稀释至终密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ - $1 \times 10^7/\text{ml}$ ，加入冻存管后，缓慢加入DMSO，边加入边摇动混匀，至终浓度10%

2、将冻存管放入冻存盒中，-80°C过夜。以后取出冻存管移入液氮容器内。

备注：1、现在使用胰酶-EDTA，更易消化细胞。

友情提示：① 中心提供细胞为活体运输，故培养瓶中装满了培养基。当您收到细胞后，先检查确认培养基是否澄清，若开箱时发现培养基浑浊/细胞污染请及时拍照发邮件和中心联系补发，凡操作后导致的污染概不补发。

②无污染的细胞，建议培养箱内静置 2 小时后，倒出多余培养基，仅保留 5 毫升于培养瓶中，过夜培养后传代培养并及时冻存保种。