



无血清·免程序降温·直接-80 °C 存放·免洗复苏

NovaCryo™

无血清昆虫细胞冻存液

NovaCryo™ Serum-free Insect Cell Freezing Medium

适用细胞：Sf9、Sf21、High Five (Hi5) | 仅供科研使用

文件编号	版本号	生效日期	页码
EZC-IFU-CN-V1.0	V1.0	2026 年 08 月 10 日	见页脚

目 录

1	产品概述	1
1.1	简介	1
1.2	产品特点	1
1.3	适用范围	1
2	产品信息	2
2.1	包装规格与储存	2
2.2	理化指标与质量控制	2
3	使用前准备	3
3.1	用户自备材料	3
3.2	重要使用指南	3
4	冻存操作规程 (SOP)	3
4.1	细胞放行标准	3
4.2	推荐冻存密度与分装量	4
4.3	操作步骤	4
5	复苏操作规程 (SOP)	5
5.1	悬浮培养复苏 (Sf9 或 Sf21 细胞)	5
5.2	贴壁复苏 (Sf9 或 Sf21 细胞)	6
5.3	复苏后正常现象	8
5.3	贴壁复苏 (可选)	错误! 未定义书签。
5.5	贴壁复苏	错误! 未定义书签。
6	储存与稳定性	9
6.1	试剂储存	9
6.2	冻存细胞的储存层级	9
7	注意事项与使用限制	10
7.1	使用限制	10
7.2	常见操作失误	10
8	故障排除	10

1 产品概述

1.1 简介

冻存昆虫细胞时，多数实验室仍在用为哺乳动物细胞设计的冻存液。问题往往不出在当天——而是复苏后：细胞碎片多、迟滞期长、Day 4-5 密度上不去。原因并不神秘：哺乳动物冻存液的渗透压是 280–320 mOsm/kg、pH 中性、且默认 CO₂ 缓冲，而昆虫细胞生活在 340–380 mOsm/kg、pH 6.2–6.4、无 CO₂ 的环境里。两套参数从一开始就不匹配。

NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液按昆虫细胞自身的生理参数配制：渗透压与昆虫细胞培养基匹配，pH 设定在酸性生理区间，并采用非 CO₂ 依赖型缓冲体系，与昆虫细胞在非加湿、无 CO₂ 培养箱中培养的实际条件一致。产品为无血清、无动物来源蛋白（animal-origin-free）的即用型 1× 液体，专为 Sf9、Sf21、High Five 的冻存与复苏设计。

操作上省掉的环节同样直接：无需程控降温仪、无需异丙醇降温盒（如 Mr. Frosty™）、无需 -20 °C 过渡——冻存管分装后可直接放入 -80 °C 超低温冰箱；复苏时按推荐比例稀释后残留 DMSO ≤ 0.5%，可免洗接种，不必对刚解冻的细胞再加一次离心。对没有液氮供应的实验室，这意味着仅凭一台 -80 °C 冰箱就能建立并维护工作细胞库。

1.2 产品特点

特点	说明	用户收益
免程序降温	宽降温速率耐受窗口（约 -1 至 -10 °C/min）	省去程控降温仪与降温盒；消除异丙醇更换与批间差异
直接 -80 °C 存放	-80 °C (≤ -75 °C) 下建议保存期 ≤ 24 个月	无液氮供应的实验室亦可建立工作细胞库（WCB）
免洗复苏	≥ 10 倍稀释后残留 DMSO ≤ 0.5% (v/v)	复苏后无需离心洗涤，避免对解冻细胞叠加机械应力
无血清	不含 FBS	消除血清引入的外源因子风险
昆虫细胞专用参数	pH 6.2–6.4；渗透压 340–380 mOsm/kg；非 CO ₂ 依赖缓冲	避免使用哺乳动物冻存液时的 pH / 渗透压失配
即用型	1× 液体，无需配制、无需补加组分	缩短操作时间，降低污染风险

1.3 适用范围



细胞系 Cell line	培养形式	兼容性	备注
Sf9	悬浮 / 贴壁	★★★ 推荐	主要验证细胞系
Sf21	悬浮 / 贴壁	★★★ 推荐	与 Sf9 方案一致
High Five	悬浮 / 贴壁	★★★ 推荐	复苏后易团聚，见第 8 章故障排除
Sf9 衍生株（如无病毒株、CD 培养基适应株）	悬浮	★★☆ 适用	建议先做小规模验证
其他鳞翅目细胞系（如 Se301、Ld652Y）	悬浮 / 贴壁	★★☆ 需验证	密度与稀释比需自行优化
已感染杆状病毒的细胞	—	× 不适用	感染后细胞不适于冻存，见第 7 章
哺乳动物细胞、酵母、大肠杆菌	—	× 不适用	pH / 渗透压不匹配

2 产品信息

2.1 包装规格与储存

货号 Cat. No.	装量 Size	可分装冻存管数（1.0 mL/管）	储存条件 Storage	有效期 Shelf life
INR1001	100 mL × 1 瓶	约 90 管	2–8 °C，避光	未开封：自生产日期起 24 个月

运输条件：2–8 °C 冷藏或蓝冰运输。收货后请立即转入 2–8 °C 保存。开瓶后无菌操作条件下 2–8 °C 建议 3 个月内用完。

警告 CAUTION： 严禁将本试剂冷冻保存（–20 °C 或 –80 °C）。反复冻融或冻结会导致高分子胶体组分析出、体系分相，造成冻存效果不可逆下降。
若发现瓶内出现絮状物、明显沉淀或颜色异常，请勿使用。

2.2 理化指标与质量控制

检测项目 Test	规格 Specification	方法 Method
外观	澄清无色至微黄色液体，无可见颗粒	目视检查
pH	6.20 – 6.40 (25 °C)	pH 计
渗透压（基础液）	340 – 380 mOsm/kg H ₂ O	冰点下降法
无菌 Sterility	符合规定（无菌生长）	直接接种法 / 薄膜过滤法
细菌内毒素 Endotoxin	< 1.0 EU/mL	鲎试剂法（LAL，动态浊度法）

检测项目 Test	规格 Specification	方法 Method
支原体 Mycoplasma	阴性	qPCR / 培养法

3 使用前准备

3.1 用户自备材料

类别	材料	规格 / 建议
培养基	完全昆虫细胞培养基	Nova 921 SFM™、Nova SFM™、Sf-900™ III SFM、等；复苏时须与冻存前所用培养基一致
耗材	冻存管 Cryovial	2.0 mL 外旋盖聚丙烯管，带 O 型硅胶密封圈
耗材	离心管、血清移液管	15 mL / 50 mL 无菌锥形管；5 / 10 / 25 mL 移液管
设备	-80 °C 超低温冰箱	设定 ≤ -75 °C，温度记录仪监控
设备	水浴锅	37 ± 1 °C
设备	低速离心机	可设定 100–200 × g，室温
设备	摇床培养箱	27 ± 1 °C，非加湿，无 CO ₂ ，125–150 rpm
试剂	细胞计数试剂	0.4% 台盼蓝溶液或自动细胞计数仪耗材
(可选)	肝素 Heparin	组织培养级，用于 Hi5 复苏防团聚 (10 U/mL)

3.2 重要使用指南

重要 IMPORTANT:

1. 全程冷态操作。NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液须在 2–8 °C 或冰浴中使用，不得在 37 °C 水浴中预温。
2. 时间是关键工艺参数。从加入 NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液到全部冻存管进入 -80 °C，总时长应 ≤ 20 min。
3. 昆虫细胞机械耐受性差。离心不超过 200 × g。
4. 只冻存健康的对数中期细胞。活率 < 95% 或已过生长平台期的培养物，无论使用何种冻存液都无法获得良好回收。

4 冻存操作规程 (SOP)

4.1 细胞放行标准

冻存前须确认培养物满足下表全部条件。任一项不合格时，请勿进入冻存流程。

检查项目	Sf9 / Sf21	High Five (Hi5)	检测方式
生长期	对数中期	对数中期	生长曲线 / 计数记录
活细胞密度	$2 - 4 \times 10^6$ /mL	$1.5 - 3 \times 10^6$ /mL	细胞计数
台盼蓝活率	$\geq 95\%$	$\geq 95\%$	台盼蓝排斥法
倍增时间	24 – 30 h	18 – 24 h	连续 2 代计数
传代次数	≤ 20 (建库建议 ≤ 10)	≤ 20 (建库建议 ≤ 10)	细胞台账
形态	圆形、大小均一、无明显碎片	圆形、可见小簇 (< 10 细胞)	倒置显微镜
支原体	阴性	阴性	qPCR (建库时必检)
杆状病毒污染	无 (无肿胀、核内包涵体、裂解)	同左	倒置显微镜 / qPCR

4.2 推荐冻存密度与分装量

细胞来源	细胞系	冻存密度 (活细胞 /mL)	分装量 (mL/管)	每管细胞数	复苏去向
悬浮培养	Sf9 / Sf21	$1.0 - 2.0 \times 10^7$	1.0	$1.0 - 2.0 \times 10^7$	悬浮或贴壁
悬浮培养	High Five	$0.8 - 1.5 \times 10^7$	1.0	$0.8 - 2.0 \times 10^7$	贴壁
贴壁培养	Sf9 / Sf21 / Hi5	$3.0 - 6.0 \times 10^6$	1.0	$3.0 - 6.0 \times 10^6$	仅可复苏至贴壁

推荐首选：悬浮细胞按 1.0×10^7 活细胞/管进行冻存。

4.3 操作步骤

A. 准备 (操作前 2 h)

- (推荐) 将存放冻存细胞的冻存盒 (建议 9×9 格的白色冻存盒) 置于 -80°C 冰箱内预冷 ≥ 2 h。在冰箱中层内侧预留位置。
- 将所需体积的 NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液从 $2-8^\circ\text{C}$ 取出，置于冰浴或就放在冰箱。不要 37°C 或室温 预温。
- 标记冻存管：细胞系、代次、密度、日期、操作者、批号。建议使用耐低温标签或直接在管壁与管盖双重标记。

B. 细胞收获

- 将要冻存的细胞取出少许计数，确认符合放行标准，记录活细胞密度与活率。据此计算所需 NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液体积：

$$V(\text{NovaCryo, mL}) = \text{总活细胞数} \div \text{目标冻存密度 (活细胞/mL)}$$

- 将培养物转入无菌 50 mL 锥形离心管或 250 ml 锥形离心瓶；如为多瓶培养，先合并再计数。

6. 100–200 × g, 室温 (20–25 °C), 离心 5 min。
— 不要使用 > 300 × g; 不要使用 4 °C 预冷离心机 (低温 + 高速会显著增加膜损伤)。
7. 弃上清, 保留少许残液。用手指轻弹管底数次将沉淀弹散, 不要用移液器吹打。

C. 重悬与分装 (限时 ≤ 20 min)

8. 沿管壁缓慢加入预冷 (2–8 °C) 的 NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液至计算体积, 边加边轻旋离心管。加液时间控制在 30–60 s。
9. 用 5 或 10 mL 血清移液管 **轻柔** 上下混匀 2–3 次, 获得均一单细胞悬液。
10. 立即分装 1.0 mL/管至已标记的 2 mL 细胞冻存管。
— 分装过程中每 3–5 管将母液轻旋一次, 防止细胞沉降造成管间密度差异 (> 20 管时尤其重要)。
11. 拧紧管盖 (外旋盖须拧到位, 确保 O 型圈密封), 核对标签。

D. 冻存 (–80 °C 直投)

12. 将冻存管竖直、单层、彼此不接触地放入已预冷的保存的盒子里。
13. 立即将冻存盒放入 –80 °C 冰箱中层内侧。无需程控降温仪、无需异丙醇降温盒、无需 –20 °C 过渡。
— 避免放置于冰箱门附近或抽屉最外侧——开门时的温度波动是管间差异的主要来源之一。
14. 记录冻存时间、位置、管数于细胞台账。
15. 24 h 后可整理归位。如需保存 > 24 个月, 或建立主细胞库, 请转入液氮气相 (≤ –150 °C), 转移过程使用预冷转移盒或干冰并控制在 1 min 内完成。

E. 预验证复苏

16. 冻存后第 2 天随机取 1 管, 按第 5 章复苏, 评价: 无菌性、形态、Day 4–5 活细胞密度。
17. 预验证合格前, 不要终止原代培养物。若首管不合格, 取第 2 管复测; 仍不合格则应扩增原培养物重新冻存。

5 复苏操作规程 (SOP)

重要 IMPORTANT:

本章提供两条复苏路径。Sf9 和 Sf21 推荐悬浮培养复苏; High five 推荐贴壁培养复苏, 然后再转悬浮培养复苏。

5.1 悬浮培养复苏 (Sf9 或 Sf21 细胞)

A. 复苏前准备

- 液氮罐中取出的冻存管、37 °C 水浴、75 % 乙醇、无菌离心管 (15 mL);
- 预温至室温的培养基 (Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基, 货号: IM1001S);
- 相应规格的培养瓶 (T-25 / T-75) 或摇瓶 (125 mL 起步);
- 血球计数板或自动细胞计数仪。



B. 复苏流程概览

步骤	操作
1	从液氮中快速取出冻存管
2	37 °C 水浴中快速解冻（约 1–2 分钟，保留小冰晶即可）并滴加培养液
3	细胞计数，确认细胞密度与活力
4	按推荐密度接种（悬浮： 3×10^5 – 5×10^5 cells/mL）
5	悬浮密度 $> 2 \times 10^6$ cells/mL 或贴壁长至约 90 % 汇合时传代
6	在第 3 代时冻存数管作为备份

C. 悬浮培养复苏

1. Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基预温至室温。
2. 取冻存管，37 °C 水浴快速解冻至仅剩小冰晶（约 1–2 分钟）。
3. 用 75 % 乙醇擦拭冻存管外壁，移入超净工作台。
4. 将细胞悬液转入 15 mL 无菌离心管。
5. 缓慢逐滴加入 5 mL 预温新鲜培养基，同时轻旋管体混匀，避免渗透冲击，提高回收率。
6. 取样计数，确定细胞密度与活力。
7. 转入 125 mL 摇瓶，补加培养基至终体积 25–30 mL，终密度 3×10^5 – 5×10^5 活细胞/mL（首次复苏最低须 $\geq 3 \times 10^5$ cells/mL，推荐 5×10^5 活细胞/mL）。
8. 置于 26–28 °C 非湿化培养箱中，摇床转速 90–100 rpm（振幅 50 mm）；应根据摇床振幅确定转速，见表 1。

表 1 摇床振幅与推荐转速

振荡轨道直径（振幅）	推荐转速
19 mm	125 ± 5 rpm
25 mm	125 ± 5 rpm
50 mm	95 ± 5 rpm

9. 复苏后 4–5 天细胞密度通常可达 $> 2 \times 10^6$ cells/mL；若未达到但活力良好，可 $100 \times g$ 离心 3–5 分钟，以原体积的新鲜培养基重悬后继续培养。
10. 1–3 天后再次计数。
11. 当密度达 2×10^6 – 4×10^6 cells/mL 时进行首次传代。

5.2 贴壁复苏（Sf9 或 Sf21 细胞）

A. 复苏前准备

- 液氮罐中取出的冻存管、37 °C 水浴、75 % 乙醇、无菌离心管（15 mL）；
- 预温至室温的培养基（Nova SFM 昆虫细胞无血清培养基，货号：IM1011S）；
- 相应规格的培养瓶（T-25 / T-75）或 TC 处理的培养皿（9 cm）；
- 血球计数板或自动细胞计数仪、0.4 % 台盼蓝。

B. 复苏流程概览

步骤	操作
1	从液氮中快速取出冻存管
2	37 °C 水浴中快速解冻（约 1–2 分钟，保留小冰晶即可）
3	细胞计数，确认细胞密度与活力
4	按推荐密度接种（贴壁： 2×10^4 – 5×10^4 cells/cm ² ）
5	贴壁长至约 90 % 汇合后再转入悬浮培养；悬浮密度 $> 2 \times 10^6$ cells/mL 时传代扩增
6	在第 3 代时冻存数管作为备份

C. 贴壁培养复苏

- 将培养基提前取出，平衡至室温。
- 从液氮罐中取出冻存管，置于 37 °C 水浴中轻轻晃动，约 1–2 分钟至仅剩小冰晶。
- 将冻存管外壁用 75 % 乙醇消毒，移入超净工作台。
- 将冻存管内细胞悬液转入 15 mL 无菌离心管中。
- 缓慢逐滴加入预温的 5 mL 新鲜培养基，边加边轻轻旋转管体，避免渗透冲击，提高回收率。
- 取少量悬液进行计数，确定活细胞密度与活力。
- 按 2×10^4 – 5×10^4 活细胞/cm² 的密度接种至合适规格的培养瓶中（见表 2）。

表 2 培养瓶或培养皿的生长面积及推荐体积

培养瓶 / 培养皿	生长面积 (cm ²)	建议体积 (mL)
6 cm 培养皿 (TC 处理)	21	5
10 cm 培养皿 (TC 处理)	55	12
15 cm 培养皿 (TC 处理)	152	35
T25 培养瓶	25	5
T75 培养瓶	75	10
T150 培养瓶	150	30

- 置于 26–28 °C、非湿化、无 CO₂ 培养箱中静置培养。
- 当细胞长至约 90 % 汇合时，按「脱落法 (Sloughing)」进行首次传代。

5.3 复苏后正常现象

- 部分细胞形态不规则、皱缩或呈无定形——这是正常的，会在 1-2 次传代后消失。
- 可见细胞碎片与漂浮细胞（floaters），会随传代逐步清除。
- Day 1 活细胞密度可能低于接种值（迟滞期 + 部分迟发性死亡），Day 2 起应恢复上升。
- Hi5 细胞复苏后可见 5-10 个细胞的小簇，属正常；> 10 个细胞的大团块需加入肝素处理。

5.4 贴壁细胞「脱落法」传代

- 吸除培养瓶中大部分旧培养基，保留约 5 mL（与培养瓶规格无关）。
- 将培养瓶倾斜，使剩余培养基流向培养瓶底部。
- 用无菌吸管（巴氏吸管）吸取部分培养基，从培养瓶底部开始，以左右来回的方式冲洗单层细胞，流速应轻柔。
- 首批细胞脱落后，其余细胞更易被冲下，可重复冲洗 1-2 次。
- 取少量悬液计数，按 2×10^4 – 5×10^4 活细胞/cm² 接种至新瓶。
- 补加新鲜培养基至推荐体积，置于 26–28 °C 静置培养。

关键提示：昆虫细胞对机械力敏感。过度吹打、剧烈振荡、以及反复过早或过晚传代（< 80 % 或 > 90 % 汇合）均会导致倍增时间延长、活力下降。

5.4 从贴壁建立悬浮培养

注意：High Five 不能由冻存液直接起始悬浮培养，需先以贴壁形式扩增，再在含肝素的 Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基中逐步适应至悬浮。

- 扩增足够数量的贴壁对数期细胞（活力必须 > 95 %），一般取 4 瓶汇合的 T-75 贴壁 High Five 细胞。
- 使用「脱落法」使细胞脱落，接种至摇瓶（125 mL）或转瓶（100–250 mL），起始密度 0.5×10^6 – 1×10^6 活细胞/mL。
- 于 Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基中加入肝素至终浓度 10 U/mL。
- 摇瓶：26–28 °C，90–100 rpm（摇床振幅 50 mm）；转瓶：80–90 rpm，叶轮需浸没 ≥ 1 cm。
- 密度达 2×10^6 – 4×10^6 cells/mL 时传代，接种密度 3×10^5 – 5×10^5 活细胞/mL。
- 当倍增时间稳定在 18–24 小时、活力 > 90 % 时，视为适应成功。
- 适应成功后可逐步撤除肝素；若去除后仍能稳定悬浮且无大聚集（> 10 细胞/团），即完全适应悬浮培养。

摇瓶培养体积参考

摇瓶规格	建议总培养体积
125 mL	30–50 mL
250 mL	75–100 mL
> 500 mL	瓶体积的 1/4 – 1/3

转瓶培养基体积参考

转瓶规格	最低培养体积	其他要求
100 mL	30 mL	活力 $\geq 95\%$ ；起始密度 $\geq 0.5 \times 10^6$ cells/mL；叶轮浸没 ≥ 1 cm
250 mL	80 mL	同上
500 mL	200 mL	同上；不推荐直接从冻存起始 > 500 mL 转瓶

6 储存与稳定性

6.1 试剂储存

状态	条件	期限	说明
未开封	2–8 °C，避光	自生产日起 24 个月	以瓶签有效期为准
已开封	2–8 °C，避光，无菌操作	建议 3 个月内用完	每次取用后立即回冷藏
冷冻 (–20 / –80 °C)	严禁	—	导致胶体析出、体系分相，效果不可逆下降
室温放置	不推荐	累计 ≤ 4 h	超时请弃用

6.2 冻存细胞的储存层级

存放条件	建议保存期限	适用用途	说明
–80 °C (≤ -75 °C)	≤ 24 个月	工作细胞库 (WCB)、日常备份、常规实验用种子	本产品的主要设计场景
液氮气相 (≤ -150 °C)	> 5 年	主细胞库 (MCB)、种子库、不可再生细胞	低于 T_g' ，分子迁移基本停止
液氮液相 (–196 °C)	不推荐	—	存在管内渗液与交叉污染风险
–20 °C / 有霜或自动除霜冰箱	严禁	—	温度循环导致冰重结晶，数日内即失活
干冰 (–78 °C) 运输	≤ 5 天	样品转运	须补充干冰，避免升温

7 注意事项与使用限制

7.1 使用限制

限制项	说明
不适用于已感染杆状病毒的细胞	感染后细胞膜完整性已受损、代谢状态改变，冻存回收率极低且病毒滴度不可控。请冻存未感染的宿主细胞，需要时重新感染。
不适用于哺乳动物细胞	pH 6.2–6.4 与 340–380 mOsm/kg 的参数为昆虫细胞设计，用于哺乳动物细胞会造成酸性与高渗胁迫。
不适用于原生质体、酵母、细菌	配方未针对细胞壁 / 无壁体系优化。
不含抗生素与抗真菌剂	全程须严格无菌操作。若既有培养体系依赖抗生素，可在复苏培养基（而非冻存液）中加入。
不含酚红	无法通过颜色判断 pH 变化。
不同衍生株须自行验证	经长期适应、基因改造或克隆化的衍生株，其最佳冻存密度与稀释比可能不同。
不用于诊断或治疗用途	仅供科研使用（RUO）。

7.2 常见操作失误

✗ 错误做法	☑ 正确做法	后果
将 NovaCryo™ 在 37 °C 水浴预温	2–8 °C 或冰浴中使用	DMSO 在温热条件下毒性显著增加
室温冻存盒直接装管入 –80 °C	冻存盒预冷 ≥ 2 h	前若干管降温过慢，管间差异大
冻存管平铺、堆叠或紧密贴靠	竖直、单层、彼此不接触	降温速率偏离窗口
分装耗时 > 30 min	全流程 ≤ 20 min	DMSO 累积毒性
离心 500 × g 以「提高得率」	100–200 × g, 5 min	膜机械损伤，得率反降
用移液器反复吹打沉淀	手指弹散 + 缓慢加液	剪切损伤
化冻至完全无冰后再取出	剩一小块冰晶即取出	37 °C 过度暴露
复苏后 24 h 内换液 / 传代	72 h 内不动	叠加应激，TVCR 下降
将本试剂冷冻保存	2–8 °C	胶体析出、体系分相

8 故障排除

现象	可能原因	建议措施
0 h 活率高 (> 90%), 但 Day 1-2 大量死亡	CIDOC (迟发性细胞死亡); 冻存时细胞非对数中期; 传代数过高; DMSO 室温暴露超时	① 确认冻存前活率 $\geq 95\%$ 、处于对数中期; ② 将分装至入箱总时长压缩到 ≤ 15 min; ③ 改用低代次 (≤ 10) 细胞重新建库; ④ 判读改以 Day 4-5 TVCR 为准
Day 4-5 未达 2×10^6 /mL	接种密度 $< 3 \times 10^5$ /mL; 培养基未预温; 摇速过低或过高; 培养温度偏离 27 °C	① 复核 0 h 计数, 必要时减少复苏体积; ② 培养基预温至 27 °C; ③ 摇速设为 130 rpm; ④ 校准培养箱温度 (26-28 °C)
管间回收率差异大 (> 20%)	冻存盒未预冷; 装载过满; 分装过程中细胞沉降; 放置在冰箱门附近	① 冻存盒 -80 °C 预冷 ≥ 2 h; ② 每 3-5 管轻旋母液一次; ③ 移至冰箱中层内侧
复苏后出现大团块 (> 10 细胞/簇), Hi5 尤为常见	死细胞释放基因组 DNA; 化冻过慢; 冻存密度过高	① 化冻控制在 60-90 s; ② 复苏培养基中加入肝素 10 U/mL; ③ 将 Hi5 冻存密度下调至 $0.8-1.0 \times 10^7$ /mL; ④ 静置 20 min 后取上层 2/3 转入新瓶
复苏后细胞碎片多	正常现象 (前 1-2 代); 或冻存时已存在死细胞	① 随传代自行清除; ② 若持续, 检查冻存前活率与杆状病毒污染
冻存液出现絮状物 / 沉淀	试剂被冷冻; 或已超有效期; 或被污染	① 弃用; ② 核查冷藏链, 确认从未冷冻; ③ 分装保存以减少反复开瓶
复苏后污染 (细菌 / 真菌)	冻存分装环节污染; 水浴水经管盖螺纹渗入	① 化冻时勿浸没管盖; ② 化冻后 70% 乙醇擦拭外壁; ③ 水浴定期换水并加消毒剂; ④ 改用干式化冻仪
冻存管开裂 / 爆管	转入液氮液相保存后液氮渗入管内	① 仅使用液氮气相保存; ② 使用带 O 型圈的外旋盖管; ③ 取管时佩戴面罩
复苏后表达量低于冻存前	细胞尚未完全恢复; 代数过高	① 复苏后至少传 2-3 代、倍增时间恢复正常后再用于表达; ② 核查累计代数
长期 (> 12 个月) -80 °C 存放后回收率下降	-80 °C 高于 Tg', 重结晶缓慢累积	① 关键细胞库转液氮气相; ② 每 12 个月做一次存活性抽检; ③ 建立轮换更新的 WCB 制度