**Рекомендации от компании БиолоТ для заказывающих**

**услугу по наращиванию клеток.**

Клетки поставляются во флаконах, заполненными под горло средой культивирования. После поступления клеток конечный пользователь, имеющий опыт культивирования этой клеточной линии, должен в этот же день оценить под микроскопом состояние клеточной линии, чтобы определить дальнейшую работу с клетками. Невозможно рекомендовать все возможные варианты работы с клетками после их транспортировки, и именно опыт заказавшего клетки сотрудника позволит определить дальнейшие действия. Тем не менее, основные рекомендации могут заключаться в следующем:

- в случае монослойных клеточных линий оценить уровень и примерный процент открепленных клеток. В случае даже значительного открепления клеток от подложки, можно рекомендовать оставить клетки на ночь в термостате; обычно клетки за ночь прикрепляются к подложке и могут быть далее рассеяны. В случае необходимости, клетки можно оставить в исходном флаконе в термостате и на более длительный срок до достижения монослоя. Даже при плотном монослое клетки не перерастут из-за избытка среды в заполненном доверху флаконе. После образования клеточного монослоя или решения сотрудника пересеять клетки перед открыванием флакона необходимо аккуратно снять защитную пленку с горлышка, перевернуть флакон вниз горлышком и опустить его в 96-процентный этиловый спирт, чтобы спирт попал во все полости под крышку флакона и простерилизовал внутреннее доступное для спирта пространство. После этого аккуратно открутить горлышко и либо стерильной пипеткой Пастера под вакуумом , либо смоченной в 96-процентном спирте ваткой осушить края горлышка флакона и внутреннюю поверхность крышки. Это важно для дальнейшей стерильной работы с этим флаконом. Среду из флакона перелить в стерильную емкость для дальнейшего использования. Сняв клетки диспергирующим раствором и рассеяв в нужной концентрации, залить флакон старой средой (4-5 мл на флакон 25 кв см) для наращивания клеток для последующей заморозки. Замораживание клеток рекомендуется делать только после того, как культура примет свойственную ей морфологию и восстановит ростовые характеристики. Замораживание клеток предпочтительно производить в среде с 90% сыворотки и 10% ДМСО (наиболее щадящий для клеток способ). Обычно с одного флакона площадью 25 кв см можно заморозить 3-4 ампулы клеток (рекомендованная концентрация клеток при замораживании 1-5 млн клеток/мл). После замораживания можно пробовать разморозить клетки на другие серии сред и сывороток, если в нашей компании не были закуплены среды и сыворотки для этой клеточной линии.

- при работе с суспензионными клеточными линиями открывать флакон аналогично рекомендациям выше. Далее нужно слить клетки в стерильную коническую центрифужную пробирку на 50 мл, центрифугировать 5 мин при 1500 об/мин, среду слить в отдельный стерильный флакон для дальнейшего использования. Встряхнуть клеточный осадок и рассеять клетки в нужной концентрации с использованием части слитой среды с сывороткой. Замораживание клеток проводить аналогично описанным выше рекомендациям.