

细胞培养说明书

| | | | |
|------|--|------|----------|
| 细胞名称 | 人小细胞肺癌细胞NCI-H446 | 英文名称 | NCI-H446 |
| 形态特性 | 上皮样 | 生长特性 | 贴壁悬浮混合 |
| 种属 | 人 | | |
| 组织 | 肺；转移灶：肋膜渗出癌；小细胞肺癌 | | |
| 培养体系 | RPMI1640+10% FBS+1% P/S 气相：空气，95%；CO ₂ ，5%。 温度：37℃ | | |
| 背景 | 该细胞是从一位小细胞肺癌患者的胸水中建立的，NCI-H446细胞的原始形态并不具有小细胞肺癌特征。NCI-H446细胞是小细胞肺癌的生化形态学上的变种，表达神经元特有的烯醇酶和脑部肌酸激酶同工酶。NCI-H446细胞内左旋多巴脱羧酶、蚕素、抗利尿激素、催产素或胃泌素释放肽未达到可检测水平。C-myc DNA序列扩增约20倍，c-myc RNA比正常细胞增加15倍。最初，传代培养基用RPMI-1640(含5%胎牛血清、10nM氢化可的松、0.005mg/ml胰岛素、0.01mg/ml铁传递蛋白、10nM 17-β-雌二醇、30nM亚硒酸钠) | | |
| 传代方法 | 建议第一次1:2传代 换液频率2~3次/周 | | |
| 冻存条件 | 90FBS+10%DMSO, 推荐无血清冻存液货号 (CX001)。 | | |
| 保藏机构 | ATCC | | |
| 备注 | 该的细胞为贴壁悬浮混合生长收到后需离心收集悬液中悬浮细胞（不要将细胞倒掉），贴壁部分细胞按照贴壁细胞正常处理 | | |

一、细胞收到后处理

请显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各2-3张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

收到细胞回到自己的实验室后，先打开外包装，用75%酒精喷洒整个瓶消毒后放到超净台内，严格无菌操作，不开瓶盖放培养箱静置2-3小时稳定细胞状态。镜下观察：未超过80%汇合度时，可将瓶装的完全培养液收集至离心管中，重新加入6ml完全培养基，放入37℃、5%CO₂孵箱培养；超过80%汇合度时，根据情况传代或者冻存。悬浮细胞需离心收集处理。抽出瓶中的培养基和细胞1000rpm离心3-5分钟，弃去上清重悬后接种到新的培养瓶中（加入按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基）。

（注意发货的是密封培养瓶的话，处理完后放入培养箱培养记得培养瓶盖拧松，初次传代最好使用T25培养瓶或6cm小皿1传2）

二、细胞培养步骤

1. 复苏细胞：将含有1ml细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入5ml培养基混合均匀。在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加4-6ml完全培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜（或将细胞悬液加入6cm皿中），培养过夜。第二天换液并检查细胞密度。

2. 细胞传代：如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。

对于贴壁细胞，传代可参考以下方法：

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1-2次。

2. 加1-2ml消化液（0.25%Trypsin-0.53mM EDTA）于培养瓶中，置于37℃培养箱中消化1-2min，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加5ml以上含10%血清的完全培养基终止消化。

3. 轻轻吹打细胞，完全脱落后吸出悬液至15ml离心管中，在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2ml培养液后吹匀。

4. 将细胞悬液按1:2到1:5的比例分到新的含5-6 ml培养液的新皿中或者瓶中。

细胞培养说明书

三、对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

1：收集细胞，1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀，将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

2：较脆弱的悬浮细胞可选择半数换液方式将培养瓶竖置1-2小时待大部分细胞沉到底部后，弃去半数培养基后，将剩余细胞悬起，将细胞悬液按1：2到1：3的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

3：细胞冻存：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。贴壁细胞冻存时，弃去培养基后加入少量胰酶，细胞变圆脱落后，进行离心收集，1000RPM条件下离心3-5分钟，去除上清，按冻存数量加入血清及DMSO，冻存比例为90%FBS+10%DMSO。

特殊细胞收到注意事项：

部分细胞由于贴壁不牢在运输过程中发生细胞脱落，这是正常现象正确处理后可以正常生长。

- 1、将培养瓶内所有培养基转入无菌离心管，离心收集细胞（1200rpm 3-5min）去除旧培养基
- 2、用PBS重悬细胞，将所有细胞收集到一个离心管中，再次离心（1200rpm 3-5min）去除PBS；
- 3、加入1ml左右0.25%胰酶重悬细胞，混匀即可，不能吹打太多次，放入培养箱消化，根据细胞特性决定消化时间（约1~2分钟）；
- 4、消化好后，用移液枪轻轻敲打细胞悬液，使细胞团分散，迅速加入3-5ml完全培养基混匀以终止消化，离心（1200rpm 3-5min）去除胰酶；
- 5、加入5ml左右的细胞相应的完全培养基混匀，按比例接入无菌培养瓶/皿中；
- 6、显微镜下观察看细胞是否成均匀分散的单颗细胞，若有3-5个成团的小细胞团可不用重新消化，使之贴壁后待细胞生长稳定后再消散细胞。