

# 细胞培养说明书

细胞名称	人胃癌细胞MKN-45-luc	英文名称	MKN-45-luc
形态特性	圆形	生长特性	半贴半悬
种属	人		
组织	胃, 胃淋巴结		
培养体系	RPMI-1640+10% FBS+1% P/S	气相: 空气, 95%; CO <sub>2</sub> , 5%。	温度: 37°C
背景	该细胞是通过慢病毒转染荧光素酶		
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)。		
备注	该细胞是通过慢病毒转染荧光素酶的稳转株, 收到细胞传代8代左右后, 若要求需要维持荧光强度, 建议可以加入嘌呤霉素进行再次筛选		

## 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°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养; 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°C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°C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。

### 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

## 细胞培养说明书

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, 用移液枪轻轻吹打细胞悬液, 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。