

细胞培养说明书

细胞名称	人甲状腺正常细胞 Nthy-ori 3-1	英文名称	Nthy-ori 3-1
形态特性	上皮样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	甲状腺		
培养体系	RPMI1640+10% FBS+1% P/S 气相：空气，95%；CO ₂ ，5%。 温度：37℃		
背景	用含有起源缺陷型 SV40 基因组 (SV-ori) 的质粒转染正常人原代甲状腺滤泡上皮细胞以使其永生化。SV40 DNA 能够使正常甲状腺上皮细胞永生化，并保留几种不同的功能		
传代方法	建议第一次1:2传代 换液频率2~3次/周。消化3分钟左右		
冻存条件	90FBS+10%DMSO, 推荐无血清冻存液 (CX001)		
保藏机构	ECACC		
备注			

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。

三、对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

细胞培养说明书

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。