

细胞培养说明书

| | | | |
|------|---|------|-----------|
| 细胞名称 | 鱼鳃细胞系 RTgill-W1 | 英文名称 | RTgill-W1 |
| 形态特性 | 上皮样 | 生长特性 | 贴壁生长 |
| 种属 | 鱼 | | |
| 组织 | 鳃 | | |
| 培养体系 | L-15+10% FBS+1% P/S无二氧化碳 气相：空气，100%；。 温度：18-20℃ | | |
| 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 (CX001) | | |
| 保藏机构 | ATCC CRL-2523 | | |
| 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。

细胞在培养瓶中培养至良好状态后灌满完全培养液并封好瓶口是细胞运输的最好办法。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，培养箱静置2-3小时。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，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，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. 按5-6ml/瓶补加培养液，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。

细胞培养说明书

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。