

细胞培养说明书

细胞名称	人肝癌亚力山大细胞PLC/PRF/5	英文名称	PLC/PRF/5
形态特性	上皮样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	肝癌；亚力山大细胞		
培养体系	MEM+10% FBS+1% P/S 气相：空气，95%；5%CO ₂ 。 温度：37°C		
背景	PLC/PRF/5细胞分泌乙肝病毒表面抗原(HBsAg)；PLC/PRF/5细胞原先被支原体污染，后用BM-cycline去除支原体。倍增~36-48 h		
传代方法	建议第一次1:2传代 换液频率2~3次/周。消化时间 2~3分钟		
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			

一、细胞收到后处理

1.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。

2.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。镜下观察细胞：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新的完全培养基，放入37°C、5%CO₂培养箱培养；超过80%汇合度时，根据情况传代或者冻存。

3.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

细胞培养说明书

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。

四、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。