

细胞培养说明书

细胞名称	WI-38人胚肺成纤维细胞	英文名称	WI-38
形态特性	成纤维样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	正常肺		
培养体系	MEM+10% FBS+1% P/S 气相: 空气, 95%; CO ₂ , 5%。 温度: 37°C		
背景	人二倍体细胞是来自妊娠3个月的正常胚胎肺组织。WI-38细胞是首株用于人类疫苗制备的人二倍体细胞系, 培养液中添加TNF- α 可以促进WI-38细胞生长。有限细胞系		
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			

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 \times , 20 \times) 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%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°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:

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。

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。