

细胞名称	小鼠肺癌细胞奥希替尼耐药株LLC+Osimertinib	英文名称	LLC+Osimertinib
形态特性	上皮细胞样	生长特性	贴壁生长
种属	小鼠		
组织	小鼠肺癌组织; Lewis肺癌		
培养体系	DMEM+10% FBS+1 μM Osimertinib +1% P/S	气相: 空气, 95%; CO ₂ , 5%。	温度: 37 °C
倍增时间	每周2-3次		
简介	LLC细胞是小鼠Lewis肺癌细胞。		
传代方法	建议第一次1:2传代		
冻存条件	90 FBS+10% DMSO, 推荐无血清冻存液 (CX001)		
用途	仅限于科学研究, 不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。		
备注	收到细胞后按照下面的要求操作: 培养瓶里面的培养液是不含药物的。待细胞长到 40-50%的汇合度时, 去掉培养液, 加入含0.5 μM Osimertinib药物的培养液, 放入培养箱, 这段时间肯定会有小部分细胞悬浮起来, 但是不要紧, 通过换液可以去掉, 下面的细胞待长满就可以消化传瓶了, 一两代之后可以将药物浓度提高到1 μM Osimertinib, 含药培养液用于细胞培养都没问题的, 冻存的时候就不要在冻存液里面加药物了。(注明: 用不含药物培养基培养一周到两周, 再用含药培养基培养。) 如需进行实验, 请提前至少1周更换为正常培养基培养。		

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子拧松, 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。

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。