

## 细胞培养说明书

细胞名称	人肺癌细胞/5Fu耐药株A549-5Fu	英文名称	A549-5Fu
形态特性	上皮样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	肺		
培养体系	Ham's F-12K培养基；10%胎牛血清；1%双抗	气相：	空气，95%；CO <sub>2</sub> ，5%。 温度：37℃
背景	该细胞系由D. J. Griad通过肺癌组织移植培养建系，患者为58岁白人男性。A549能通过胞苷二磷酸胆碱途径合成含有高含量不饱和脂肪酸的卵磷脂		
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	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 70-80%的汇合度时，去掉培养液，加入含 0.5ug/ml DDP 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，这时可以一直用含药 培养液来消化培养细胞，一两代之后可以将药物浓度提高到 1ug/ml，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。（注意）用不含药物培养基培养一周传2-3代保种后，再用含药培养基培养		

### 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%CO<sub>2</sub>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

## 细胞培养说明书

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：

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。