

货号: TC0082

细胞特性

- 1) **来源:** 肾皮质/近端小管
- 2) **形态:** 上皮细胞样, 贴壁生长
- 3) **含量:** $>1 \times 10^6$ 细胞数
- 4) **规格:** T25 瓶或者 1mL 冻存管包装
- 5) **用途:** 仅供科研使用。

运输和保存: 干冰运输及复苏好存活细胞: (1) 1mL 冻存管包装干冰运输, 收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏, 若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染, 请立即与我们联系。(2) T25 瓶复苏的存活细胞常温发货, 收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

细胞接收后的处理:

- 1) 收到细胞后, 75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h, 若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染, 请拍照后及时联系我们。
- 2) 请在 4 或 5X 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。
- 3) 贴壁细胞: 细胞在 37℃ 培养箱中放置 2-3h, 显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况, 有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下, 可去除培养瓶中灌液培养基 (若有未贴壁的细胞需要离心回收, 重悬打入到原培养瓶中), 加入新配制的完全培养基 6-8mL, 放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上, 可以对细胞进行传代处理。传代过程中, 若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。
- 4) 备注: 运输用的培养基 (灌液培养基) 不能再用来培养细胞, 请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。收到细胞后第一次传代建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。

细胞培养步骤

一. 培养基及培养冻存条件准备:

- 1) 培养基: MEM+10%FBS+1%P/S 来培养细胞。
- 2) 培养条件: 气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%。温度: 37℃, 培养箱湿度为 70%-80%。
- 3) 冻存液: 完全培养液 92.5%, 7.5%DMSO, 现用现配。(或者用无血清细胞冻存液)
- 4) 传代比例: 如果没有特别说明, 收到细胞后的第一次传代一般是 1:2。传代周期: 4-6 天, 换液频率: 每周 2-3 次。

备注:

1. 该细胞是经过优化处理过后的, 正常培养时不需要添加生长因子。若细胞生长状态不好, 可用促贴壁的培养瓶培养或添加表皮生长因子 (EGF)。

- 2.该细胞生长不能过密，请在生长密度 80%时进行传代。
- 3.使用 0.25%胰酶消化细胞，由于基础培养为无血清培养液无法终止胰酶消化，所以消化完成后用完全培养基(+10%FBS)来终止消化，再通过离心（建议 125xg 离心 5 到 10 分钟），离心完后观察，细胞是否已全部离心沉淀，去除胰酶，再进行后续操作。

二. 细胞处理:

1) 冻存细胞的复苏: :

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻，加入到含 4-6mL 完全培养基的离心管中混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶(或皿)中 37℃ 培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

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以参考以下方法:

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。
 2. 加入 0.25% (w/v) 胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中 (T25 瓶 1-2mL, T75 瓶 2-3mL)，置于 37℃ 培养箱中消化 1-2 分钟 (难消化的细胞可以适当延长消化时间)，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入 3-4ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。
 3. 轻轻打匀后吸出，在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，补加 1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1: 2 的比例分到新 T25 瓶中，添加 6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按 1:2~1:5 的比例进行。
- ### 3) 细胞冻存: 收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例;
1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml。
 2. 1000rpm 离心 3-5min，去掉上清。用配制好的细胞冻存液重悬细胞，按每 1ml 冻存液含 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。
 3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80 度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

注意事项:

1. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。