

A549+luc
(人肺癌细胞+luc)

细胞描述

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。

该细胞通过慢病毒转染的方式携带Luc基因。

货号：TC0715

细胞特性

1.来源: 肺癌

2.形态: 上皮细胞样，多角形；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。

细胞筛选

该细胞为稳定转染Luc的细胞，随细胞传代次数的增加，其Luc荧光强度会逐渐减弱。若实验要求需要维持荧光强度，可以加入嘌呤霉素进行再次筛选。

建议收到细胞后至少传3代，冻存留种后再进行筛选。

初次进行细胞筛选时，建议加入终浓度为1ug/ml嘌呤霉素的完全培养基维持培养，若无细胞漂浮或者漂浮较少，即可更换为含2ug/ml嘌呤霉素的完全培养基继续筛选，以此类推，至最高药物浓度为5ug/ml。若筛选过程中，漂浮细胞大于60%，则停止筛选，换成正常培养基培养，至细胞密度约80%，可继续加入同浓度嘌呤霉素进行筛选。当加入5ug/ml嘌呤霉素时细胞正常增殖，可停止筛选，用不含药完全培养基正常培养。

细胞诱导构建实验步骤：

1. 转染

- (1) 将A549细胞接种6孔板，每孔细胞数约为 1×10^5 个，
- (2) 第二天，细胞融合度为50%左右时用于病毒转染，
- (3) 加入1mL完全培养基，再加20 μ L Luciferase过表达慢病毒，
- (4) 混匀后继续培养，
- (5) 12h后观察细胞状态，并更换为新鲜培养基，
- (6) 当细胞长满板底后，传代至T25培养瓶中。

2. 筛选：用嘌呤霉素4ug/mL抗性筛选6周，稳转细胞记作A549+Luc。

3. 体外荧光素酶活性检测

取A549细胞消化，离心，弃上清，加20 μ L细胞裂解液，再加100 μ L荧光素酶底物，检测发光情况。

	发光值
阴性	105
实验组	18995

结果表明慢病毒感染A549细胞能稳定表达荧光素酶。

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. 准备F-12K（推荐iCell-0007）培养基；优质胎牛血清，10%；双抗，1%。
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：90%血清，10%DMSO，现用现配。

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

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. 收到细胞后，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. 收到细胞先不开瓶盖，瓶身擦拭酒精后放在培养箱静置2-4小时（视细胞密度而定）稳定细胞状态。接着在倒置显微镜下观察细胞生长情况，并对细胞进行不同倍数拍照（建议收细胞时就整体外观拍一张照片，观察培养基的颜色和是否有漏液情况，随后在显微镜下拍下细胞状态，100*，200*各一张），观察记录细胞在运输过程中是否有污染情况。作为我方进行销售依据。
3. 由于细胞状态受环境、操作和运输等多方面因素影响，故本公司只保证客户收到细胞后一周内的细胞状态，故客户需要售后时需出示收到细胞的时间证明及客户提供收货时间和发现问题后客服人员沟通的时间证明，期间间隔时间不能大于7天。
4. 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。