

细胞描述

超微结构中包含许多微绒毛，少许微丝，许多小线粒体，充分发育的高尔基体和内质网，许多脂滴和多层体，次级溶酶体，没有发现病毒颗粒。

货号：TC0750

细胞特性

- 1.来源:** 肾透明细胞癌皮肤转移
- 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. 准备Mccoy's 5A (推荐iCell-0011) 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摄氏度, 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。