

HepG2 人肝癌细胞

一、细胞简介

货号	YFX-CLH029
背景描述	该细胞系来自 15 岁男性白人的组织。形态为上皮形, 模式染色体数为 55, 在免疫抑制小鼠中不致瘤。
细胞形态	上皮细胞, 贴壁生长。
规格	>1×10 ⁶ 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	肝细胞癌。
培养基	MEM (ATCC 改良) + 10% FBS+1% P/S。
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%。
消化时间	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)。
传代比例	1:2-1:5; 第一次收到细胞建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。
换液频率	2-3 次/周。
细胞冻存液	40%血清+ 55%基础培养基+ 15%DMSO, 现用现配。(或商品化专用细胞冻存液)

二、细胞收到后处理方式

- 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。
- 请在 4 或 5×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。
- 悬浮细胞: T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h, 然后抽出瓶中的培养基和细胞 1000rpm 离心 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)。
- 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。
- 备注: 运输用的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。

三、细胞复苏

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。

四、细胞传代

如果细胞密度达 60%-70%，即可进行传代培养。

1、对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

A. 去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。

B. 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°C 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。

C. 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。

2、悬浮细胞：

悬浮状态下生长的细胞，可以通过向培养瓶中添加完全培养基来维持细胞的生长状态，一般情况下细胞密度维持在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL（不同细胞对密度要求不同，）可以维持细胞的正常生长。如需分瓶可以将细胞悬液收集到离心管中 1000rpm，离心 5min，弃去上清，补加 1-2mL 培养液后重悬混匀后将细胞悬液按 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。

五、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°C 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。

六、运输和保存

1、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。

2、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。

3、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。

七、注意事项

1、HepG2 细胞复苏或传代后会有少部分的细胞贴壁和部分悬浮的细胞，复苏两天后细胞会从贴壁细胞向外开始生长，有时细胞再生长过程中，细胞会再贴壁细胞的上方生长，形成不同的细胞层，这种情况会有发生。在细胞复苏的一周内，培养瓶中通常会有悬浮的活的细胞团，在换液过程中不要丢弃在这些活的悬浮细胞，可以通过离心 ($125 \times g$) 回收细胞，重新打回到培养瓶中，分离或者丢弃漂浮的活细胞会使细胞数量变少，引起细胞的停滞生长或细胞死亡。

2、培养条件的细微变化，尤其是 pH 和培养基中血清的质量，可能会影响细胞的生长状况，在细胞的生长过程中会有细胞内的液泡出现，特别在细胞快要融合是会出现这种情况。培养

细胞时使用未被灭活的高质量、低内毒素的胎牛血清, 可使细胞更好的贴壁和形成单层细胞。

- 3、细胞在生长过程中可以通过将血清浓度提到到 20%来改善细胞生长缓慢的情况。
- 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。
- 5、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。