

小鼠骨髓巨噬细胞永生化

一、细胞简介

货号	YFX-CLM054
背景描述	巨噬细胞源自单核细胞, 属于免疫细胞, 有多种功能, 属不繁殖细胞群, 难长期培养, 巨噬细胞在吞噬和清除异物和衰老死亡细胞、分泌生物活性物质, 调节血细胞生成与参与免疫应答等方面发挥着广泛的生物学作用, 是一类在体内发挥重要免疫效应的细胞, 为体内的稳态维持和组织防御提供保障。 小鼠骨髓巨噬细胞永生化细胞通过慢病毒转染的方式携带 SV40 基因, C D68 免疫荧光染色为阳性免疫荧光鉴定。
细胞形态	圆形不规则细胞样, 贴壁生长。
规格	>1x10 ⁶ 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	小鼠正常骨髓组织。
培养基	小鼠骨髓巨噬细胞-永生化细胞专用培养基。
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	90%血清, 10%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:

- 在生物安全柜内, 打开培养瓶瓶口, 吸弃瓶内的培养基。

2、向培养瓶内加入 3mL 无菌的 $1 \times$ PBS, 水平放置培养瓶, 使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积, 吸弃 PBS。

3、向瓶内加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA), 浸润底面后放入 37°C CO_2 培养箱中孵育 1~2min。

4、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起, 若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2mL 完全培养基中, 将悬液吸入 15mL 离心管。

注: 如细胞不能一次性完全消化, 可采取如下方法:

A. 准备一个无菌的 15mL 离心管, 加入 2mL 完全培养基。

B. 将消化下来的细胞加入到上述离心管中。

C. 向之前消化的培养瓶中加入 1mL 胰酶继续消化 2min 左右, 轻拍培养瓶, 95%左右细胞脱落后加入 2mL 含 10%FBS 的完全培养基中和, 中和后的细胞悬液移入 A 中的离心管内。

四、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、选择指数生长期的细胞, 吸去培养液, 加 PBS 清洗 1-2 遍。去 PBS, 加入 0.25% 胰酶 1.5mL 润洗 10 秒, 去胰酶。将培养瓶放 37°C 培养箱, 靠残余胰酶继续消化细胞直至细胞变圆, 拍打瓶侧使细胞脱落。细胞消化下来后, 加 5mL 培养液全部吹打下来, 再 1000RPM 离心 3 分钟。

2、加入 1-1.5mL 成品冻存液, 分装至 2mL 冻存管里, 将冻存管放入充满异丙醇的程序降温盒中, 之后转入 -80°C 冰箱过夜, 第二天再转至液氮。

五、细胞复苏

1、将恒温水浴锅中的水预热到 37°C 。

2、准备一支 15mL 离心管, 加入 5mL 完全培养基, 放入 37°C 水浴锅中预热。

3、戴上护目镜, 厚毛线手套后, 从液氮罐中取出要复苏的细胞, 尽快转入 37°C 恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率。

4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中, 混匀后, 1000rpm 离心 5min。

5、准备一个 T-25 培养瓶, 写上细胞名称、日期, 再加入 4mL 完全培养基。

6、离心完成后弃去上清, 用 1mL 完全培养基重悬细胞后, 转入 T-25 细胞培养中, 混匀后转入 CO_2 培养箱中培养静置。

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°C 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、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。