

## VERO C1008 [Vero E6] 非洲绿猴肾细胞

### 一、细胞简介

货号	YFX-CL010
背景描述	VERO C1008(E6)细胞是 VERO 76 细胞的克隆细胞株, 而 VERO 76 细胞是初始 VERO 细胞株的一个衍生株。
细胞形态	上皮细胞样, 贴壁生长。
规格	>1x10 <sup>6</sup> 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	非洲绿猴正常肾。
培养基	MEM (含 NEAA) + 10% FBS + 1% P/S。
培养条件	气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%; 温度: 37°C; 培养箱湿度为 70%-80%。
细胞检测	不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
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 天。
细胞冻存液	无血清冻存液。

### 二、细胞收到后处理方式

1. 收到细胞后, 75% 酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37°C 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 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。
3. 悬浮细胞: T25 瓶置于 37°C 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)。
4. **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 (建议一传二)

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法:

1. 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× 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<sub>2</sub> 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 度培养箱，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℃ 度冰箱过夜，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℃。
- 2、准备一支 15ml 离心管，加入 5ml 完全培养基，放入 37℃ 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℃ 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<sub>2</sub> 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，收到细胞后请镜下观察细胞生长状态，如铺瓶率超过 85% 请立即进行传代操作。
- 2、1mL 冻存细胞悬液装于 1.8mL 的冻存管中，置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输；收到细胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养，如无法立刻进行复苏操作，冻存细胞可在-80℃ 的条件下保存 1 个月。

## 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、从液氮中取出细胞冻存管时，若冻存管内有液氮进入，需拧松冻存管，排出内部残留的液氮，之后拧紧冻存管，置于干冰上，然后放入 37℃ 水浴中，避免温差太大造成液氮快速气化而爆炸。