

NR8383 大鼠肺泡巨噬细胞

一、细胞简介

货号	YFX-CLR018
背景描述	NR8383 (正常大鼠, 1983 年)来源于肺灌洗时的正常大鼠肺泡巨噬细胞。细胞在 gerbil 肺细胞连续培养液存在下培养了大约 8-9 个月。随后, 不再需要外源生长因子。通过有限稀释法从单个细胞克隆并亚克隆 NR8383 细胞, 并三次用软琼脂亚克隆。细胞表现出巨噬细胞的特性, 吞噬酵母多糖和铜绿, 非特异性脂酶活性, Fc 受体, 氧化降解; 分泌 IL-1, TGF- β 和 IL-6, 可重复地响应外源生长因子。NR8383 细胞响应博莱霉素, 分泌 TGF- β 前体。在博莱霉素刺激下, TGF- β mRNA 表达也上升。细胞对内毒素敏感。1-10 纳克/毫升的 LPS 水平抑制增生达 50%。即使达到 0.001 毫克/毫升的水平, LPS 抑制还是无毒且在后续过程中可逆的。NR8383 细胞株提供了高响应的肺泡巨噬细胞的均一来源, 可以用于体外研究巨噬细胞相关活性。
细胞形态	巨噬细胞样, 半悬浮生长。
规格	>1 $\times$ 10 ⁶ 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	大鼠肺, 巨噬细胞。
培养基	Ham's F-12K + 15% FBS + 1% GlutaMAX-1+ 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%。
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

- 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 $\times$ 显微镜下确认细胞状态, 同时给刚收到的细胞拍照 (10 $\times$, 20 $\times$) 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。
- 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 (建议一传二)

对于半悬浮细胞传代可以参考以下方法:

- 收集: 将培养瓶中的悬浮的细胞收集到离心管中。用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。由于细胞贴壁不牢 PBS 润洗后细胞会脱落所以 PBS 也要回收离心管中。
- 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、将收集到的悬浮细胞、pbs 清洗液中的细胞和消化下来的贴壁细胞以 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。

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、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。

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 CO₂ 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, 如悬浮的细胞较多, 请将培养瓶至于培养箱中静置过夜以帮助未死亡的悬浮细胞能够再次贴壁。

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、NR8383 细胞聚团悬浮生长, 且长得比较慢。细胞在低密度时有少量细胞团粘附瓶底, 细胞高密度时为全悬浮状态。

- 2、细胞复苏后增殖慢需要 7 天左右, 3 天后换液一次。细胞应高密度冻存。该细胞传代时不需要用胰酶消化。传代时, 用无菌细胞刮刮拭培养表面将细胞刮落, 收集离心后重悬接种到新的培养瓶中。
- 3、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。
- 4、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。