

## 293T/17 人胚肾细胞

### 细胞介绍

293T/17 细胞株是 293T (293tsA1609neo) 细胞株的衍生株。293T 是 293 细胞株插入了 SV40 T-antigen 的温度敏感基因形成的高转衍生株。293T 细胞进行克隆, 检测 pBND 和 pZAP 载体, 得到一株能生成高滴度感染逆转录病毒的衍生株, 293T/17。细胞持续表达猿病毒 40 (SV40) 大 T 抗原, 而因其高转染能力筛选到 17 号克隆。293T/17 细胞用 pCRIPenv-和 pCRIPgag-2 载体转染得到 ANJOU 65 细胞株。ANJOU 65 细胞再用 pCRIPgag-2 和 pGPT2E 载体转染得到亲宅性外壳表达细胞株 BOSC 23。ANJOU 65 细胞用携带 gpt 抗性基因的 pCRIPAMgag 载体转染得到 Bing 双向性表达包装细胞株。

### 细胞特性

- 1) 来源: 人 胚胎肾脏
- 2) 形态: 上皮样细胞 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, 有些贴壁细胞在快速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。**



## 一. 培养基及培养冻存条件准备

1) 准备 DMEM 培养基; 优质胎牛血清, 10%; 双抗 1%, 建议在完全培养基中添加 (L-谷氨酰胺 (2mM) 1%; NEAA 1% )。

### 注意:

1. 该细胞贴壁能力较弱, 培养时可酌情使用预铺 0.2%明胶的培养瓶/培养皿。在运输过程中, 细胞会漂浮聚团生长, 收到细胞时同时收集悬浮细胞和贴壁细胞离心重悬后传代培养。

2. 如果发生 293T/17 细胞不贴壁, 漂浮在培养基中的现象, 可以酌情在培养基中添加 (L-谷氨酰胺 (2mM) 1%; NEAA 1% ) 以便正确缓冲培养基。促使悬浮细胞更好的存活以及细胞更容易贴壁。

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。

该细胞贴壁能力较弱(半贴壁半悬浮)细胞, , 传代可以参考以下方法:

1. 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。

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. 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。

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。

