

HCC-LM3+luc 高转移人肝癌细胞稳定表达荧光素酶

细胞介绍

复旦大学中山医院肝癌研究所在研究 MHCC97 时发现其是异质性很强的细胞群。部分细胞有很强的致瘤性和转移力，而部分则较弱。因此分离建立了高低转移性不同的肝癌细胞株 MHCC97-H 和 MHCC97-L。据报道 MHCC97-H 存在较高的干细胞样的侧群细胞 (sp)。

肝癌 SPChemicalbook 细胞具有极高的致瘤性，并可能和肝癌转移潜能相关。HCCLM3 细胞是一株由人肝癌细胞株 MHCC97-H 接种裸鼠，进行 3 次肺转移筛选、取肺转移瘤建成皮下接种后高度自发性肺转移的肝癌细胞系。HCCLM3 细胞被广泛用于人肝癌发病机理的基础和临床研究，也可用于抗肿瘤药物筛选。

该细胞通过慢病毒转染的方式携带 Luc 基因。

细胞特性

- 1) 来源：人肝癌。
- 2) 形态：上皮细胞样，贴壁生长。
- 3) 含量： $>1 \times 10^6$ 细胞数/T25 培养瓶。
- 4) 规格：T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
- 5) 用途：仅供科研使用。

细胞筛选

该细胞为构建好稳定转染 Luc 的细胞，随细胞传代次数的增加，其 Luc 荧光强度会逐渐减弱。若实验要求需要维持荧光强度，可以加入嘌呤霉素进行再次筛选。建议收到细胞后至少传 3 代，冻存留种后再进行筛选。

初次进行细胞筛选时，建议加入终浓度为 1ug/ml 嘌呤霉素的完全培养基维持培养，若无细胞漂浮或者漂浮较少，即可更换为含 2ug/ml 嘌呤霉素的完全培养基继续筛选，以此类推，至最高药物浓度为 5ug/ml。

若筛选过程中，漂浮细胞大于 60%，则停止筛选，换成正常培养基培养，至细胞密度约 80%，可继续加入同浓度嘌呤霉素进行筛选。当加入 5ug/ml 嘌呤霉素时细胞正常增殖，可停止筛选，用不含药完全培养基正常培养。

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。

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



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。

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%。
- 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。对于贴壁细胞传代可以参考以下方法:

- 1、弃去培养上清, 用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。
- 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、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。

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。

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。

使用范围

本产品仅限于科学研究，绝不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

