

K-562+GFP 人慢性骨髓性白血病细胞绿色荧光标记

细胞介绍

该细胞是由 Lozzio 从一名 53 岁的慢性髓细胞性白血病急变期的女性患者的胸水中分离建立的。该细胞曾被认为是来源于粒系，处于高度未分化阶段；Anderson 等人作了细胞膜特性的研究后，认为该细胞是红白血病细胞系。该细胞是对自然杀伤细胞高度敏感的体外靶标，故而被广泛应用于这方面的研究。K562 的原始细胞是一种具有多向分化潜能的造血系统的恶性肿瘤细胞，能自发分化为红系、粒系和单核系的可辨识的祖细胞。该细胞表达 CD7 (25%)。

该细胞通过慢病毒转染的方式携带 GFP 基因。

细胞特性

- 1) **来源：**骨髓
- 2) **形态：**淋巴母细胞样；圆形，悬浮生长
- 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。

细胞筛选：

该细胞为已经构建好稳定转染 GFP 的细胞，随细胞传代次数的增加，其 GFP 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 1 μ g/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 2 μ g/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 5 μ g/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 5 μ g/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 $\times$ ，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。
- 3) 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)。
- 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 RPMI1640 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。

对于悬浮细胞, 传代可参考以下方法:

悬浮状态下生长的细胞, 可以通过向培养瓶中添加完全培养基来维持细胞的生长状态, 一般情况下细胞密度维持在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL (不同细胞对密度要求不同,) 可以维持细胞的正常生长。如需分瓶可以将细胞悬液收集到离心管中 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。

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。

