

## Hep G2+LUC 人肝癌细胞荧光素酶标记

### 细胞介绍

该细胞系来自 15 岁男性白人的组织。形态为上皮形，模式染色体数为 55，在免疫抑制小鼠中不致癌。

**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：肝细胞癌
- 2) 形态：上皮细胞样，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。

### 细胞筛选

该细胞为已经构建好的稳定转染 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。
- (3)

#### 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。

**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。**

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：安徽省合肥市高新区黄山路 602 号合肥国家大学科技园 A401 室



## 一. 培养基及培养冻存条件准备

1) 准备 MEM 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%。

培养注意事项：1. hepg2 细胞复苏或传代后会有少部分的细胞贴壁和部分悬浮的细胞，复苏两天后细胞会从贴壁细胞向外开始生长，有时细胞再生长过程中，细胞会再贴壁细胞的上方生长，形成不同的细胞层，这种情况会有发生。在细胞复苏的一周内，培养瓶中通常会有悬浮的活的细胞团，在换液过程中不要丢弃在这些活的悬浮细胞，可以通过离心（125×g）回收细胞，重新打回到培养瓶中，分离或者丢弃漂浮的活细胞会使细胞数量变少，引起细胞的停滞生长或细胞死亡。

2. 培养条件的细微变化，尤其是 pH 和培养液中血清的质量，可能会影响细胞的生长状况，在细胞的生长过程中会有细胞内的液泡出现，特别在细胞快要融合是会出现这种情况。培养细胞时使用未被灭活的高质量、低内毒素的胎牛血清，可以使细胞更好的贴壁和形成单层细胞。

3. 细胞在生长过程中可以通过将血清浓度提到到 20%来改善细胞生长缓慢的情况。（参考 atcc 有关该细胞的描述）

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 70%-90%，即可进行传代培养。

该细胞为轻微贴壁和少量悬浮培养细胞，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 也要回收到离心管中。

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。

