

细胞描述

来自52岁男性鳞状细胞癌患者鼻中隔转移胸腔积液的一种广泛的鼻中隔恶性肿瘤，诊断为间变性鳞状细胞癌。具有准二倍体核型（RPMI 2650）的人肿瘤细胞系，稳定的染色体数目和可能来源于恶性细胞使细胞系独特的永久人类细胞系。通过免疫过氧化物酶染色，细胞对角蛋白呈阳性 可用于癌症研究和毒理学

细胞特性

- 1.来源:** 52岁男性鳞状细胞癌患者鼻中隔
- 2.形态:** 上皮细胞样，贴壁生长，细胞非常小，成簇生长，融合形成厚层
- 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。

细胞培养步骤

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%。

注意：细胞附着在簇中，细胞会堆积，培养物不会 100% 汇合。传代时为避免结块，在等待细胞分离时不要通过敲击或摇动烧瓶来搅动细胞。难以分离的细胞可置于 37° C 以促进分散。

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°C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°C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°C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。