

细胞培养说明书

细胞名称	ASPC-1/GEM人胰腺腺癌细胞吉西他滨耐药株	英文名称	ASPC-1/GEM
形态特性	上皮样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	胰腺，源自转移部位：腹水		
培养体系	DMEM+10% FBS+GlutaMAX-1%+18 μ g/mL GEM+1% P/S 气相：空气，95%；CO ₂ ，5%。 温度：37℃		
背景	该细胞来源于人胰腺癌病人腹水中的细胞裸鼠异种移植而产生的癌性腹水细胞；AsPC-1细胞可以表达CEA、人胰腺相关抗原、人胰腺特异性抗原和黏蛋白。ASPC-1耐药筛选		
传代方法	建议第一次1:2传代 换液频率2~3次/周		
冻存条件	90FBS+10%DMSO， 推荐无血清冻存液（CX001）		

注意：1细胞复苏过程中，不可使用含有药物的培养基。须在细胞完全贴壁，形态完全展开，生长状态稳定后，方可根据实验需要添加GEM药物。若加药后细胞生长状态较为缓慢，可适当降低GEM的浓度，或使用不含GEM的完全培养基培养至细胞生长状态较好时，再更换为所需的GEM浓度；
2建议复苏细胞时始终穿戴防护手套和面罩，避免冻存管因温差较大而发生爆炸，造成人员伤害。
2) 细胞传代（建议以同等底面积的培养瓶/皿按照1: 2比例传代）
1待细胞密度达到80%~90%时，即可进行传代培养。
2弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1次，吸净残余的PBS。
3加入适当体积的0.25%（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA于培养瓶中（T25瓶-1mL，其它培养器皿可覆盖培养底面即可），置于37℃培养箱中消化2~5min，显微镜下观察细胞大部分变圆并脱落，即可轻拍培养瓶使细胞全部脱落。迅速拿回操作台，加入2倍体积的、含10%FBS的培养基中止消化。
4将细胞悬液移入离心管中，1000rpm/min离心5min，弃去上清液。
5向细胞沉淀中加入1~2mL完全培养基重悬细胞，轻吹混匀。将细胞悬液按1: 1的比例均匀铺于2个新的培养瓶/皿中，添加6~8mL完全培养基，置于37℃恒温细胞培养箱中培养。第二天显微镜下观察细胞生长情况，2~3day换液。

一、细胞收到后处理

请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。

收到细胞回到自己的实验室后，先打开外包装，用75%酒精喷洒整个瓶消毒后放到超净台内，严格无菌操作，不开瓶盖放培养箱静置2-3小时稳定细胞状态。镜下观察：未超过80%汇合度时，可将瓶装的完全培养液收集至离心管中，重新加入6ml完全培养基，放入37℃、5%CO₂孵箱培养；超过80%汇合度时，根据情况传代或者冻存。悬浮细胞需离心收集处理。抽出瓶中的培养基和细胞1000rpm离心3-5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）。
（注意发货的是密封培养瓶的话，处理完后放入培养箱培养记得培养瓶子拧松，初次传代最好使用T25培养瓶或6cm小皿1传2）

二、细胞培养步骤

1. 复苏细胞：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5mL培养基混合均

细胞培养说明书

匀。在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加4-6mL完全培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜（或将细胞悬液加入6cm皿中），培养过夜。第二天换液并检查细胞密度。

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1-2ml消化液（0.25%Trypsin-0.53mM EDTA）于培养瓶中，置于37℃培养箱中消化1-2min，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5ml以上含10%血清的完全培养基终止消化。

3. 轻轻吹打细胞，完全脱落后吸出悬液至15ml离心管中，在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀。

4. 将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含5-6 ml培养液的新皿中或者瓶中。

三、对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

1：收集细胞，1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀，将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

2：较脆弱的悬浮细胞可选择半数换液方式将培养瓶竖置1-2小时待大部分细胞沉到底部后，弃去半数培养基后，将剩余细胞悬起，将细胞悬液按1：2到1：3的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。

3：细胞冻存：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。贴壁细胞冻存时，弃去培养基后加入少量胰酶，细胞变圆脱落后，进行离心收集，1000RPM条件下离心3-5分钟，去除上清，按冻存数量加入血清及DMSO，冻存比例为90%FBS+10%DMSO。