

细胞培养说明书

细胞名称	MET-5A 人膜间皮细胞	英文名称	MET-5A
形态特性	上皮样	生长特性	贴壁生长
种属	人		
组织	间皮		
培养体系	M199+10% FBS+ ITS+3.3 nM EGF+400 nM hydrocortisone (氢化可的松)+1%P/S 气相: 空气, 95%; CO ₂ , 5%。 温度: 37℃		
背景	间皮细胞是从非癌症个体获得的胸膜液中分离出来的		
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, 推荐无血清冻存液货号 (CX001)。 消化时间2-3 分钟		
保藏机构	ATCC		
备注			

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。

细胞培养说明书

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。

特殊细胞收到注意事项：

部分细胞由于贴壁不牢在运输过程中发生细胞脱落，这是正常现象正确处理后可以正常生长。

1、将培养瓶内所有培养基转入无菌离心管，离心收集细胞（1200rpm 3-5min）去除旧培养基

2、用PBS重悬细胞，将所有细胞收集到一个离心管中，再次离心（1200rpm 3-5min）去除PBS；

3、加入1mL左右0.25%胰酶重悬细胞，混匀即可，不能吹打太多次，放入培养箱消化，根据细胞特性决定消化时间（约1~2分钟）；

4、消化好后，用移液枪轻轻吹打细胞悬液，使细胞团分散，迅速加入3-5mL完全培养基混匀以终止消化，离心（1200rpm 3-5min）去除胰酶；

5、加入5mL左右的细胞相应的完全培养基混匀，按比例接入无菌培养瓶/皿中；

6、显微镜下观察看细胞是否成均匀分散的单细胞，若有3-5个成团的小细胞团可不用重新消化，使之贴壁后待细胞生长稳定后再消散细胞。