

细胞培养说明书

细胞名称	小鼠皮下结缔组织细胞L Wnt 3A	英文名称	L Wnt 3A
形态特性	成纤维细胞	生长特性	贴壁生长
种属	小鼠		
组织	皮下结缔组织		
培养体系	DMEM培养基；10%胎牛血清；1%双抗 气相：空气，95%；CO ₂ ，5%。 温度：37℃		
背景	L-M(TK-) cells (ATCC CCL-1.3) 用Wnt-3A表达载体转染并在含G418的培养基中筛选稳转株。Wnt-3A基因编码一个有变异的信号功效分泌性糖蛋白。 Wnt基因控制胚胎发过程中的许多模式形成和生长事件。这些细胞分泌有生物活性的Wnt-3A蛋白。 它们是目前生产Wnt-3A条件培养基的最好来源。由于这种条件培养基还包含Wnt-3A蛋白外的其他因子，对于涉及Wnt-3A条件培养基的实验有必要用其来源细胞株(ATCC CRL-2648)作对照		
传代方法	建议第一次1:2传代2~3天换液1次		
冻存条件	推荐无血清冻存液		

一、细胞收到后处理

收到细胞后请第一时间观察拍照并严格按照以下要求进行操作（需遵照无菌操作要求）。

- 1: 到货后，观察瓶是否漏液并**拍照**。
- 2: 细胞瓶消毒，移入培养箱静置（**切勿静置过夜**）。3: 显微镜观察**拍照**，判断细胞密度和细胞漂浮情况。拆封口膜，消毒瓶口，移入安全柜

细胞在培养瓶中培养至良好状态后灌满完全培养液并封好瓶口是细胞运输的最好办法。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，培养箱静置2-4小时。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，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，具体操作见细胞培养步骤。（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盖拧松，传代后建议一瓶用原瓶里面的完全培养基，另外一瓶用自己配的完全培养基）

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，在1000RPM条件下离心8-10分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀。
4. 按5-6ml/瓶补加培养液，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。