

## A549 人非小细胞肺癌细胞说明书及注意事项

### 1. 简介:

人非小细胞肺癌细胞, 来源于 58 岁的白人男性肺癌组织, 由 D. J. Giard 等人建立于 1972 年。M. Lieber 发现 A549 可以通过胞苷二磷酸胆碱途径合成高比例的不饱和脂肪酸卵磷脂。

在本库通过支原体检测。 在本库通过 STR 检测。

所有肿瘤细胞和病毒转染的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, 操作者需注意自身防护。

基本培养条件:

培养基: 89%F-12K +10%胎牛血清+1%PS

温度: 37°C

气相: 95%空气, 5%二氧化碳

### 2. 细胞运输:

本细胞为贴壁细胞, 常规运输方式是将细胞在培养瓶中培养至状态良好后灌满新鲜的完全培养液并封好瓶口进行运输。

根据气温的高低及运输距离的远近, 我们可能采取以下两种方式运输。

活细胞胰酶消化离心后血清发货;

冻存管发货。

### 3. 客户收到细胞后请严格按照以下要求进行操作。

#### 3.1 培养前的注意事项:

A. 细胞出库前都是生长良好, 我们会对出库细胞进行拍照留档(建议用户在收到细胞时拍照片, 细胞拍照时请用 100X、200X 倍数各拍上 2~3 张照片留存, 可用作细胞状态的对比, 拍摄的照片应当清晰)。

B. 用户在收到细胞后, 先观察培养瓶是否完好, 培养液是否外渗, 培养液是否浑浊。

#### 3.2 新购细胞的初步培养:

客户收到细胞后在未开封前, 先用 75%酒精将培养瓶外表擦拭干净, 镜检细胞贴壁情况。将细胞置于培养箱中进行 1-2 小时的缓冲, 待细胞恢复基本生长状态后, 进行后续细胞实验。

细胞恢复基本生长状态后, 倒置显微镜下观察整个细胞生长情况:

A. 细胞密度未达 85%时, 用 75%酒精喷洒培养瓶后放在生物操作台内, 严格无菌操作, 打开细胞培养瓶, 吸取剩余培养液, 只留 6~8ml 培养液继续培养。

B. 细胞长满(达 85-95%), 即可进行传代。

### 3.3 细胞培养:

- A. 细胞密度未达 85% 时, 5~8ml 培养液继续培养。
- B. 培养基营养耗尽时, 需及时换新鲜培养基;
- C. 细胞长满 (达 85-95%), 即可进行传代。

传代参考步骤如下:

- a. 弃去培养液, 用无钙镁 D-PBS 洗涤 1-2 次
- b. 对于 T25 培养瓶来说, 加入 2-3ml 0.25% 的胰酶-EDTA 消化液, 置 37°C 消化, 并不时用显微镜观察细胞消化情况, 如细胞回锁变圆、透亮、轻拍瓶壁呈流沙样脱落, 则迅速回操作台, 加入 6-8ml 含 10% 血清的完全培养液, 终止消化并轻轻吹打细胞, 使其变成单细胞悬液。
- c. 将细胞收集于离心管中以 80g-120g 离心力离心 2-5min, 弃上清, 轻弹管底, 将细胞混悬于残留上清中。
- d. 加入新鲜培养液重悬细胞, 进行传代、冻存;
- e. 如果没有特别说明, 收到的细胞第一次传代比例为 1:2, 后期可按 1:4-1:6 的比例传代。

### 3.4 细胞观察:

- A、观察细胞密度做好用 (4X 物镜) 低倍镜观察, 以便正确的判断细胞密度细胞。
- B、观察细胞形态请用 (10X 或 20X) 高倍镜观察。

### 3.5 细胞保存:

冻存配方: 70% 基础培养液+20% 胎牛血清+10% DMSO

保存条件: 液氮保存

### 3.6 注意事项:

- A、瓶中运输的培养液我们建议保留培养一代后, 传代后分别用客户自己的培养基和运输培养基分别培养一瓶。以防止细胞不适应客户自用的培养基而造成状态不好或细胞死亡。
- B、如发现细胞贴壁不牢, 有少量脱落, 可离心运输用培养基, 将细胞离心下来, 混悬后接种到原瓶内;

### 4. 质量投诉:

我们细胞出库均保存清晰的照片, 状态良好。由于快递运输, 可能会造成一些不确定的影响, 我们在确认后, 符合下列情况的, 重新补发细胞。

- 4.1 收到细胞后, 未开封状态下, 若发现培养瓶破损、漏液及细胞污染, 请在收到产品 24 小时内及时与我们联系, 并提供清晰的照片, 核实结果属实。
- 4.2 若贴壁细胞悬浮, 不能贴壁, 原培养基培养两后, 如细胞仍不能贴壁, 请用台盼蓝染色

鉴定细胞活力，证实细胞无活力，请 7 天内及时联系，并将细胞拍照（多倍数多视野）及染色后的照片发至邮箱。

**4.3 活细胞胰酶消化离心后血清发货**，如细胞不能贴壁，大部分细胞未存活（需提供真实、清晰的能有效反应细胞状态的照片），重新补发细胞。

**4.4 干冰冻存管发货时的细胞复苏之后**，有大部分细胞未存活（需提供真实、清晰的能有效反应细胞状态的照片），重新补发细胞。

以下情况，投诉不予受理：

A. 客户开瓶后，由于操作造成细胞污染的，不予重新补发细胞。

B. 客户开瓶后，由于操作失误导致细胞形态改变。活力下降或死亡的，不予重新补发细胞。

C. 细胞状态不好，未提供收到细胞 3 天内的细胞照片的，不予重新补发细胞。

D. 客户所使用的培养条件与我们的培养条件不一致，导致细胞状态不佳的，不予重新补发细胞。

E. 细胞经其他处理导致细胞出现不正常死亡的，不予重新补发细胞。

## **5. 其它发货方式，收到细胞后的处理：**

收到细胞后立即观察是否有管裂，漏液，污染，如有以上任何一种现象，请立即拍照后联系我们。

收到细胞经培养 24h 后若发现污染或状态不佳，必须在发现的当天即刻向我们销售人员反馈。

### **5.1 客户收到 1.8ml 离心管常温细胞：**

须用 75% 酒精对离心管进行消毒后才能放到无菌操作台，过火打开管盖，将管中的血清细胞轻轻吹打几下，取出后放入 15ml 离心管中，加入 2 倍或 3 倍的完全培养液 80g-120g 离心力离心 2-5 分钟，弃上清重悬后加入说明书上所述的培养液混匀，加入到培养瓶中过夜培养，第二天观察细胞状态和密度。后续操作按正常培养方法即可。

### **5.2 客户收到冻存管细胞：**

请尽快复苏。要求 37℃ 的水浴中，晃动直至融化，移至 15ml 离心管，另加入 3~5 倍完全培养液，80g-120g 离心力离心 2-5 分钟，弃上清，放入 25cm<sup>2</sup> 瓶中培养。第二天观察并拍照。