

人胃癌顺铂耐药株 MKN-45/DDP

产品基本信息

细胞名称：**MKN-45/DDP**，人胃癌顺铂耐药株

种属来源：人源

组织来源：胃

细胞类型：表皮细胞

生长特性：贴壁/悬浮生长

培养基：RPMI 1640+10% FBS+双抗

生长条件：气相：95%空气+5%二氧化碳；温度：37℃

传代方法：1:2 至 1:3，每周 3 次

冻存条件：无血清冻存液，液氮储存

支原体检测：无

注：该细胞系培养所用培养基需加入药物维持，加药浓度为 5uM Cisplatin。

细胞培养操作

1) **复苏细胞：**将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻，加 4 mL 培养基混合均匀。在 1000 rpm 条件下离心 3 min，弃去上清液，加 1-2 mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入含适量培养基的培养瓶中培养过夜。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。

a、收集细胞培养上清：抽出瓶中的培养基和悬浮的细胞 1000rpm 离心 5 分钟，弃去上清，细胞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）。

b、剩下贴壁的细胞，用不含钙、镁离子的 PBS 轻轻润洗细胞 1 次。

c、加入 0.25% Trypsin-0.02% EDTA 消化液于培养瓶中(T25 瓶 1-2ml, T75 瓶 2-3ml)，使消化液浸润所有细胞，将培养瓶置于 37℃ 培养箱中消化 4-5 min（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，加少量培养基终止消化。

d、按 3mL/瓶补加培养基，轻轻打匀吹下细胞后装入无菌离心管中，1000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，补加 1-2 mL 培养液后吹匀。

e、将细胞悬液按 1:2 比例分到新的含 8 mL 培养基的新皿中或者瓶中，置于培养箱中培养中。（第一次传代建议一个满的 T25 传一个 10cm 或者 2 个 T25）。

3) **细胞冻存：**待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。下面 T25 瓶为例：

a、收集细胞及细胞培养液，装入无菌离心管中，1000 rpm 条件下离心 5 min，弃去上清液，用 PBS 清洗一遍，弃尽 PBS，加 1 mL 血清重悬细胞，进行细胞计数。

b、根据细胞数量加入无血清细胞冻存液，使细胞密度 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 / \text{mL}$ ，轻轻混匀，每支冻存管冻存 1mL 细胞悬液，注意冻存管做好标识。

c、将冻存管放入 -80°C 冰箱，24 h 后转入液氮灌储存。记录冻存管位置以便下次拿取。

培养注意事项

1. 收到细胞后首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象，若有上述现象发生请及时和我们联系。
2. 仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如细胞形态、所用培养基、血清比例、所需细胞因子等，确保细胞培养条件一致，若由于培养条件不一致而导致细胞出现问题，责任由客户自行承担。
3. 用 75%酒精擦拭细胞瓶表面，显微镜下观察细胞状态。因运输问题，部分细胞由于温度变化及剧烈碰撞死亡破碎形成碎片，是正常现象。观察好细胞状态后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37°C 培养箱放置 4-6h。
4. 请客户用相同条件的培养基用于细胞培养。
5. 建议客户收到细胞后前 3 天各拍几张细胞照片，记录细胞状态，便于和我司技术部沟通交流。由于运输的原因，个别敏感细胞会出现不稳定的情况，请及时和我们联系，告知细胞的具体情况，以便我们的技术人员跟踪回访直至问题解决。
6. 该细胞仅供科研使用。
7. 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 1: 2 传代。
8. 注意：1:2 传代就是 1 个 T25 瓶传 2 个 T25 瓶或者 2 个 6cm 皿。不是 1 个 T25 瓶传 2 个 10cm 皿。

悬浮细胞收货注意事项：

1、收货时需镜下拍照（看密度、状态）

2、静置后需镜下拍照（看整体密度）

a. 如密度 50%以下，建议换液并竖瓶培养

b. 如密度 50%-80%，建议换液培养，隔天观察密度

c. 如密度 90%，建议传代

3、换液及传代处理前，培养瓶竖着放置至少半小时（使细胞沉到瓶底）；收集上清，必须将瓶内所有培养基（70ml）全部收集！并用 PBS（10ml）润洗瓶底并收集！离心转速为 1000rpm，5min。