

人转移胰腺腺癌细胞吉西他滨耐药株（ASPC-1/GEM）

细胞介绍

一个胰腺癌病人的腹水中的细胞移植到裸鼠后建立了这个细胞株。

细胞特性

- 1) 来源：ASPC-1 耐药筛选
- 2) 形态：上皮细胞样，贴壁生长
- 3) 含量： $>5 \times 10^5$ 细胞数
- 4) 用途：仅供科研使用

细胞运输、保存及注意事项

	复苏细胞	冻存细胞
包装	充液的 T25 细胞培养瓶	1mL 冻存管
运输条件	常温	干冰
保存方式	75%酒精消毒瓶壁，置于 37℃ 恒温细胞培养箱	-80℃ 冰箱中保存过夜后转入液氮/立即复苏
注意事项	1. 收到细胞请先就培养瓶/冻存管的外观、细胞的状态，进行拍照并保存，如有问题请及时联系我们； 2. 收到的复苏细胞，若有较多细胞飘起，可能由于运输导致。请先置于 37℃ 细胞培养箱中静置 2~4h，待细胞贴壁后再做处理； 3. 复苏细胞充液培养基为不含药物的维持培养基，收到细胞后请及时更换为完全培养基； 4. 建议收到细胞后，首先进行扩增，并冻存部分细胞以备用。	

细胞耐药诱导过程

待细胞生长稳定后，开始倍增药物诱导剂量，每个剂量保持至细胞可以稳定生长至汇合度达 50% 以上。递增药物浓度依次为：0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 、12 $\mu\text{g/mL}$ 、18 $\mu\text{g/mL}$ 。约 10 个月后，细胞可在 18 $\mu\text{g/mL}$ GEM 药物浓度下稳定生长，视为耐药细胞株构建成功，并命名为 ASPC-1/GEM。

细胞培养试剂的配制

1) GEM 药物的配制及保存

建议将 GEM 药物配制成 18mg/mL 的母液：即使用 1mL DMSO 溶液溶解 18mg GEM 药物，使其完全溶解。

注意：可根据用量配置药物，并将药物分装保存，避免反复冻融导致药物失效。溶解后的 GEM，4℃ 保存 1 周，-20℃ 保存 1 个月，-80℃ 保存 6 个月。

2) 冻存液的配制

无血清细胞冻存液。

3) 完全培养基的配制

成分	体积/浓度
特级胎牛血清	10%
双抗	1%
GlutaMAX-1 谷氨酰胺	1%
GEM	0~18 μ g/mL
DMEM 培养基	补充至所需体积

细胞培养条件

气相：空气，95%；二氧化碳，5%；温度：37℃，培养箱湿度为 70%~80%。

细胞处理

1) 冻存细胞的复苏

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻，加入到含 4~6mL 完全培养基的离心管中混合均匀，1000rpm/min 离心 3~5min，弃去上清液。加入 1mL 完全培养基重悬细胞后，均匀铺于含 6~8mL 完全培养基的培养瓶（或皿）中，置于 37℃ 恒温细胞培养箱中过夜培养。第二天显微镜下观察细胞生长情况，2~3day 换液。

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。

注意：细胞传代过程中，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。

3) 细胞冻存

①细胞冻存时，步骤同 2) 细胞传代的①~④，细胞计数后，加入配制好的细胞冻存液，重悬细胞，按照 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞/mL 分配到一个冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。

②将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80℃冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。