QuiCeLL葵赛生物

# 过表达 OVA的小鼠结肠癌细胞（CT26.WT-OVA）

## 细胞介绍

CT26 细胞是被 N-亚硝基-N-甲基脲烷（NNMU）诱导得到的未分化的小鼠结肠癌细胞，该细胞的一个克隆形成的细胞系被命名为 CT26.WT。CT26.WT 被逆转录病毒载体 LXSN 稳定转化形成了一个致死性的亚克隆 CT26.CL25，这一病毒载体含有 lacZ 基因、编码肿瘤相关抗原（TAA）和 beta 半乳糖苷酶。

**该细胞能稳定表达卵清蛋白OVA（转染后此细胞带有嘌呤霉素抗性）。**

## 细胞特性

**1） 来源：**结肠
**2） 形态：**成纤维细胞样，贴壁生长
**3） 含量：**>5x10^5　细胞数
**4） 规格：**T25 瓶或者 1mL 冻存管包装
**5) 用途：**仅供科研使用。

**运输和保存：**干冰运输及复苏好存活细胞：（1）1mL 冻存管包装干冰运输，收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。（2）T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

**细胞接收后的处理：**

1）收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于室温放置约 1h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。

2）请在 4 或 5X 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。

3）贴壁细胞：**细胞在室温放置约 1h，显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况，有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。**若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下，可去除培养瓶中灌液培养基（若有未贴壁的细胞需要离心回收，重悬打入到原培养瓶中）,加入新配制的完全培养基 6-8mL，放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上，可以对细胞进行传代处理。传代过程中，若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。

4）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 T25 培养瓶 1：2 传代 。

## 一．培养基及培养冻存条件准备：

1）准备 1640 培养基 89%，特级胎牛血清 FBS　10 %　双抗 P/S　1%
**药筛浓度为 1.0ug/ml，培养过程中可不用再添加 puro，如若担心抗性随着传代时间降低，可定期用 0.5ug/ml 浓度 puro 维持，冻存和传代未贴壁时请勿加药。**

2）培养条件：　气相：空气，95%；二氧化碳，5%。 温度：37 摄氏度，培养箱湿度为 70%-80%。

3）冻存液：无血清细胞冻存液。

**二．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。在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶（或皿）中 37℃培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

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以参考以下方法：

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。

**2.** 加入 0.25％（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中（T25 瓶 1mL），置于 37℃培养箱中**消化 2 分钟（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，轻敲几下培养瓶后**加入 5ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。**

3.轻轻打匀后吸出，在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，补加 1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1：2 的比例分到新 T25 瓶中，添加 6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按 1:2~1:5 的比例进行。

**3）细胞冻存:** 收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例；

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 $1\times10^6$~$1\times10^7$ 个活细胞/ml.

2. 1000rpm 离心 3-5min，去掉上清。用无血清细胞冻存液重悬细胞 ，按每 1ml 冻存液含 $1\times10^6$~$1\times10^7$ 个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。

3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80 度冰箱中过夜，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。

**注意事项：**

1. 所有动物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，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。