

### 细胞介绍

HepG2 该细胞系来自 15 岁男性白人的组织。形态为上皮形，模式染色体数为 55，在免疫抑制小鼠中不致癌。HepG2-mito-DsRed 是一种将红色荧光蛋白 DsRed 特异性靶向线粒体的基因工程细胞模型。这种细胞在肝脏疾病、线粒体形态与功能动态追踪等科研领域具有重要的应用价值。

### 细胞特性

- 1) 来源：肝细胞癌
- 2) 形态：上皮细胞样，贴壁生长
- 3) 含量： $>5 \times 10^5$  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：**细胞在室温中放置 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 MEM 培养基；特级胎牛血清，10%；双抗，1%。

**药筛浓度为 3.0ug/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 1.5ug/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%。

**培养注意事项：1.该细胞复苏或传代后会有少部分的细胞贴壁和部分悬浮的细胞，复苏两天后细胞会从贴壁细胞向外开始生长，有时细胞再生长过程中，细胞会再贴**

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891

壁细胞的上方生长，形成不同的细胞层，这种情况会有发生。在细胞复苏的一周内，培养瓶中通常会有悬浮的活的细胞团，在换液过程中不要丢弃在这些活的悬浮细胞，可以通过离心（125×g）回收细胞，重新打回到培养瓶中，分离或者丢弃漂浮的活细胞会使细胞数量变少，引起细胞的停滞生长或细胞死亡。

2. 培养条件的细微变化，尤其是 pH 和培养液中血清的质量，可能会影响细胞的生长状况，在细胞的生长过程中会有细胞内的液泡出现，特别在细胞快要融合是会出现这种情况。培养细胞时使用未被灭活的高质量、低内毒素的胎牛血清，可以使细胞更好的贴壁和形成单层细胞。

3. 细胞在生长过程中可以通过将血清浓度提到到 20% 来改善细胞生长缓慢的情况。（参考 atcc 有关该细胞的描述）

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 70%-90%，即可进行传代培养。

该细胞为轻微贴壁和少量悬浮培养细胞，传代可以参考以下方法：

1. 收集：将培养瓶中的悬浮的细胞收集到离心管中。用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。由于细胞贴壁不牢 PBS 润洗后细胞会脱落所以 PBS 也要回收离心管中。

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 4-6 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. 将收集到的悬浮细胞、pbs 清洗液中的细胞和消化下来的贴壁细胞以 1000rpm 离心 5min，弃去上清，补加 1-2ml 培养液后重悬混匀后将细胞悬液按 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  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  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  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  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

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891

# QuiCell 葵赛生物

意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方可丢弃。

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。

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891