**人结直肠癌细胞/氟尿嘧啶耐药株**

**（LOVO/5-FU）**

**细胞介绍**

LOVO/5-FU为由LOVO细胞构建的耐5-FU药物细胞株。

**细胞特性**

|  |  |
| --- | --- |
| **1）来源：**人结直肠癌细胞耐药筛选 | **2）形态：**上皮细胞样，贴壁生长 |
| **3）含量：**>5×10^5 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。 |  |

**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** | 37℃恒温细胞培养箱 | -80℃冰箱中保存过夜后转入液氮或立即复苏 |
| **※注意事项** | 1. 收到细胞后，若发现培养瓶破损、漏液及细胞有污染；或冻存管有破损，融化、漏液等，请立即拍照并联系我们。照片包括细胞培养瓶/冻存管外观，显微镜下细胞照片（100倍，200倍各2张）；
2. 若收到的复苏细胞有少量细胞脱落、飘起，可能由于运输途中导致。请先置于室温中静置1h后，再进行处理；
3. 复苏细胞的充液培养基为不含药物的维持培养基，血清浓度较低，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（至少3代），并冻存部分细胞以备用。
5. 初次培养，当细胞汇合度达约80%时，可加入含5-FU的完全培养基培养至细胞完全融合后传代。若细胞传代过程中细胞停止增殖，且状态较差，则需降低药物浓度（首次降低一半药物浓度）或使用不含药物的完全培养基培养，至细胞汇合度达80%左右，且生长状态较好时，再更换为所需的5-FU药物浓度。
6. 细胞冻存过程中，不可添加药物，且冻存液中不含药物。
 |

**细胞培养试剂的配制**

1. **5-FU药物的配制及保存**

建议将5-FU药物配制成160mM的母液。

**注意：可根据用量配制药物，并将药物分装保存，避免反复冻融导致药物失效。**

1. **冻存液的配制**

无血清细胞冻存液。（冻存液中不含药物）

1. **完全培养基的配制**

|  |  |
| --- | --- |
| **成分** | **体积/浓度** |
| 特级胎牛血清 | 10% |
| 双抗 | 1% |
| 160uM 5-FU | 0.1%（160mM母液） |
| F12K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和细胞密度。

**注意：①细胞复苏过程中，不可使用含有药物的培养基。须在细胞生长至汇合度达80%左右时，方可添加5-FU药物；**若细胞生长状态较为缓慢，可适当降低5-FU的浓度（首次降低一半药物浓度），或使用不含5-FU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5-FU浓度。

**②建议复苏细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩，避免冻存管处于温差较大情况下发生爆炸，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0.25％（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA于培养瓶中（T25瓶1-2mL，T75瓶2-3mL），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，即可轻拍培养瓶至细胞全部脱落。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。

**注意：**若此过程中细胞停止增殖，且状态较差，则需降低药物浓度（首次降低一半药物浓度）或使用不含药物的完全培养基培养，至细胞汇合度约80%，且生长状态较好时，再更换为所需的5-FU药物浓度。

**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1×106 ~ 1×107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。

**注意：细胞冻存过程中，不可添加药物。**

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。