

3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞)

一、细胞基本属性	
细胞名称	3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞)
细胞别称	3T3-L1
商品货号	HC056
种属来源	小鼠
组织来源	胚胎
生长特性	贴壁细胞
细胞形态	成纤维细胞样
细胞介绍	3T3-L1是从3T3细胞 (Swissalbino) 中经克隆分离得到的连续传代的亚系。该细胞从快速分裂到汇合和接触性抑制状态经历了前脂肪细胞到脂肪样细胞的转变。该细胞鼠痘病毒阴性; 可产生甘油三酯, 高浓度血清可增强细胞内脂肪堆积。
生物安全等级	1
细胞规格	1 × 10 ⁶ cells/T25培养瓶或者1mL冻存管包装
支原体检测	无
传代周期	48-72 h
传代比例	1 :3-1:4 , 每2-3天换液一次
培养基	DMEM高糖(含丙酮酸钠), 10%新生牛血清
培养条件	气相: 95%空气+5%二氧化碳; 温度: 37°C
冻存条件	无血清冻存液, 液氮储存
细胞接收后的处理	<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。细胞运输途中脱落操作方法: 把脱落的细胞收集离心后弃上清, 用PBS清洗一遍, 离心弃上清, 在离心管中加入1ml胰酶吹散消化20秒左右, 加完全培养基终止消化后离心重新铺平, 剩下的贴壁细胞就按照正常贴壁细胞传代方法操作。</p> <p>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。</p>

二、细细胞处处理

1) 复苏细胞: 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8mL完全培养基的离心管中混合均匀。在1000RPM条件下离心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 5 mL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, T75瓶2mL), 置于37℃培养箱中消化2分钟左右(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5-6mL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 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。

贴壁细胞传代注意点:

- 1、 一定要PBS洗一遍。
- 2、 细胞多观察几次掌握时间, 不要在细胞没有基本脱落就终止消化然后吹打下来, 这样细胞更容易分化和死亡。
- 3、 不要一直对细胞吹打。

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。

三、培养注意事项:

①细胞出现问题, 予以重发情况:

1. 细胞运输途中遭遇的各种问题, 细胞丢失、瓶身破损、培养液严重漏液等, 重发;
2. 细胞污染问题, 请在收到产品3天内, 给我们提出真实的实验结果, 核实后重发;
3. 常温发货的细胞静置2小时后, 干冰冻存发货的细胞复苏后2天后, 绝大多数细胞未存活, (需提供真实清晰的细胞状态照片), 重发;
4. 干冰冻存发货的细胞复苏后2天后或常温发货的细胞静置2小时并且未开封, 出现污染, 重发;
5. 细胞活性问题, 请在收到产品7天内给我们提出真实的实验结果, 用台盼蓝染色法鉴定细胞活力, 和每天的细胞照片, 核实后予重发;
6. 细胞收到当天以及第2, 3 天请拍照, 3天未告知的, 视为产品合格。4-7天内出现问题需提供收到细胞前3天照片和细胞出现问题的照片以及细胞相关操作的详细步骤, 并跟技术人员沟通的, 由技术人员判定为我方责任的, 重发。

②细胞出现问题，不予以重发的情况：

1. 客户操作造成细胞污染，不重发；
2. 客户严重操作失误致细胞状态不好，不重发；
3. 非我们推荐细胞培养体系致的细胞状态不好，不重发；
4. 细胞状态不好，未提供真实清晰的培养前3 天的细胞状态照片，不重发；
5. 细胞培养时经其它处理导致细胞出现问题的，不重发；
6. 收到细胞并发现问题与客服人员沟通的时间证明大于7 天的，不重发；
7. 视具体情况而定。

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。

