

MOC1 细胞系

基本信息

细胞名称	MOC1 细胞系
T150 烧瓶	07-200-64
T75 烧瓶	10-126-37
冷 冻 剂	03-374-059
45um 过滤器	09-754-21
05%胰蛋白酶	sh30236.01
25%胰蛋白酶	sh30042.01
惰性谱线	MOC1,22
侵略性线	MOC2
IMDM	sh30228.02 Hams
营养混合物 F10-F12	sh30026.01 胎牛血清，特征-海克隆
目录 / 批次号	sh30071.03 / AWK24001
过滤 1L 过滤器瓶的过滤器	09-761-108
科学试剂目录编号	胰岛素：I6634-50mg 氢化可的松：H0135-1mg
EMD 微孔试剂目录编号	表皮生长因子(EGF) ， 重组人：01-107

细胞事项

解冻细胞系	1. 在解冻前, 将 21ml IMDM MOC 线培养基加入到 T150 中(如果想解冻成 T75, 则将 10ml 加入到 T75 中)
	2. 将液氮从冷冻瓶中取出, 喷上含有 70%酒精的小瓶进行清洗。
	3. 将冷冻瓶的下半部分放在 37 摄氏度的水浴中(不让盖子接触水, 以避免污染), 直到 有一小块冰漂浮着。
	4. 再次用 ETOH 喷洒冷冻瓶, 然后放在引擎盖上。将 1ml 培养液移液管加入到 1ml 细胞中, 并将这 些 2ml 加入到已经含有培养基的 T150 中(使一个 T150 总共有 22ml)。
	5. 在 T150 烧瓶中取一些培养基, 冲洗冷冻瓶, 然后平板放置, 以确保所有残留的细胞都留在冷 冻瓶中。
冷冻细胞系	1. 从 T150 中收集细胞, 如下图所示
	2. 在 15ml 锥形管中旋转成颗粒(1000 RPM x5 分钟)
	3. 排出上清液
	4. 点击 15ml 圆锥形管, 重悬细胞
	5. 加入 1.5ml IMDM MOC 系培养基, 在培养基中重建细胞-保持冰上
	6. 管入冰时缓慢加入 1.5 ml 冷冻介质(在 IMDM MOC 线介质中制作冷冻介质 -20%DMSO。例: 20ml 库存-加入 16ml IMDM MOC 线培养 基和 4ml DMSO。注射器过滤器, 使用 um 过滤器
	7. 每份 1 毫升到 3 个冷冻瓶

	8. 在-80 摄氏度内储存不超过 2 周
	9. 在 1-2 周内放入液氮溶液中
注： 如果需要，可增加到 2ml IMDM 和 2ml 冷冻培养基，以储存在 4 个小瓶中。此外，最好在冷冻细胞 前计数细胞并记录在小瓶上。	
细胞系特征	1. 惰性- MOC1: 基于体内研究的侵袭性较低。如果从 80%合流 T150 通过 1: 12, 需要 2-4 天才能达到 80%合 流。与更具侵袭性的细胞系相比, MOC1 细胞系在收获时需要的时间更长。 2. 侵袭性- MOC2: 基于体内研究, 更具侵袭性。如果从 80%合流 T150 通过 1: 12, 需要 2-4 天才能达到 80%合流。与惰性细胞系相比, 惰性细胞系更容易从烧瓶中分离出来。
从 T150 收集和传递细胞 /80%融合	1. 将 T150 中的介质倒入倾倒瓶中 2. 用 10-20ml PBS 清洗一次。倒出 PBS 清洗液。 3. 加入 1.5ml 0.05%胰蛋白酶, 尖端瓶, 确保胰蛋白酶覆盖整个表面积, 从而接触所有细胞(这样做, 使细胞不会暴露在胰蛋白酶中太久), 排出胰蛋白酶, 然后再应用 1. 5ml0.25%胰蛋 白酶。 4. 放置在 37C 培养箱中。侵袭性细胞系孵育 3-4 分钟, 惰性反应可达 10-12 min, 但在 6-8 min 后 检查。 5. 故意敲击烧瓶一侧的手掌几次, 使细胞松动。 6. 在显微镜下检查, 看细胞在培养基中是否能自由漂浮。如果大多数没有, 请放回 37C 培养箱中 再放置 3-5 分钟。尽量不要让细胞在胰蛋白酶中停留, 因为这样会杀死细胞。

	7. 一旦所有或大部分细胞漂浮, 加入 10ml IMDM MOC 培养基来中和反应。
	8. 移液管培养基和细胞从烧瓶中进入 15ml 的锥形细胞到颗粒细胞。离心机, 1000 RPM x 5 min。
	9. 倒出上清液。
	10. 以 1: 12 的速度通过细胞-在另外 12 毫升的培养基中重悬细胞。
	11. 从其中取出 1ml, 放入新的 T150 烧瓶中, 总体积为 22ml 的 IMDM MOC 系培养基(稀释 1: 12)
	12. 放回 37C 的培养箱中生长。应在 2-4 天内达到 80%的合流率。
注入小鼠侧腹 (异位)	所需细胞浓度: MOC1, MOC22: (用 0.15ml 注射 1e6 细胞) =6.66e6 细胞/ml MOC2: (用 0.15ml 注射 1e5 细胞) =6.66e5 细胞/ml
	1. 用 0 获取细胞。25%的胰蛋白酶, 如上所述。
	2. 用 IMDM MOC 系培养基中和胰蛋白酶后, 将细胞旋转成 50ml 锥形的颗粒(1000 RPM x5 分钟)。 注: 使用 50ml 锥形, 允许小尺寸针抽出细胞供注射。
	3. 用 10ml 冰水 PBS 重悬细胞颗粒(确保尽可能多地去除含有 FCS 的介质), 再次将细胞旋转成颗粒(1000 RPM x5 分钟)
	4. 用 3-6 ml 冰 PBS 重悬细胞颗粒再次清洗细胞(体积取决于颗粒的大小, 因为你将使用这个体积 来计数细胞)
	5. 使用血细胞计数仪或自动细胞计数器计数每毫升的细胞, 使用台盼蓝来消除死亡细胞。使用 存在的细胞总数(细胞/mlx 总 PBS 的 mlPBS), 计算重悬细胞颗粒所需的体积, 以达到 6.66e6(MOC1, MOC22) 或 6.66e5 cell/ml(MOC2) 浓度。 例如: MOC1 的细胞计数为: 2.8e6 细胞/mlx5ml(PBS) =14e6 细胞总数。14e6

	细胞/ 6.66e6 细胞/ml=2.1mlPBS 将细胞颗粒悬浮在其中。
	6. 再次将细胞旋转成小颗粒。倒出 PBS 上清液(不)。在计算体积的冰 PBS 中重悬颗粒以达到 适当的浓度, 记住灌注上清后 50ml 锥形中还有 200ul。
	7. 将 50ml 锥形冰转移, 每只小鼠皮下注射 0.15ml(150ul) 细胞。
	8. 按照标准协议注入鼠标。我们用 1 毫升注射器。我们用 1.5 英寸 21 号针绘制细胞, 并将针切换 到½英寸 26 号针进行注射。
1L 媒体协议	将培养基为 2: 1 IMDM 制成营养混合物
	1. 解冻胎牛血清和宾州/链球菌在 37 摄氏度
	2. 1L 过滤瓶加入 626ml IMDM 和 313ml 营养混合物
	3. 添加 50 毫升 FCS
	4. 添加 10ml Penn 流
	5. 过滤器
	6. 加入 1ml5mg/ml 胰岛素(或 500ul, 10mg/ml) 注: 用 10ml 无菌 H2O 稀释胰岛素 50mg 粉末, 加 50ul 无菌 1N 盐酸, 4C 箔保存
	7. 加入 40ug 氢化可的松 注: 将 Sigma 中氢化可的松酮稀释 1mg 氢化可的松粉制成 19ml 无血清 IMDM 和 1ml 100%乙醇, 制成 20ml。每升使用 800ul。在-20 处存储等分。
	8. 添加 5ug EGF 注: 使 EGF - make 1ug/ul 原液用无血清 IMDM 稀释, 每升加入 5ul。在-80 处存储等分。