

OriCell<sup>®</sup>

## 细胞产品手册

### OriCell<sup>®</sup> NIH/3T3 小鼠胚胎成纤维细胞系

产品货号: M5-0301



*We help you discover life*

## 产品介绍

小鼠胚胎成纤维细胞系 (NIH/3T3) 细胞是从 NIH/Swiss 小鼠胚胎培养过程中建立的可连续传代细胞株。NIH/3T3 细胞对肉瘤病毒的转化灶形成和白血病病毒的繁殖特别敏感，对 DNA 转化及转染研究十分有用，该细胞鼠痘病毒阴性。

NIH/3T3 细胞易于转染，因此常用于实验室转染及基因表达的研究。

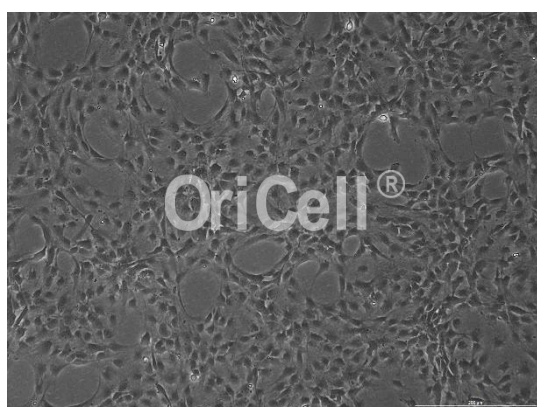
**注意：**本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

## 产品信息

产品名称	小鼠胚胎成纤维细胞
简称	NIH/3T3
货号	M5-0301
规格	1×10 <sup>6</sup> 个/管 或 1×10 <sup>6</sup> 个/瓶
组织来源	小鼠胚胎
细胞特性	贴壁生长；成纤维样
培养条件	95% 空气；5%CO <sub>2</sub> ；37°C
培养基	DMEM+10%FBS
倍增时间	24~48 h
生物安全等级	1
保存条件	液氮 (-196°C)

**注意：**本产品在生产过程中严格控制无菌。在后续培养过程中，请根据实际情况决定是否在培养基中添加抗生素。

OriCell® NIH/3T3 细胞系在倒置相差显微镜下的形态



## 质量控制

---

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测。

详情见《产品检测报告》。

## 处理原则

---

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合贴壁细胞生长的培养容器，且不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。

**注意：**本产品冻存液中含有 **DMSO**，其具有潜在风险，请谨慎处理。

本产品说明书中使用的试剂简写规则如下：

**FBS:** Fetal Bovine Serum 胎牛血清

**NBCS:** Newborn calf serum 新生牛血清

**BCS:** Bovine calf serum 小牛血清

**HS:** Horse Serum 马血清

**Glu:** Glutamine 谷氨酰胺

**ITS:** Insulin、Transferrin、Selenite 胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸添加物

**NEAA:** Non Essential Amino Acid 非必须氨基酸

**SP:** Sodium Pyruvate 丙酮酸钠

**β-mer:** β-mercaptoethanol β-巯基乙醇

**Dex:** Dexamethasone 地塞米松

**P/S:** Penicillin- Streptomycin 青霉素-链霉素（双抗）

## 细胞的复苏和培养

### 所需材料

- OriCell® NIH/3T3 细胞
- 适宜细胞生长的完全培养基

### 操作步骤

**注意：**收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80℃，让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37℃预热。
2. 完全培养基温浴到 37℃。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
4. 从-80℃冰箱中取出细胞，放入 37℃水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

**注意：**1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染；

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。

5. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
7. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
8. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。  
**注意：**请以公式  $a=\omega^2r$  ( $a$ :向心加速度； $\omega$ :旋转角速度， $\omega=\pi n/30$ ； $r$ :转子半径) 计算相应转速。
9. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
10. 将细胞接种到 1 个 T25 培养瓶或底面积相当的培养容器中。加入足量完全培养基，1 个 T25 培养瓶中培养基总量不少于 5 mL。
11. 摇匀细胞，放入 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

**注意：**接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。

12. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

**注意：**若发现大量漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。

13. 之后，每 3 天更换一次完全培养基，直到细胞汇合度至 95%以上，即需传代。

## 常温细胞接收处理

---

### 所需材料

- OriCell® NIH/3T3 细胞
- 适宜细胞生长的完全培养基
- 75%医用酒精
- 数个无菌的 EP 管

**注意：**收到常温运输的细胞，取出细胞培养瓶后请仔细核对标签信息；检查培养基是否浑浊；瓶身有无裂痕；瓶口有无培养基渗漏。如有任何异常情况，请及时与我们联系。

### 操作步骤

1. 用 75% 医用酒精全面喷洒擦拭细胞培养瓶，转移入超净工作台。
2. 去除瓶口封口膜，再用蘸有 75% 医用酒精的洁净无纺布擦拭瓶口。
3. 镜下观察细胞，检查细胞是否出现大面积脱落，或大量死细胞。
4. 若一切正常，请将细胞培养瓶放入 CO<sub>2</sub> 培养箱内，静置至少 2 h，使运输过程中震动脱落的细胞重新贴壁。
5. 从培养箱中取出细胞，镜下检查有无异常。
6. 若无异常，在超净工作台中打开培养瓶，吸取至少 2 份 1 mL 培养基至无菌的 EP 管中，妥善保存，以备检测。

**注意：**留样的细胞培养基请放置 4°C 冰箱保存。若细胞短期内出现污染，请取其中 1 份做微生物检测；若直到细胞第二次传代没有任何异常，则可丢弃样品。

7. 弃去多余的培养基，1 个 T25 培养瓶中保留 10 mL 培养基即可。
8. 将细胞放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。
9. 每 3 天更换一次新鲜的培养基，直到细胞汇合度至 95% 以上，即需传代。

## 细胞的传代

### 所需材料

- OriCell® 0.25% Trypsin-0.04% EDTA (货号: TEDTA-10001, 以下简称胰酶)
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) (货号: PBS-10001, 以下简称 PBS)
- 适宜细胞生长的完全培养基

### 操作步骤

1. 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37°C。
2. 吸去培养容器中的培养基。
3. 用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤细胞 2 次, 注意动作轻柔, 清洗全面。吸去 PBS。
4. 加入胰酶 (T25 培养瓶加入约 1.5 mL, T75 培养瓶加入约 3 mL), 迅速铺匀, 保证充分接触细胞表面。
5. 显微镜下观察消化情况, 约 70%~80% 细胞收缩变圆后, 轻拍培养容器外壁, 使细胞脱离培养表面。
6. 立即加入完全培养基 (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL), 随即轻摇培养容器, 使培养基和胰酶迅速混匀, 终止消化。
7. 使用吸管或移液管吸取细胞悬液, 吹打培养容器底面数次, 尽可能将细胞都吹打下来。  
**注意:** 吹打动作不可剧烈, 避免产生大量气泡, 否则可能损伤和损失细胞。
8. 将细胞悬液转移至离心管中。用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤容器 1 次, 收集残留细胞。
9. 收集的所有细胞悬液以 250×g 离心 4 min。
10. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基, 轻柔吹打细胞沉淀, 充分吹散、混匀。
11. 将细胞按(2~3) × 10<sup>4</sup> 个活细胞/cm<sup>2</sup> 接种至适宜的培养容器内。  
**注意:** 我们建议有条件且计数效率较高的情况下, 进行手工计数, 以期获得精准的细胞浓度指导接种; 在没有精确计数条件的情况下, 按照适宜比例传代是更好的方法。通常 OriCell® NIH/3T3 细胞传代比例为 1:3~1:4, 60 h 内生长至可传代汇合度。请根据细胞实际生长情况调整传代比例。
12. 摇匀细胞, 放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。
13. 传代次日, 观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞, 应予以换液。
14. 每 3 天更换一次新鲜的培养基, 待细胞汇合度至 95% 以上, 即需传代或冻存。

## 细胞的冻存

---

### 所需材料

- OriCell® 通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）
- OriCell® 通用血清型程序冻存液（货号：CYRO-10001）

### 操作步骤

1. 若选用 OriCell® 通用血清型程序冻存液，请在操作前将程序降温盒放入 4°C 冰箱内预冷。
2. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。
3. 细胞消化请参考 OriCell® NIH/3T3 细胞的传代操作步骤 1~9。
4. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞。
5. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。  
**注意：**在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4°C 冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。
6. 若选用 OriCell® 通用血清型程序冻存液，将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入 -80°C 冰箱中。若选用 OriCell® 通用无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入 -80°C 冰箱中。  
**注意：**细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4 h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。
7. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。  
**注意：**细胞不可长期保存在 -80°C 冰箱中。我们建议在 -80°C 冰箱中的保存时间不要超过 48 h。

赛业（广州）生物科技有限公司保留 OriCell® 细胞培养产品技术文件的所有权利。  
没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，  
不得改编或转载用作其他商业用途。