

## 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。<br>注射器过滤器，使用 um 过滤器 |
|       | 7. 每份 1 毫升到 3 个冷冻瓶   |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>8. 在-80 摄氏度内储存不超过 2 周</p>   |
|  | <p>9. 在 1-2 周内放入液氮溶液中</p>  |
| <p><b>注：</b> 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。</p> |  |
| <p><b>细胞系特征</b></p>  | <p>1. <b>惰性- MOC1:</b> 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更长。</p> <p>2. <b>侵袭性- MOC2:</b> 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。</p>  |
| <p><b>从 T150 收集和传递细胞 /80%融合</b></p>  | <p>1. 将 T150 中的介质倒入倾倒瓶中</p> <p>2. 用 10-20ml PBS 清洗一次。倒出 PBS 清洗液。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>5. 故意敲击烧瓶一侧的手掌几次, 使细胞松动。</p> <p>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。</p> |

|                        |   |
|------------------------|---|
|                        | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>9. 倒出上清液。</p> <p>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。</p> <p>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）</p> <p>12. 放回 37C 的培养箱中生长。应在 2-4 天内达到 80%的合流率。</p>   |
| <p>注入小鼠侧腹<br/>(异位)</p> | <p><b>所需细胞浓度:</b></p> <p>MOC1, MOC22: (用 0.15ml 注射 1e6 细胞) =6.66e6 细胞/ml</p> <p>MOC2: (用 0.15ml 注射 1e5 细胞) =6.66e5 细胞/ml</p> <p>1. 用 0 获取细胞。25%的胰蛋白酶，如上所述。</p> <p>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)。 <b>注:</b> 使用 50ml 锥形，允许小尺寸针抽出细胞供注射。</p> <p>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）</p> <p>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）</p> <p>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。</p> <p><b>例如:</b> MOC1 的细胞计数为: 2.8e6 细胞/mlx5ml (PBS) =14e6 细胞总数。14e6</p> |

|                |   |
|----------------|---|
|                | <p>细胞/ 6.66e6 细胞/ml=2.1mlPBS 将细胞颗粒悬浮在其中。</p> <p>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。</p> <p>7. 将 50ml 锥形冰转移, 每只小鼠皮下注射 0.15ml (150ul) 细胞。</p> <p>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。</p>  |
| <p>1L 媒体协议</p> | <p><b>将培养基为 2: 1 IMDM 制成营养混合物</b></p> <p>1. 解冻胎牛血清和宾州/链球菌在 37 摄氏度</p> <p>2. 1L 过滤瓶加入 626ml IMDM 和 313ml 营养混合物</p> <p>3. 添加 50 毫升 FCS</p> <p>4. 添加 10ml Penn 流</p> <p>5. 过滤器</p> <p>6. 加入 1ml5mg/ml 胰岛素 (或 500ul, 10mg/ml)<br/> <b>注:</b> 用 10ml 无菌 H2O 稀释胰岛素 50mg 粉末, 加 50ul 无菌 1N 盐酸, 4C 箔保存</p> <p>7. 加入 40ug 氢化可的松<br/> <b>注:</b> 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。</p> <p>8. 添加 5ug EGF<br/> <b>注:</b> 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。</p> |