HCC-LM3 人肝癌细胞（高转移）

一、细胞简介

货号	YFX-CLH036
背景描述	复旦大学中山医院肝癌研究所在研究 MHCC97 时发现其是异质性很强的细胞群。部分细胞有很强的致瘤性和转移力，而部分则较弱。因此分离建立了高低转移性不同的肝癌细胞株 MHCC97-H 和 MHCC97-L。据报道 MHCC97-H 存在较高的干细胞样的侧群细胞（sp）。肝癌 SPChemicalbook 细胞具有极高的致瘤性，并可能和肝癌转移潜能相关。 HCCLM3 细胞是一株由人肝癌细胞株 MHCC97-H 接种裸鼠，进行 3 次肺转移筛选、取肺转移瘤建成皮下接种后高度自发性肺转移的肝癌细胞系。HCC-LM3 被广泛用于人肝癌发病机理的基础和临床研究，也可用于抗肿瘤药物筛选。
细胞形态	上皮细胞样，贴壁生长。
规格	>1 × 10^6 ceLLs，T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	人肝癌。
培养基	DMEM+ 10% FBS+ 1% P/S。
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%。
细胞检测	不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
传代比例	1:2-1:5；第一次收到细胞建议 T25 培养瓶 1：2 传代。
换液频率	1-2 天。
细胞冻存液	无血清冻存液。

二、细胞收到后处理方式

1、收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃培养箱放置约 2-3h，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。

2、请在 4 或 5×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。

3、贴壁细胞：细胞在 37℃培养箱中放置 2-3h，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。

4、备注：运输用的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 。

三、细胞传代（建议一传二）

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

1、在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基。

2、向培养瓶内加入 3mL 无菌的 1 × PBS，水平放置培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积，吸弃 PBS。

3、向瓶内加入 1mL 0.25％胰蛋白酶（含 EDTA），浸润底面后放入 37℃ CO_2 培养箱中

孵育 1~2min。

4、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2mL 完全培养基中，将悬液吸入 15mL 离心管。

注：如细胞不能一次性完全消化，可采取如下方法：

A. 准备一个无菌的 15mL 离心管，加入 2mL 完全培养基。

B. 将消化下来的细胞加入到上述离心管中。

C. 向之前消化的培养瓶中加入 1mL 胰酶继续消化 2min 左右，轻拍培养瓶，95%左右细胞脱落后加入 2mL 含 10%FBS 的完全培养基中和，中和后的细胞悬液移入 A 中的离心管内。

四、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、选择指数生长期的细胞，吸去培养液，加 PBS 清洗 1-2 遍。去 PBS，加入 0.25% 胰酶 1.5mL 润洗 10 秒，去胰酶。将培养瓶放 37 度培养箱，靠残余胰酶继续消化细胞直至细胞变圆，拍打瓶侧使细胞脱落。细胞消化下来后，加 5mL 培养液全部吹打下来，再 1000RPM 离心 3 分钟。

2、加入 1-1.5mL 成品冻存液，分装至 2mL 冻存管里，将冻存管放入充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃度冰箱过夜，第二天再转至液氮。

五、细胞复苏

1、将恒温水浴锅中的水预热到 37℃。

2、准备一支 15mL 离心管，加入 5mL 完全培养基，放入 37℃水浴锅中预热。

3、戴上护目镜，厚毛线手套后，从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入 37℃恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率。

4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中，混匀后，1000rpm 离心 5min。

5、准备一个 T-25 培养瓶，写上细胞名称、日期，再加入 4mL 完全培养基。

6、离心完成后弃去上清，用 1mL 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，混匀后转入 CO_2 培养箱中培养静置。

六、运输和保存

1、T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到细胞后请镜下观察细胞生长状态，如铺瓶率超过 85%请立即进行传代操作。

2、1mL 冻存细胞悬液装于 1.8mL 的冻存管中，置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输；收到细胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养，如无法立刻进行复苏操作，冻存细胞可在-80℃的条件下保存 1 个月。

七、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，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2、从液氮中取出细胞冻存管时，若冻存管内有液氮进入，需拧松冻存管，排出内部残留的液氮，之后拧紧冻存管，置于干冰上，然后放入 37℃水浴中，避免温差太大造成液氮快速气化而爆炸。