**冻存细胞收货后处理方法:**

1. 收到细胞后，首先观察泡沫箱中干冰是否有剩余，冻存管是否完好，是否有解冻情况。若发现干冰完全汽化或冻存管有解冻现象，请及时拍照并与我们联系。如果细胞签收三天内未与我们联系，则默认为收货良好。
2. 细胞在液氮中可长期保存；-80 ℃保存不要超过一个月，长期在-80 ℃可能会导致细胞活率下降。
3. 复苏第一管细胞后，如有活性、状态问题及时与我们联系。

**MLE-12细胞说明书**

细胞背景

由 Kathryn A. Wikenheiser 于 1992 年从人类表面活性蛋白 C 基因启动子区域控制下的 SV40 大 T 抗原转基因小鼠的肺肿瘤中建立。接种裸鼠在 6 到 9 个月内会产生肿瘤。细胞表达大 T 抗原的 mRNA。检测到肺表面活性蛋白B和C。细胞分泌磷脂以响应佛波酯和ATP，但不响应毛喉素。

细胞信息

* 细胞名称：MLE-12 小鼠肺上皮细胞(STR鉴定正确)
* 种属：小鼠
* 形态特性：上皮样细胞
* 生长特性：贴壁生长

培养条件

* 培养基DMEM/F12＋[2% FBS](https://www.procell.com.cn/view/5408.html" \t "_blank)＋[1% P/S](https://www.procell.com.cn/view/262.html" \t "_blank)+2% GlutaMAX-1谷氨酰胺+1% ITS（胰岛素+转铁蛋白+硒）+1%氢化可的松 +10nM雌二醇
* 培养温度：37℃。
* 气体环境：95%空气，5%CO₂。
* 培养箱湿度：70% - 80%。
* 传代比例：1:2
* 换液频次：2-3次/周

**细胞操作**

* **细胞复苏**：

提前取出1支细胞洗涤液和1支细胞复苏液，放在37℃水浴锅中解冻。将细胞冻存管从液氮中取出，**迅速**置于 37℃水浴中解冻。解冻后立即将细胞悬液转移到睿必特TM洗涤液管中，轻轻混匀。将离心管置于水平离心机中，2000rpm 离心5分钟，弃去上清。再加入5-6ml睿必特TM复苏液，用滴管轻轻吹打成单细胞悬液，避免气泡。将细胞悬液转移至T25细胞培养瓶中，置于二氧化碳培养箱中培养。

* **细胞传代**：

1.当细胞汇合度达 80%，即可进行传代培养。

2.弃去旧培养基，用不含钙、镁离子的 PBS 轻轻润洗细胞 1-2 次。

3.加 1-2 mL消化液（0.25 % Trypsin-0.53 mM EDTA）于培养瓶中，常温或者37 ℃消化 1-2 min，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，加 5 ml 以上含 10%血清的完全培养基终止消化轻轻吹打细胞，完全脱落后吸出至离心管中，轻轻吹打成单细胞悬液，2000 rpm 离心5 min弃去上清液。

4.按 5-6 mL/瓶补加完全培养基，将细胞悬液按 1:2的比例分到新的含 5-6 mL 完全培养基的培养皿中或者培养瓶中。

**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. 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。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。