**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞增殖/毒性检测 |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

详见实验方案

# 2 仪器、试剂及实验细胞系

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 二氧化碳培养箱 | 3111 | Thermo |
| 全自动细胞计数仪 | Countess II | Thermo |
| 荧光倒置显微镜 | Ts2R-FL | NIKON |
| 成像系统 | DP73 | OLYMPUS |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| RPMI-1640 | CM10040 | 中科迈晨 |
| 0.25％Trypsin Solution | SH30042.01 | HyClone |
| Penicillin-Streptomycin Solution | SV30010 | HyClone |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | Solarbio |
| 胎牛血清（FBS） | 10091148 | Gibco |
| Cell Counting Kit | K009-1000T | ZETA |

## 2.3 实验细胞系

SU-DHL-2 (人弥散性组织淋巴瘤细胞)培养基：RPMI-1640＋10% FBS＋1% P/S

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏（原代细胞和干细胞不适用）

3.1.1从液氮中取出细胞冻存管 (注意：佩戴防爆管面具)，快速将其置入37℃水浴中解冻， 直至冻存管中无结晶，然后用75%的酒精擦拭冻存管外壁；

3.1.2将冻存管中的细胞移至含5mL完全培养基的15mL离心管中，1000rpm离心5min；

3.1.3弃上清，沉淀用5mL完全培养基重悬，接种T25培养瓶，于37℃，5%CO2细胞培养箱中培养；

3.1.4第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

# 3.2细胞传代（原代细胞和干细胞不适用）

3.2.1细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃T25培养瓶中的培养液，用PBS清洗细胞一次；

3.2.2添加0.25%胰蛋白酶消化液约1mL至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入5mL完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至15mL离心管中，1000rpm离心5min；

3.2.3弃上清，沉淀细胞用1-2mL完全培养基重悬，然后按1:2比例进行分瓶传代 (两个T25)，补充新的完全培养基至5-8mL/瓶，最后放入37℃，5%CO2细胞培养箱中培养。

## 3.3 细胞冻存

3.3.1细胞生长至覆盖培养瓶的80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.3.2添加0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.3.3弃上清，沉淀细胞加入 1mL/支的无血清冻存液，混匀后加入冻存管中。 (如：冻一支，加入 1ml 无血清冻存液)

3.3.4将冻存细胞直接放入－80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 小时以上。

## 3.4 细胞增殖-毒性检测

3.4.1 在 96 孔板中配置100 µL的细胞悬液。将培养板在培养箱过夜培养（在37℃，5% CO2的条件下）。

3.4.2 向培养板加入10 µL不同浓度的待测物质。在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或48h）。

备注：待测物质加入量和培养时间以实验方案为准。

3.4.3向每孔加入10 µL CCK-8溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响OD值的读数）。如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基（除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基），去掉药物影响。

3.4.4将培养板在培养箱内孵育2 h。

3.4.5用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

3.4.6如果暂时不测定OD值，打算以后测定的话，可以向每孔中加入10 µL 0.1M的HCl 或者1% SDS(W/V)溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在24 h内吸光度不会发生变化。

## 3.5 活力计算

细胞活力（％）=[A(加药)－A(空白)]／[ A(0 加药)－A(空白)]×100

A（加药）：具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和 CCK-8溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0加药）：具有细胞、CCK-8溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

## 3.6 实验结果

实验结果见附件EXCEL表。