

Daoy Human Medulloblastoma Cell Line

Daoy 人髓母细胞瘤细胞

(产品编号: PWE-HU085)

产品操作手册



产品编号

PWE-HU085

产品规格

1×10⁶ 个/瓶

产品描述

Daoy 细胞系，源于 4 岁患有髓母细胞瘤的男童患者后颅窝肿瘤的活检材料。

产品信息

细胞名称	Daoy 人髓母细胞瘤细胞 Daoy Human Medulloblastoma Cell Line
细胞别称	DAOY; D324 Med; D-324 Med; D324 MED; D-324MED; D324
保存条件	液氮（-196℃）
种属来源	人
组织来源	结缔组织增生性小脑髓母细胞
生长特性	贴壁生长
细胞形态	上皮细胞样
使用权限	A 类
生物安全等级	1
培养体系	MEM 培养基（货号：MA0217）+10% FBS（货号：PWL001）+1% P/S（货号：MA0110）
传代周期	2~3 天
传代比例	1:2~1:3
换液频率	2~3 天
冻存体系	无血清非程序细胞冻存液（无酚红）（货号：MA0405） 通用细胞冻存液（货号：MA0205）
培养环境	气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37℃。



常温细胞收货后处理方法

1. 处理细胞前，请仔细阅读说明书，了解细胞相关信息和细胞处理方法。请准备好需要用到的培养基和相关试剂，尽量避免因环境的不适应而造成细胞状态异常。
2. 收到细胞后，首先观察培养瓶是否完好，若发现培养瓶有破裂，培养基外溢、浑浊等现象，细胞可能被污染，请及时拍照并与我们联系。
3. 显微镜下观察细胞形态是否正常，对于贴壁细胞则要注意看贴壁情况是否良好，观察细胞密度，确认细胞无异常（由于运输原因，贴壁细胞会有少量细胞脱落，为正常现象）。
4. 用 75%酒精对培养瓶表面进行消毒处理，将培养瓶置于细胞培养箱中静置培养 3~4 h，以恢复细胞状态，如果细胞密度不高，建议过夜培养。
5. 静置完成后，取出培养瓶，对细胞进行镜检，拍照留档，方便后期对比。如发现细胞异常请及时与我们联系，如果三天内未与我们联系，则默认为收货良好，将不再提供补发的售后服务。
6. 若细胞密度超过 80%，则可以根据以下提供的传代步骤进行传代；若细胞密度未达到 80%，则先吸除原来培养瓶中大部分的培养基，留下 5~10 mL 左右，稍微拧松瓶盖，继续放入细胞培养箱中培养，直到细胞密度超过 90%时再进行传代。

冻存细胞收货后处理方法

1. 处理细胞前，请仔细阅读说明书，了解细胞相关信息和细胞处理方法。请准备好需要用到的培养基和相关试剂，尽量避免因环境的不适应而造成细胞状态异常。
2. 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。如果三天内未与我们联系，则默认为收货良好，将不再提供补发的售后服务。
3. 若细胞冻存管正常，可以选择立即按照以下步骤复苏细胞，或者立即冷冻保存（如 24 h 内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中），需要时再复苏即可。

质量控制

本产品通过无菌、支原体、STR 等检测。

详情见《产品检测报告》。

声明：本细胞产品仅供科学研究之用，严禁转售、共享、分发、出借、赠送给任何第三方。



冻存细胞的复苏与培养

操作步骤

1. 水浴锅 37°C 预热，并将完全培养基温浴到 37°C。
2. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
3. 从液氮或 -80°C 冰箱中取出细胞，放入 37°C 水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。
建议：复苏前 10 min 从液氮罐取出，放于 -80°C，让管中液氮挥发，防止炸管。
4. 用 75% 医用酒精擦拭冻存管外表面。
5. 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 15 mL 离心管中。
6. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞至上述 15 mL 离心管，减少损失。
7. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。
8. 离心后去除上清。加入 1 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
9. 将细胞平均接种到 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。
备注：接种完后需摇匀，然后在镜下观察细胞密度；如果细胞密度太大，则需更换更大面积的培养容器或者重新接种多个 T25 培养瓶。
10. 放入 37°C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。
备注：接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会影响细胞贴壁，造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。
11. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。
备注：若发现较多漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。
12. 之后，每 2-3 天更换一次完全培养基，直到细胞生长至 80% 汇合，即需传代。

细胞的传代

操作步骤

1. 将完全培养基、0.25% Trypsin-EDTA（货号：MA0233，以下简称胰酶）预热至 37°C。
2. 吸去培养容器中的培养基。
3. 用 PBS (1X)（货号：MA0015）（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 0.5~1 mL，T75 培养瓶加入约 1~1.5 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 1.5~3 mL，T75 培养瓶加入约 3~4.5 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 4 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 1 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
11. 将细胞按推荐传代比例（传第一代时可适当减少比例，如 1:2~1:3）接种至适宜的培养容器内。
12. 摇匀细胞，放入 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。
13. 传代次日，观察细胞状态。培养期间可参考推荐换液频率进行换液。
14. 待细胞生长至 90%汇合，即需传代或冻存。

细胞的冻存

操作步骤

1. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。
2. 细胞消化请参考细胞的传代操作步骤 1~9。
3. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞。
4. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。
5. 若选用通用细胞冻存液（货号：MA0205），请在操作前将梯度降温盒放入 4℃冰箱内预冷，细胞分装完后将冻存管放入梯度降温盒再放入-80℃冰箱中。
6. 若选用无血清非程序细胞冻存液（货号：MA0405），请将冻存管直接分散放入-80℃冰箱中。
7. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。



常见问题与解决方法

1. 常温细胞发货贴壁细胞悬浮：

培养瓶不开封，**75%**酒精消毒后平置于培养箱。次日观察，如细胞大部分又贴回瓶底，表明细胞活力正常，剩余漂浮的细胞及培养基可以弃掉，留 **5~10 mL** 培养基继续培养观察，细胞密度达到 **80%**后进行消化传代；如果细胞还是不贴壁，将悬浮的细胞离心收集转到新培养瓶，原培养瓶中加少量培养基继续培养，中间持续注意观察，直到恢复正常。如果仍然无法恢复贴壁，请及时与我们联系。

2. 细胞生长缓慢：

可以将培养基中血清浓度提高至 **15%**，或者采用隔日换液的方法来保证细胞的状态和生长速度。

3. 贴壁细胞生长不均匀：

在培养过程中若出现细胞分布明显不均时（即某一区域细胞已重叠生长，而旁边则为一块空白），此时可将细胞进行消化，重新打散，贴壁，加入新鲜的完全培养基进行培养。

关于细胞株售后服务

1. 买方收到细胞出现细菌、真菌。霉菌污染的情况下，买方需在 **4** 周内提供数据并反馈给供货方。买方收到细胞出现支原体检测阳性的情况，买方需要 **4** 周内提供数据并反馈给供货方，售后处理详情按照第四条约定，过时不予处理。
2. 细胞运输途中受很多不可控因素（强烈震荡，温度变化，时间长等）影响，达不到理想生长状态，收到后麻烦检测细胞是否漏液、漂浮并且不能恢复贴壁能力、死亡等状况，**4** 周内提出并反馈如上情况。本公司为维护客户利益，承诺给客户无条件免费补寄一次，不收取额外运费或者干冰费；邮寄形式同之前订单形式冻存或者复苏。
3. 除去 1, 2 条情况，鉴于细胞的特殊性，售后服务期为发货后 **4** 周，买方需要严格遵循操作说明书原则，对于买方因没有及时签收，未按照说明要求培养，使用错误培养基，操作不规范等人为原因造成的细胞问题，供货方不提供细胞售后服务。
4. 对于双方认为细胞质量问题或者无法鉴定是否为买方原因引起的细胞质量问题，双方协商处理，供货方至多可提供一次重新发货一株复苏状态细胞株的服务，如果需要冻存细胞，额外运输费用由买方承担。
5. 售后服务期内，如果第三方鉴定 **STR** 错误，供货方退细胞货款，同时赔偿第三方用于支付第三方 **STR** 鉴定费用。

