果蝇 Schneider 2 细胞培养

Culturing *Drosophila* Schneider 2 Cells

龙婷^{1, #}, 刘敏^{1, 2, #}, 朱健^{1, 2, *}

¹ 生命科学联合中心, 前沿交叉学科研究院, 北京大学, 北京; ² 生命科学学院, 北京大学, 北京

*通讯作者邮箱: zhua@pku.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 龙婷, 刘敏, 朱健. (2019). 果蝇 Schneider 2 细胞培养. *Bio-101* e1010259. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010259.

How to cite: Long, T., Liu, M. and Zhu, A. J. (2019). Culturing *Drosophila* Schneider 2 cells. *Bio-101* e1010259. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010259. (in Chinese)

摘要: 果蝇 Schneider 2 (S2) 细胞培养简单, 是生化和免疫组化等实验中最常用的果蝇细胞系。该细胞系于 1972 年由 Imogene Schneider 从果蝇胚胎中分离得到 (Schneider, 1972), 是一种血淋巴来源的细胞。本方案主要介绍果蝇 S2 细胞的培养、复苏和冻存操作。

关键词: 果蝇, S2 细胞培养, 细胞复苏

材料与试剂

1. 细胞冻存管 (Corning, catalog number: 430659)
2. 10 ml 塑料移液管 (Corning, Costar, catalog number: 4488)
3. 15 ml 塑料离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 339650)
4. 50 ml 塑料离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 339652)
5. 6 孔细胞培养板 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 140675)
6. 24 孔细胞培养板 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 142475)
7. 细胞培养瓶 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 156367)
8. 细胞培养皿 (Thermo Fisher Scientific, Nunc, catalog number: 150464)
9. 一次性无菌过滤装置 (Thermo Fisher Scientific, Nalgene, catalog number: 1660045)
10. 程序降温盒 (Thermo Fisher Scientific, Nalgene, 5100-0001)

11. 1 ml 带滤芯的移液枪头 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: TF112-1000-Q)
12. 75%酒精消毒液 (ANNJET, 75%酒精消毒液)
13. 胎牛血清 (Cellmax, SA301.02)
14. Schneider 果蝇培养基 (Thermo Fisher Scientific, Gibco, catalog number: 21720-024)
15. 青链霉素混合液 (Thermo Fisher Scientific, Gibco, catalog number: 15140122)

仪器设备

1. 二级生物安全柜 (Esco, Airstream A2)
2. 细胞培养箱 (SANYO, MCO-18AIC): 有恒温和保湿功能即可, 温度设定为 25 °C, 湿度设定为 70%, 果蝇 S2 细胞培养不需要通入 CO₂ 气体
3. 真空泵 (Millipore, WP6122050)
4. 倒置荧光显微镜 (Leica, DM IL LED)
5. 移液枪 (Drummond, Pipet-Aid XP)
6. 移液器 (Gilson, model: P1000)
7. 恒温水浴锅 (Thermo Fisher Scientific, ISOTEMP 202)
8. -80 °C 超低温冰箱 (Esco, Lexicon, UUS-668B-1)
9. 4 °C 及 -20 °C 冰箱 (Haier, BCD-539WT)

实验步骤

1. 细胞传代及下游实验准备

S2 细胞是一种半悬浮细胞, 在细胞传代时不需要使用胰酶消化。

- 1.1 倒置显微镜下观察培养细胞, 若密度达到 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 则需要传代 (图 1)。
在 25 °C 培养条件下, 一般 3 天左右进行一次传代。若细胞密度低于 $0.5 \times 10^5/\text{ml}$, 请勿进行传代, 否则细胞增殖会很缓慢。

图 1. 传代前及传代后细胞形态与密度图。 细胞密度达到左图所示程度时，需要进行传代。右图为传代操作 1 小时后，细胞完成贴壁时的形态与密度图。比例尺为 50 μm 。

- 1.2 将培养基在室温放置，至其温度达到 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 1.3 准备一个新的细胞培养瓶，加入 4.5 ml 新鲜的培养基。如果需要进行下游实验，还需要准备好 6 孔细胞培养板或者 24 孔细胞培养板。6 孔细胞培养板每孔加入 1.8 ml 培养基，24 孔细胞培养板每孔加入 450 μl 培养基。
- 1.4 使用移液枪从细胞培养瓶底部轻柔地吹起细胞并混匀。
- 1.5 以 1:10 的比例接种细胞至细胞培养瓶或者细胞培养板中，比如细胞培养瓶中加入 500 μl 。接种细胞浓度为 $0.5\sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种浓度过低，会导致细胞生长缓慢。部分稳转细胞系需要增加接种量。
- 1.6 轻柔地晃匀细胞，注明细胞传代次数和接种时间，放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱即可。
在该培养条件下，一般 12~24 小时后可进行细胞转染。

2. 细胞复苏

S2 细胞不是可以无限传代的细胞，一般培养到 20~25 代的时候需要复苏新的细胞。此时的细胞形态差，贴壁比例降低，生长慢，转染效率低。

- 2.1 预热 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅。准备干净的细胞培养瓶一个，加入室温的培养基 4 ml。
- 2.2 从液氮中取出一管冻存的 S2 细胞，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中用手轻柔摇晃。在细胞化冻之后，立即用 75% 酒精消毒液消毒整个冻存管，然后拿进生物安全柜中。

- 2.3 将化冻的细胞缓慢加入准备好的细胞培养瓶中，轻轻晃动细胞培养瓶，使细胞均匀分布在细胞培养瓶中。
- 2.4 将细胞培养瓶放入 25 °C 细胞培养箱，等待细胞贴壁。该过程需要 6 小时左右。
- 2.5 倒置显微镜下观察到大部分细胞贴壁后，更换 5 ml 室温的培养基。之后每 3 天按此法更换一次新鲜的培养基，直到细胞开始增殖。一般情况下，从接种到增殖需要 4 到 6 天。
- 2.6 细胞增殖到 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的时候即可按 1 中的方法进行细胞传代及下游实验准备工作。

3. 细胞冻存

传代次数少的细胞可以进行细胞冻存，以备下次复苏。

- 3.1 准备干净的直径为 100 mm 的细胞培养皿一个，加入 9 ml 室温的培养基，向其中接种 1 ml 细胞，接种浓度为 $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 。放入细胞培养箱中让细胞增殖。
- 3.2 倒置显微镜下观察细胞密度，当细胞生长到约 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的时候可以开始准备冻存。
- 3.3 准备 15 ml 塑料离心管一个，2 ml 细胞冻存管 3 个。
- 3.4 用移液器从细胞培养皿中吸出上清至皿中剩余 1.5 ml 旧培养基。向细胞培养皿中加入 1.5 ml 室温的培养基，用移液枪将细胞轻轻吹吸悬起。然后转移到准备好的 15 ml 塑料离心管中。加入 333 μl DMSO，轻柔地上下颠倒混匀。
- 3.5 将待冻存的细胞按 1 ml/管分装到准备好的冻存管中，写明传代次数和冻存时间，放入程序降温盒置于 -80 °C 超低温冰箱中，等待 12 小时。
- 3.6 将细胞转移到液氮中保存。

注意事项

1. 细胞增殖缓慢—如果是接种量较低引起的，可以加大接种量；如果没有可接种的细胞，可以 3 天更换一次新鲜的培养基，等待细胞增殖到合适的密度再进行传代；如果有其他增殖良好的细胞，可以将增殖良好的细胞孔中的培养基吸出，以 0.22 μm 滤器过滤，将过滤过的培养基加入到该增殖缓慢的细胞孔中。
2. 细胞传代次数过多—复苏细胞。
3. 细胞接种量太小—加大接种量。

4. 细胞营养不良：细胞传代次数不多，形态正常，但是增殖缓慢且转染效率低—适当增加培养基中胎牛血清的含量。

溶液配方

1. 细胞培养基

89% Schneider 果蝇培养基

10%胎牛血清

1%青链霉素

培养基的配制方法：

- 1) 室温化冻胎牛血清。建议将化冻后的胎牛血清按 50 ml/管分装到 50 ml 塑料离心管中，保存在-80 °C，以便之后的化冻
- 2) 室温化冻青链霉素混合液。建议将青链霉素混合液按 10 ml/管分装到 15 ml 塑料离心管中，保存在-20 °C，以便之后使用
- 3) 准备一次性无菌过滤装置一个，连接真空泵。向该装置中加入 5 ml 青链霉素混合液和 50 ml 胎牛血清。加入 Schneider 果蝇培养基使液体总体积为 500 ml
- 4) 打开真空泵，待液体过滤完之后关闭真空泵。过滤好的培养基放入 4 °C 冰箱保存
- 5) 在使用培养基进行实验之前需要将其预热到室温

致谢

本实验室的工作得到细胞增殖与分化重点教育部重点实验室、膜生物学国家重点实验室、生命科学联合中心、国家自然科学基金和科学技术部的资金支持。

参考文献

1. Schneider, I. (1972). [Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*](#). *J Embryol Exp Morphol* 27(2): 353-365.