

人角质形成细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-HK008

产品描述

角质形成细胞是一种不断分化的复层鳞状上皮细胞，其分化的最终阶是形成角蛋白。根据角质形成细胞的发展阶段和特点，从内向外可将其分为五层。基底细胞层又称生发层，棘细胞层，颗粒层，透明层，角质层。角质形成细胞的分化成熟表现为从基底层到角质层的逐渐移行。在单一移行过程中，角质形成细胞的形状和功能也逐渐发生着变化，从单层柱状上皮的基底层到扁平的细胞核消失的角质层。新生的基底细胞进入棘细胞层，然后上移到颗粒层的最上层。

适用范围

该试剂盒适用于人皮肤组织角质形成细胞提取试剂盒。

规格

本试剂盒规格为 10 次（以 1 块 1cm³ 为 1 次计）

运输和存储条件

2-8 °C 保存与运输，保质期为参考下表。所有组分开封后，有效期为 6-8 周，建议尽快使用。

配套培养基信息

表 1. 分离培养试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMP-HK008A	人角质形成细胞皮肤组织专用 消化液 I	30 mL	2-8°C，避光保存，3 个月
IMP-HK008B	人角质形成细胞皮肤组织专用 消化液 II	30 mL	2-8°C，避光保存，3 个月
IMP-HK008C	组织处理缓冲液	500 mL	-20°C，避光保存，3 个月

IMP-HK008D	铺板工作液	30 mL	2-8°C，避光保存，3 个月
IMP-HK00801	人角质形成细胞专用培养基	500 mL	2-8°C，避光保存，3 个月

分离步骤

实验前准备：人角质形成细胞皮肤组织专用消化液 I、II、组织处理缓冲液、人角质形成细胞专用培养基；实验需自备手术器械、100 μ m 细胞筛、6cm/10cm培养皿、离心管若干。

1. 在手术室中将组织置于预冷至4°C、含 0.5%双抗的组织保存液中，保证组织完全浸没（获取要求组织宽度大于3mm。）
2. 收到组织后用组织处理缓冲液反复冲洗组织块 10~15 遍直至组织块表面无肉眼可见的污物。
3. 再次用组织处理缓冲液冲洗处理后的组织块，并用眼科剪剪成约 5mm×5mm 的小块，完全浸入装有人皮肤组织专用消化液 I 的 15mL 离心管中，将 15 mL 离心管用锡纸包裹紧密以避光，置于4°C 冰箱中消化 14~20h。
4. 次日，取 1.5ml 铺板工作液于 6 孔板的一个孔中，置于 37°C培养箱 1 小时，随后吸弃铺板液，用 PBS 清洗孔板2-3 次，备用。
5. 次日，将 15 mL 离心管取出，于超净台中打开，用组织处理缓冲液反复冲洗。撕下真皮层。（若无法撕下，重新置于人角质形成细胞皮肤组织专用消化液 I 中 1-2 小时，再次进行步骤 4 操作）
6. 将上皮层置于加入了人角质形成细胞皮肤组织专用消化液 II 的培养皿中，用眼科剪轻柔地将上皮尽量剪碎，防止破坏培养皿底部导致污染。完全剪碎后，将培养皿盖好并用封口膜封住，置于细胞培养箱中消化5-10min，每隔 5 min 取出至超净台中反复吹打混匀。
7. 10 min 后，加入 1mL 胎牛血清终止消化，将细胞悬液过 100 μ m细胞筛，转移至 50 mL 离心管中，250g 离心 5min，吸去上清。（也可分别收集 5 分钟和 10 分钟的消化液单独种板）
8. 用人角质形成细胞专用培养基重悬，计数，按 $0.5-1 \times 10^6$ /6 孔板的一个孔为参考，转移至步骤 5 备好的培养皿中，在 37°C、5%CO₂ 条件下培养。
9. 待细胞密度长至 80%-90%，进行消化传代培养建议 1：2-1：3 传代。（消化时，建议消化时间未3 分钟+1 分钟消化）。

注：若还想分离皮肤成纤维细胞，可进行一下步骤。（以下步骤也可不进行操作）

步骤 5 中的真皮组织可贴壁培养，将真皮与表皮接触面贴于 6 孔板面，加极少量真皮成纤维细胞专用培养基，置于培养箱培养，24 小时后补少量皮肤成纤维细胞专用培养基，且 24 小时内禁止挪动，3-4 天后可能会有细胞爬出。

注意事项

1. 组织分离操作建议在冰上操作，组织处理缓冲液建议预冷处理。
2. 分离时应避免过度消化、过度重悬等操作导致细胞损伤。
3. 一个 6cm 培养皿可接种 1×10^6 个细胞。
4. 细胞专用消化液、培养基中含有微生物生长所需的营养成分，请在超净工作台内打开，按照所需要量分装，并且用封口膜封住瓶口，即取即用，以避免污染。