

大鼠肝星状细胞复苏试剂盒

Cat NO: IMP-RK004

产品描述

原代肝星状细胞（Hepatic Stellate Cell，HSC）形态呈现为星形、纺锤形等。刚贴壁的肝星状细胞细胞质扩展，静息状态下的肝星状细胞具有较长的明显树突状丝纤维。随着培养时间增加，肝星状细胞的树突状丝纤维消退，胞体变大，活化为肌成纤维细胞。体外分离和培养的肝星状细胞被广泛用于病理学、药代动力学、毒理学和致癌作用等基础实验研究。冻存肝星状细胞在-196℃下保存，可更好地保护细胞完整性和功能，减少细胞死亡和变性的风险。

适用范围

本说明书适用于原代肝星状细胞的复苏、离心、重悬等相关信息，请严格参照说明书操作。

运输和存储条件

- （1）运输条件：干式液氮罐运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：液相液氮罐或气相液氮罐长期保存，若存储于液相液氮罐，请保障细胞在液氮表面以下。

配套培养基信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品名称	产品规格	储存
肝星状贴壁培养基	40 mL	2℃-8℃，3 个月
	80 mL	
	120 mL	
肝星状专用培养基	40 mL	2℃-8℃，3 个月
	80 mL	
	120 mL	
I 型鼠尾胶原蛋白	20 mL	2℃-8℃，3 个月

细胞复苏前准备事项

一、培养基预热

培养基在使用前请于 37℃ 恒温环境（如水浴锅、恒温箱）中**预热 30 min 及以上**，保证培养基达到 37℃。预热完成后 75%酒精消毒转移至生物安全柜中使用。

二、细胞培养板包被

贴壁肝星状细胞铺板之前，为了增强肝星状细胞与培养板表面的粘附作用，请使用I 型鼠尾胶原蛋白包被液包被培养器皿底部。不同培养器皿使用包被剂的推荐体积请查找下表，37℃、CO₂ 培养箱孵育包被 0.5~2 小时（最长不超过 6 小时）

表 2. 推荐包被剂体积

培养器皿	表面积（cm ² /孔）	包被液（mL/孔）
48 孔板	1.0	0.2
24 孔板	1.75	0.5
12 孔板	3.9	1.0
6 孔板	9.5	2.0
6cm 培养皿	21	3.0
9cm 培养皿	49	5.0
10cm 培养皿	55	5.0
25cm 塑料培养瓶	25	3.0
75cm 塑料培养瓶	75	7.5

细胞复苏步骤

- 1.将预热好的肝星状贴壁培养基分装 5 mL 至新的 15 mL 离心管中。
- 2.从液氮中取出细胞，将细胞放 37℃ 水浴锅内轻轻晃动冻存管约 1min 45s（时间供参考）直至管中保留约黄豆大小的冰晶，75% 酒精消毒冻存管表面，快速转移至生物安全柜中。
- 3.**迅速**将冻存管中液体一次性倒入含有已预热的肝星状细胞贴壁培养基的 15 mL 离心管中。
- 4.吸取 1mL 肝星状贴壁培养基润洗冻存管内壁（2~3 次），润洗后的培养基转移至步骤 3 离心管中。

5.拧紧离心管盖，**缓慢上下颠倒**离心管 2 次，混匀细胞悬液。

6.室温离心，大鼠肝星状细胞**离心条件为 1500g、5min。**

7.使用移液管或巴氏吸管小心移除上清液（**请勿直接倾倒上清**，避免损失细胞），请保留小部分体积的上清，使得吸头或吸管不接触到细胞沉淀。

8.使用**肝星状贴壁培养基**对其进行重悬。加入 1mL 相应的培养基，离心管底将细胞重悬，此过程禁止剧烈震荡。

【注】①如铺板前等待时间过长，可将细胞于 4℃ 短暂保存（不超过 1h）；②细胞从解冻开始到接种到培养板，请尽量在 30 分钟内完成操作转移至培养箱孵育。

细胞培养步骤

1.根据细胞计数所得的细胞数量，按细胞数 1.5×10^5 cells/cm² 接种到 I 型鼠尾胶原蛋白包被的培养器皿中。

2.使用铺板培养基将细胞悬液稀释至适当接种浓度。

3.轻轻摇匀细胞悬液，用微量移液器/多通道移液器吸取适量细胞悬液接种至已包被的细胞培养器皿中（弃包被液），若接种到多孔板中，请保证孔板内复孔的细胞数量尽量相同。

4.按照“十字法”混匀培养板中的细胞。为达到最适的贴壁效果，显微镜观察并保证细胞在培养板中均匀分布。混匀后将培养板放入细胞培养箱中，大鼠肝星状细胞**静置贴壁 24 小时**。

5.显微镜下观察并拍照细胞形态与贴壁情况，24 小时后，立即将肝星状贴壁培养基更换为肝星状贴专用培养基，并可进行后续实验。

6.细胞培养换液：为保证细胞体外培养的营养供给和代谢废物清除，建议每 48h 进行一次完全换液。

注意事项

（1）使用前请仔细阅读说明书，建议严格参照本说明书进行肝星状细胞的复苏操作。若需技术支持，欢迎随时致电。

（2）收到细胞后，请快速查验细胞包装是否完好无损、运输温度是否符合要求，并将装有细胞的冻存管迅速转入液氮罐储存。

（3）为保证复苏后细胞活率，复苏过程中请**轻柔操作**，避免细胞活率下降。

（4）原代肝星状细胞特性敏感、生长条件严格，因此推荐使用逸漠配套的培养基，并且按照说明书操作。

（5）运输和存储期间以及取用解冻前，请避免将原代肝星状细胞置于非液氮环境下。

（6）由于复苏过程中离心转速较高，可能会有较多杂质及碎片，其为正常现象，待肝星状细胞贴壁后换液即可。