

小鼠肝星状细胞复苏试剂盒

Cat NO:IMP-MK006

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

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IMP-MK006S01	肝星状贴壁培养基	40 mL	2℃-8℃, 3个月
IMP-MK006M01		80 mL	
IMP-MK006L01		120 mL	
IMP-MK006S02	肝星状专用培养基	40 mL	2℃-8℃, 3个月
IMP-MK00M02		80 mL	
IMP-MK006L02		120 mL	
IMP-MK001A	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5mL 至新的15mL 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15mL 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，小鼠肝星状细胞**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，小鼠肝星状细胞**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。