

## 人巩膜成纤维细胞说明书

货号 Cat No.	PRI-H-00115
规格 specifications	5 x 10 <sup>5</sup> cells/vial
描述 Description	<p>人巩膜成纤维细胞分离自巩膜组织，巩膜是眼球壁的主要组成之一。是眼球纤维膜的后 5/6 部分。前方联接角膜，后方与视神经的鞘膜延续。巩膜在视神经穿出部附近最厚，愈前愈薄，在肌腱附着处又复增厚(巩膜厚度：后极部 1mm，赤道部 0.4~0.5mm，直肌附着处 0.3mm)。其与角膜交界处，外面有环形的角膜沟，深部有巩膜静脉窦。小儿的巩膜为浅蓝色，成年为白色，老年因脂肪沉着而带黄色。巩膜结构坚韧，有支持和保护眼内组织的作用。成纤维细胞是疏松结缔组织的主要细胞成分，由胚胎时期的间充质细胞分化而来；成纤维细胞较大，轮廓清楚，多为突起的纺锤形或星形的扁平状结构，其细胞核呈规则的卵圆形，核仁大而明显。成纤维细胞功能活动旺盛，细胞质嗜弱碱性，具明显的蛋白质合成和分泌活动，在一定条件下，它可以实现跟纤维细胞的互相转化；成纤维细胞对不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损的修复有着十分重要的作用。刚分离的肺成纤维细胞呈圆形、折光性良好，悬浮于培养基中。30min 细胞贴壁，其中部分开始伸出伪足，表现为小的突起；6h 后细胞基本贴壁完全，伸展成梭形，胞核清晰，分布较均匀，散在生长，不聚集成团；细胞生长迅速，5-7 天即呈融合状态，细胞排列紧密，有的交叉重叠生长，平坦、胞体较大，细胞质透明，细胞核较大，呈椭圆形，颜色淡。细胞融合，并彼此连接成网状；细胞呈突起的纺锤形或星形的扁平分布。</p>
分离方法及质量控制 methods and quality control	<p>本公司生产的人巩膜成纤维细胞采用胰蛋白酶和胶原酶混合消化制备而来，细胞总量约为 5×10<sup>5</sup> 个/瓶，细胞经 Vimentin 免疫荧光鉴定，细胞纯度可达 90%以上，且不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。</p>
培养试剂及培养条件 Culture Medium and reagents	<p><b>细胞专用培养基组分：</b>基础培养基；胎牛血清；细胞生长因子；青霉素/链霉素溶液 (备注：每种组分单独包装，使用前需要按比例分装，详细操作详见说明书，现用现配，效果更佳。) <b>推荐专用培养基货号：</b> PCM-H-141 <b>0.05%消化液货号：</b> CSP048 <b>无血清细胞冻存液：</b> CSP077</p> <p><b>温度：</b> 37°C <b>气相：</b> 95%空气，5%二氧化碳</p>
培养特性 Culture Properties	贴壁
细胞复苏 Cell Thawing	<p><b>注意：1.低温保存的细胞非常脆弱，请将冻存管放入 37°C的水浴中解冻，尽快复苏细胞。</b> <b>2.提前室温预热培养基。</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.在无菌区准备好 15ml 离心管和 T-25 培养瓶并分别加入 5ml 完全培养基；</li> <li>2.将冻存管放入 37°C水浴锅中，握住冻存管不停晃动，直到内容物完全融化。然后立即将冻存管从水浴中取出，擦干并喷洒 75%乙醇，移至无菌区；</li> <li>3.小心地拆卸盖子，不要碰到里面的螺纹，用移液枪轻轻吸出细胞悬液，加入到准备好的 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；</li> <li>4.弃上清后，轻弹离心管底部分散细胞沉淀，加入适量完全培养基重悬细胞后转入准备好的 T25 培养瓶（建议加液量：5~7ml）；</li> <li>5.轻轻摇动培养瓶使细胞均匀分布，如有必要（如使用不透气瓶），松开阀盖，以便气体交换。</li> <li>6.将培养瓶放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。</li> </ol>

<p>细胞传代 Subculturing</p>	<p>收到细胞后, 请对细胞培养瓶外表进行消毒, 将细胞置于培养箱中进行 1-2 小时的缓冲, 待细胞恢复基本生长状态后, 进行后续细胞实验。</p> <p>在倒置显微镜下观察整个细胞生长情况:</p> <p>(一) 细胞未长至 85% 时, 用 75% 酒精喷洒整个瓶消毒后放到生物操作台内, 严格无菌操作, 打开细胞培养瓶, 若培养瓶上无特殊标注, 吸去剩余培养液, 只留 6-8ml 培养液继续培养。</p> <p>(二) 细胞已长满 (达 85-95%)。即可进行传代, 具体步骤如下:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 弃去培养液, 用 PBS 洗涤 1-2 次;</li> <li>2. 加入 1.0ml 胰酶消化液, 37°C 消化(消化时间根据不同细胞及所用胰酶有所差异), 显微镜下观察细胞消化情况, 若细胞回缩变圆、透亮、轻拍瓶壁呈流沙样脱落, 则迅速拿回操作台, 加入至少双倍的完全培养液, 终止消化并轻轻吹打细胞 1-2 次, 使其变成单细胞悬液;</li> <li>3. 将细胞收集于离心管中离心 1000rpm/5min, 弃上清, 轻弹管底, 将细胞弹散;</li> <li>4. 加入新鲜培养基重悬细胞, 进行传代;</li> <li>5. 如果没有特别说明, 建议收到细胞后的第一次传代比例为 1:2。</li> </ol> <p><b>注: 1. 观察细胞密度最好用 (4X 物镜) 低倍镜观察, 以便正确的判断细胞密度; 观察细胞形态请用 (10X 或 20X) 高倍镜观察;</b></p> <p><b>2. 推荐使用 0.05% 胰酶/EDTA 消化液 (推荐货号: CSP048);</b></p> <p><b>3. 瓶中运输的培养液不能重复使用, 请换新鲜培养液培养;</b></p> <p><b>4. 有些细胞贴壁不牢, 如发现贴壁细胞有脱落, 可离心重悬后接种到新瓶内。</b></p>
<p>细胞冻存 Cell cryopreservation</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 常规方法收集对数期的贴壁细胞或悬浮细胞于试管中。</li> <li>2. 根据培养细胞的密度和冻存管的大小确定所需冻存细胞数。</li> <li>3. 将所需数目的细胞悬浮液置于离心管中, 1000rpm, 5 分钟离心收集培养细胞沉淀, 彻底弃去离心管中的上清液。</li> <li>4. 加入适量的细胞冻存液于离心管中, 使细胞浓度约为 <math>5 \times 10^5 - 1 \times 10^7</math> /ml。轻柔地混匀细胞, 制成细胞混合液。</li> <li>5. 将离心管中的细胞混合液分装于已标记的冻存管中, 建议每管 1ml 或 1.5ml。</li> <li>6. 直接将分装好的细胞冻存管放入 -80°C 超低温冰箱中, 可长期冷冻保存。</li> <li>7. 如果想液氮中长期保存, 需先放入 -80°C 冰箱至少一天时间, 方可移至液氮罐中保存。</li> <li>8. 以上冻存步骤是按照无血清冻存液 (货号: CSP077) 推荐。</li> </ol>
<p>保存 Storage</p>	<p>保存条件: 液氮长期存储</p>
<p>供应限制 Product Use</p>	<p>仅限科研, 不可用于临床</p>
<p>安全性 Safety</p>	<p><b>所有肿瘤和病毒转染的细胞均视为有潜在的生物危害性, 必须在二级生物安全台内操作, 并注意防护</b></p>
<p>常见问题及解决方案 Questions and solutions</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在收到细胞后先观察培养瓶是否破裂, 漏液等, 如遇到上述问题请及时拍照并与我们联系。</li> <li>2. 贴壁细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 如细胞大部分又贴回瓶底, 表明细胞活力正常, 剩余少量漂浮的细胞可以去掉, 留 8-10ml 培养液培养观察, 细胞生长至汇合度到达 85% 左右, 进行消化传代; 如细胞仍不贴壁, 将细胞离心收集转到新培养瓶, 原培养瓶加部分培养液继续培养, 注意观察。如细胞仍不能贴壁, 请用台盼蓝染色鉴定细胞活力, 并请及时拍照 (多倍数多视野), 包括染色照片, 并联系我们。(以上仅为贴壁细胞处理方法)</li> <li>3. 悬浮细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 将整瓶细胞及培养液分批离心 (1000rpm, 5min), 加入适量培养基, 根据离心后的细胞量进行放回培养或分瓶培养。(以上仅为悬浮细胞处理方法)</li> <li>4. 半悬细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 将整瓶细胞培养液上层悬浮细胞离心 (1000rpm, 5min), 重悬细胞后加入原培养瓶培养至传代。细胞数量较大, 可将贴壁细胞消化下来, 与上层悬浮细胞混匀传代。重悬上层悬浮细胞时必须保持下层贴壁细胞的营养条件, 防止贴壁细胞缺乏营养。(以上仅为半悬细胞处理方法)</li> </ol>

	如遇到细胞培养问题请及时拍照并与我们联系，我们的技术人员会一直跟踪指导。
备注 additional information	<b>由于实验所用试剂、操作环境及操作手法的不同，以上方法仅供各实验室参考。</b> <b>原代细胞体外培养周期非常有限，请尽快及时安排实验。</b> <b>建议中乔新舟配套的专用细胞培养基及正确的操作方法来培养，以此保证该细胞的最佳培养状态。</b>