

人角膜成纤维细胞说明书

货号 Cat No.	PRI-H-00085
规格 specifications	5 x 10 ⁵ cells/vial
描述 Description	<p>人角膜成纤维细胞分离自眼角膜组织；角膜位于眼球前壁的一层透明膜，约占纤维膜的前 1/6，从后面看角膜呈正圆形，从前面看为横椭圆形。角膜厚度各部分不尽相同，中央部最薄。角膜有十分敏感的神经末梢，如有外物接触角膜，眼睑便会不由自主地合上以保护眼睛。为了保持透明，角膜并没有血管，透过外界空气、泪液及房水获取养份及氧气。角膜分为五层，由前向后依次为：上皮细胞层、前弹力层、基质层、后弹力层、内皮细胞层。成纤维细胞(Fibroblast)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。刚分离的角膜成纤维细胞呈圆形、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。角膜成纤维细胞在生理条件下的主要功能包括：构造和维持角膜的正常形态，合成和释放细胞外基质以及组织损伤后及时大量聚集修复损伤组织。</p>
分离方法及质量控制 methods and quality control	本公司生产的人角膜成纤维细胞采用混合酶消化法制备而来，细胞总量约为 5×10 ⁵ 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。
培养试剂及培养条件 Culture Medium and reagents	<p>细胞专用培养基组分：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。)</p> <p>推荐专用培养基货号： PCM-H-108 0.05%消化液货号： CSP048 无血清细胞冻存液： CSP077</p> <p>温度： 37°C 气相： 95%空气，5%二氧化碳</p>
培养特性 Culture Properties	贴壁
细胞复苏 Cell Thawing	<p>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。 2.提前室温预热培养基。</p> <ol style="list-style-type: none">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；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；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；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）；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。

	6.将培养瓶放入 CO ₂ 培养箱中培养。
细胞传代 Subculturing	<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"> 1. 弃去培养液, 用 PBS 洗涤 1-2 次; 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; 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; 4. 加入新鲜培养基重悬细胞, 进行传代; 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。 <p>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;</p> <p>2. 推荐使用 0.05% 胰酶/EDTA 消化液 (推荐货号: CSP048);</p> <p>3. 瓶中运输的培养液不能重复使用, 请换新鲜培养液培养;</p> <p>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。</p>
细胞冻存 Cell cryopreservation	<ol style="list-style-type: none"> 1. 常规方法收集对数期的贴壁细胞或悬浮细胞于试管中。 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。 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。 4. 加入适量的细胞冻存液于离心管中, 使细胞浓度约为 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ /ml。轻柔地混匀细胞, 制成细胞混合液。 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。 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。 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。 8. 以上冻存步骤是按照无血清冻存液 (货号: CSP077) 推荐。
保存 Storage	保存条件: 液氮长期存储
供应限制 Product Use	仅限科研, 不可用于临床
安全性 Safety	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
常见问题及解决方案 Questions and solutions	<ol style="list-style-type: none"> 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。 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) 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) 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） 如遇到细胞培养问题请及时拍照与我们联系，我们的技术人员会一直跟踪指导。
备注 additional information	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。 原代细胞体外培养周期非常有限，请尽快及时安排实验。 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。