



## 人软骨细胞永生化(免疫荧光鉴定)

### 产品简介

产品货号	FSX451		
产品名称	人软骨细胞永生化(免疫荧光鉴定)		
细胞简介	<p>软骨细胞存在于关节软骨中，负责分泌 II 型胶原和其它类型的胶原以及非胶原的细胞外基质大分子。成软骨细胞的增殖和分化与脊椎动物骨架的发育有着密切的关系。软骨细胞能分泌和响应一系列的生长因子，包括 IGF-1 和 IL1。体外培养的软骨细胞是研究软骨修复和关节炎病理的有用模型。</p> <p>该细胞通过慢病毒转染的方式携带 SV40 基因。</p>		
细胞鉴定	II 型胶原(Collagen II)免疫荧光染色为阳性		
细胞规格	1×10 <sup>6</sup> cells/T25 培养瓶或者 1mL 冻存管包装		
基本形态	 <p>长梭形细胞，不规则细胞</p>		
种属来源	人	组织来源	人的关节组织
生长特性	贴壁生长		
培养条件	<p>推荐使用原代软骨细胞培养体系作为体外培养(CAT#FSX506)</p> <p>原代软骨细胞的培养基 *500ml 1× 4℃、避光</p> <p>原代软骨细胞培养添加剂 *5ml 100× -20℃、避光</p> <p>胎牛血清 ( FBS ) *50ml 终浓度 10% -20℃、避光</p> <p>双抗 ( 青霉素/链霉素, P/S ) *5ml 100× -20℃、避光</p>		
消化时间	2-3 分钟左右		
培养环境	气相: 95%空气+5%二氧化碳; 温度: 37℃		
备注			



## 收货注意事项

### T25 细胞到货处理

**观察：**收到细胞后，请及时核对培养瓶上标注的细胞名称是否与订购的细胞名称一致以及培养瓶是否有破损或漏液等异常情况。

#### 处理：

- 1) 75%酒精棉球擦拭 T25 细胞培养瓶外部。
- 2) 显微镜观察细胞生长情况，并对细胞进行不同倍数拍照保存（40x, 100x, 200x 各一张）前三天照片为重要售后依据，不提供照片默认收到状态良好。
- 3) 不要打开培养瓶盖，将细胞放入 37 度培养箱中静置 3-4 小时后再做处理，以稳定细胞状态。
- 4) 收到细胞后，及时查看说明书是贴壁细胞还是悬浮细胞形态，并按常规贴壁或悬浮细胞的传代方法操作。

**贴壁：**未超过 80%汇合度时，**将瓶装的完全培养液收集至离心管中**，留 5ml 完全培养基，放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养；超过 80%汇合度时，根据情况传代或者冻存，具体操作见细胞培养步骤。首次传代，建议 1:2 传代（两个 T25）。（**传代时建议一瓶用原瓶里面的完全培养基，另外一瓶用自己配的完全培养基，进行对比培养。**）

**备注：**运输用的培养基（灌液培养基）不能再用来培养细胞，请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。当密度达到 80%左右，传代比例前几次都按照 1:2 传代，传代后一个倍增周期后可以长成 2 瓶 80%左右密度的细胞时，冻存其中一瓶成 1 个 1ml 的冻存管当种子细胞保存，另外一份长满的细胞继续 1:2 传代，反复操作后冻存细胞种子大约 3 个以上。后续根据细胞倍增效率和密度可以适当扩大传代比例做实验。

#### 传代比例：

- 1 个 T25 瓶传 2 个 6cm 的培养皿或者 2 个 T25 瓶 相当于 1:2
- 1 个 T25 瓶传 1 个 10cm 的培养皿或者 1 个 T75 瓶 相当于 1:3

### 冻存细胞到货处理

- 1) 收到细胞后，检查外包装情况和箱内是否还有干冰。如有外包装破损干冰已完全挥发等问题，请即时联系。
- 2) 将细胞取出转移至液氮或-80℃度冰箱保存，建议尽早复苏。

### 细胞复苏、传代与冻存操作流程

1) 冻存液：90%FBS 或者完全培养基+10%DMSO 或者我司无血清冻存液（货号：FS1187/FS1188）均可冻存发货的细胞 常规常见细胞 冻存管 2 只。我们建议客户先复苏 1 只，存活的话第二只当种子保存，第一只没有存活再严格按照我们的要求复苏第二只，如果还不成功 第一时间反馈细胞复苏的详细信息给我们。【注】：**未与我方联系擅自复苏第二管出现问题不予售后。**



## 操作流程:

### 复苏

- 1) 将恒温水浴锅中的水预热到 37°C;
- 2) 准备一支 15ml 离心管, 加入 5ml 含 10%FBS 的完全培养基, 放入 37°C 水浴锅中预热;
- 3) 戴上护目镜, 厚毛线手套后, 从液氮罐中取出要复苏的细胞, 尽快转入 37°C 恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率;
- 4) 将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中, 混匀后, 1000rpm 离心 5min;
- 5) 准备一个 T-25 培养瓶, 写上细胞名称、日期, 再加入 4ml 完全培养基;
- 6) 离心完成后弃去上清, 用 1ml 完全培养基重悬细胞后, 转入 T-25 细胞培养中, 混匀后转入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养静置。

**注意: 从液氮中取出细胞冻存管时, 若冻存管内有液氮进入, 需拧松冻存管, 排出内部残留的液氮, 之后拧紧冻存管, 置于干冰上, 然后放入 37°C 水浴中, 避免温差太大造成液氮快速气化而爆炸。**

### 传代 (细胞传代建议一传二)

- 1) 当细胞汇合度达到 85% 以上时, 可进行传代。
- 2) 在生物安全柜内, 打开培养瓶瓶口, 收集瓶内的培养基;
- 3) 向培养瓶内加入 3ml 无菌的 1×PBS 后, 水平放置培养瓶, 使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积, 吸弃 PBS;
- 4) 向瓶内加入消化液 1ml, 浸润底面后放入 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2min;
- 5) 孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起, 若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中, 将悬液吸入 15ml 离心管;

**【注】:** 如还有部分细胞未消化下来, 可采用分步消化:

- ① 准备一个无菌的 15ml 离心管, 加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基;
- ② 将消化下来的细胞吸入①中的离心管内中和 (避免吹打);
- ③ 向之前消化的培养瓶中加入 1ml 胰酶继续消化 2min 左右 (除贴壁非常牢固的细胞外。比如 RAW264.7 等消化时间可以长点, 其他细胞尽量缩短消化时长, 可以减少胰酶对细胞膜的损伤, 有助于维持细胞系的状态持续稳定, 降低老化速度), 轻拍培养瓶, 95% 左右细胞脱落后加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中和, 中和后的细胞悬液移入①中的离心管内。
- 6) 1000rpm 离心 5min;



- 7) 准备两个新的 T-25 培养瓶，各加入 4ml 完全培养基。
- 8) 离心完成后，弃上清，用 2ml 完全培养基重悬离心细胞，将重悬后的细胞转入 2 个 T-25 培养瓶，每个培养瓶各 1ml；
- 9) 水平放置培养瓶，震荡混匀后，将培养瓶置于 37℃，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。

**【注意】：**

- 1)、每次消化不超过 2min，如果消化 2min 后，培养瓶中还有较多细胞贴壁，可采用分步消化，将消化下来的细胞移入 15mL 离心管中和，再向培养瓶中加入胰酶继续消化，每次消化不超过 2min，直到完全消化下来为止。
- 2)、细胞传代建议 1 传 2，前期传代后冻存一份细胞，另外一份细胞继续扩增，确保细胞种子保留好之后可以扩大传代比例。
- 3)、特殊细胞贴壁特别牢固的也可以采用长时间消化法或者物理细胞铲（刮）把细胞消化或者刮下来，比如巨噬类细胞。
- 4)、有一些细胞属于半贴壁生长，收货后一部分贴壁，还有一部分悬浮的情况下，注意不要把悬浮的细胞全部抽掉不要，或许还是活细胞，应该根据密度数量情况决定是否要收集起来和贴壁一重新铺瓶。

## 冻存（细胞冻存建议每瓶 T25 冻一支）

- 1) 将需要那冻存的细胞从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出，在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基；
- 2) 向培养内加入无菌 1×PBS 3ml，之后水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养平面上所都的面积，吸弃 PBS；
- 3) 重复步骤 2 一次，之后向瓶内加入消化液 2ml，轻微震荡后放入 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1min 左右；
- 4) 孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，如还有部分细胞未消化下来，可在生物安全柜内用移液管吸起消化液，吹打培养平面；
- 5) 向消化下细胞的培养瓶中加入 3ml 含 10%血清的完全培养基终止消化，然后将培养瓶中的液体转入 15ml 离心管中，300g 离心 5min；
- 6) 离心完成后，弃上清，用 1ml 冻存液重悬细胞沉淀，然后转入 1.8ml 冻存管中；
- 7) 将冻存管转入填充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入 -80℃ 冰箱中过夜降温；
- 8) 第二天，取出降温完成的序降温盒中的冻存管，尽快转入液氮罐中保存。