

小鼠肝实质细胞复苏试剂盒使用说明

Cat NO: IMP-MK002

产品描述

原代肝实质细胞（Hepatocytes）是高度分化的细胞，在体外培养中，贴壁后呈较大圆形、有明显的双核或多倍体核，培养 2-3 天后，细胞形态开始分化，伸出细长的细胞枝干，呈不规则的多边形。肝细胞具有丰富的酶系及多种特异性功能。体外分离和培养的肝实质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

本说明书适用于冻存悬浮和贴壁原代肝实质细胞的解冻、离心、重悬、计数及接种/铺板等相关信息，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	贴壁/悬浮
IMP-MK002S	肝实质维持/贴壁/ 复苏培养基	40 mL/40 mL/40 mL	2℃-8℃，3 个月	贴壁，悬浮/贴壁/ 贴壁，悬浮
IMP-MK002M	肝实质维持/贴壁/ 复苏培养基	80 mL/80 mL/80 mL	2℃-8℃，3 个月	贴壁，悬浮/贴壁/ 贴壁，悬浮
IMP-MK002L	肝实质维持/贴壁/ 复苏培养基	120 mL/120 mL/120 mL	2℃-8℃，3 个月	贴壁，悬浮/贴壁/ 贴壁，悬浮
IMP-MK001A	I 型鼠尾胶原蛋白	20 mL	2℃-8℃，3 个月	贴壁



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（贴壁肝实质细胞）

贴壁肝实质细胞铺板之前，为了使肝实质增强肝实质细胞与培养板表面的粘附作用和维持肝实质细胞形态稳定，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. 从液氮罐中取出细胞冻存管，立即置于 37℃ 水浴中（注意水面尽量没过冻存液面，但不可接触冻存管盖）。
2. 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已预热的复苏培养基中。
4. 吸取 1mL 复苏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，小鼠肝实质细胞离心条件为 50g、2min，升速设置为 5，降速设置为 1，关闭刹车模式。

【注】升降速可根据离心机型号设置，保证总离心时长不超过 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.细胞重悬：请依据肝实质细胞的具体类型选择相应培养基进行重悬与定容，悬浮肝实质细胞选用肝实质维持培养基，贴壁肝实质细胞选用肝实质贴壁培养基。加入 2mL 相应的培养基，轻弹离心管底将细胞重悬并定容至 3mL，此过程禁止剧烈震荡以及反复吹打。

【注】①重悬培养基体积可根据细胞数量而定，避免细胞密度过低；②为减少机械损伤，可盖紧离心管盖后，轻轻顺/逆时针旋转离心管，重悬细胞。

9.细胞计数：可选择台盼蓝染色或 AO/PI 染色，测定活细胞数目和细胞活率。如铺板前等待时间过长，可将细胞于 4℃短暂保存（不超过 1h）。

【注】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

悬浮肝实质细胞 Suspension Hepatocytes

- 1.根据细胞计数所得的细胞数量与活率，结合实验所需细胞浓度，计算所需的细胞悬液体积。
- 2.进行悬浮培养实验，若不立即使用，请将细胞悬液短暂置于 4℃。

贴壁肝实质细胞 Plateable Hepatocytes

- 1.根据细胞计数所得的细胞数量和活率，按活细胞数 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。

【注】步骤 2、3 操作过程中，请尽量避免使用 1ml 以下量程的移液器，避免对细胞造成机械损伤。

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，小鼠肝实质细胞静置贴壁 4~6 小时。



5.显微镜下观察并拍照细胞形态与贴壁情况，细胞贴壁后，立即将铺板培养基更换为细胞维持培养基，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实质细胞的复苏操作。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**，避免机械损伤导致细胞活率下降。

(4) 原代肝实质细胞特性敏感、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，请避免将原代肝实质细胞置于非液氮环境下。

