人皮肤成纤维细胞（BJ）

细胞介绍

人皮肤成纤维细胞（Human skin fibroblast）BJ 最初来源于新生男婴的包皮，在其生长过程中会分泌少量黑色颗粒，属于正常现象；BJ 细胞对血清敏感，建议使用特级胎牛血清；BJ 细胞常用于皮肤相关的研究。**细胞为有限细胞系，传代次数有限！需要在前几代尽快安排实验。**

细胞特性

1） 来源：人皮肤; 包皮
2） 形态：成纤维细胞样；贴壁生长
3） 含量：>5x10^5 细胞数
4） 规格：T25 瓶或者 1mL 冻存管包装
5) 用途：仅供科研使用。

运输和保存：干冰运输及复苏好存活细胞：（1）1mL 冻存管包装干冰运输，收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。（2）T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

细胞接收后的处理：

1） 收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于室温放置约 1h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。

2）请在 4 或 5X 显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各 2-3 张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

3） 贴壁细胞：**细胞在室温放置约 1h，显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况，有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。**若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下，可去除培养瓶中灌液培养基（若有未贴壁的细胞需要离心回收，重悬打入到原培养瓶中）,加入新配制的完全培养基 6-8mL，放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上，可以对细胞进行传代处理。传代过程中，若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。

4）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。 收到细胞后第一次传代建议 T25 培养瓶 1：2 传代 。

细胞培养步骤

一．培养基及培养冻存条件准备：

1）准备 DMEM 基础培养基, 10% 特级胎牛血清 FBS，1% 双抗 P/S。

2）培养条件： 气相：空气，95%；二氧化碳，5%。 温度：37 摄氏度，培养箱湿度为 70%-80%。

3）冻存液：无血清细胞冻存液。

二． 细胞处理：

1） **冻存细胞的复苏：：**

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入到含 4-6mL 完

全培养基的离心管中混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶（或皿）中 37℃培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

2） **细胞传代：**如果细胞密度达 80%-90%，即可进行传代培养。

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。

2. 加入 0.25％（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中（T25 瓶 1mL），置于 37℃培养箱中**消化 2 分钟（难消化的细胞可以适当延长消化时间）**，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加入 **5ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。**

3.轻轻打匀后吸出，在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，补加 1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1：2 的比例分到新 T25 瓶中，添加 6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按 1:2~1:5 的比例进行。

3） **细胞冻存:** 收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例；

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 1×10^6~1×10^7 个活细胞/ml.

2. 1000rpm 离心 3-5min，去掉上清。用配制好的细胞冻存液重悬细胞 ，按每 1ml 冻存液含 1×10^6~1×10^7 个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。

3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80 度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

注意事项：

1. 所有动物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，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。