**人原代软骨细胞永生化-ZsGreen绿色荧光蛋白标记**

**细胞详述：**

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。**人软骨细胞永生化通过带有绿色荧光蛋白(ZsGreen)的慢病毒颗粒转导后，经过多轮筛选而获得的稳定表达ZsGreen蛋白的细胞株，该细胞株可以在荧光显微镜488nm激发光下可观察到ZsGreen蛋白的表达。**

**细胞特性:**

1. 细胞来源于人的关节组织。
2. 细胞鉴定：Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)免疫荧光染色为阳性。
3. 经鉴定细胞纯度高于90%。
4. 细胞生长方式：长梭形细胞，不规则细胞，贴壁培养。

**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：**细胞在室温中放置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 。

**一．培养基及培养冻存条件准备：**

1. 推荐QuiCell原代软骨细胞培养体系**（产品编号：QuiCell-Pri-8023）**作为体外培养人原代软骨细胞永生化的培养基
2. **药筛浓度为puro=0.5ug/ml，培养过程中可不用再添加puro，如若担心抗性随着传代时间降低，可定期用0.2ug/ml浓度puro维持，冻存和传代未贴壁时请勿加药。**
3. 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%。
4. 冻存液：无血清细胞冻存液。
5. **细胞处理：**
6. **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。

1. **细胞传代**：如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。

**冻存和传代未贴壁时请勿加药**

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1-2mL，T75瓶2-3mL），置于37℃培养箱中消化1-2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3-4ml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。

1. **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；
2. 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1×106~1×107个活细胞/ml.
3. 1000rpm离心3-5min，去掉上清。用无血清细胞冻存液重悬细胞 ，按每1ml冻存液含1×106~1×107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。
4. 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。