

人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞永生化-hTERT

细胞详述:

滑膜是关节囊的内层,淡红色,平滑闪光,薄而柔润,由疏松结缔组织组成。关节腔内的所有结构,除关节软骨、半月软骨板以外,即便是通过关节腔的肌腱、韧带等均全部为滑膜所包裹。滑膜分泌滑液,在关节活动中起重要作用。正常滑膜分为两层,即薄的细胞层(内腔层)和血管层(内膜下层),是血管丰富的关节囊内膜,贴附于非关节面部分,覆盖于关节囊内的骨面上,不在软骨面上,此部分称为边缘区或“裸区”。滑膜呈粉红色,光滑发亮、湿而润滑,有时可见绒毛,内含胶原性纤维。**该细胞通过慢病毒转染的方式携带 hTERT 基因。**

细胞特性:

- 1) 细胞来源于手术取得的患类风湿性关节炎病人的关节滑膜组织。
- 2) 细胞鉴定:纤维连接蛋白(Fibronectin)或波形蛋白(Vimentin)免疫荧光染色为阳性。
- 3) 细胞生长方式:成纤维样细胞,贴壁培养。

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。**

一. 培养基及培养冻存条件准备:

- 1) 推荐使用人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞专用完全培养基(货号 QuiCell-Y1859-M500)
- 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,

上海葵赛生物科技有限公司

QuiCell葵赛生物

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 1-2mL，T75 瓶 2-3mL），置于 37℃ 培养箱中消化 **2-3 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**：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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml。
2. 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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 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。

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891